

**GENOMWEITE METHYLIERUNGSANALYSEN UND
IDENTIFIZIERUNG PROGNOTISCHER UND PRÄDIKTIVER MARKER
FÜR DAS EPITHELIALE OVARIALKARZINOM**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich Schiller Universität Jena**

**von Diplom-Biochemiker Daniel Steinbach
geboren am 26. April 1982 in Zwickau**

Gutachter

- 1. Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. rer. nat. Ferdinand von Eggeling, Universitätsklinikum Jena**
- 3. Prof. Dr. rer. nat. Edgar Dahl, Uniklinik RWTH Aachen**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 2. September 2014

Abkürzungsverzeichnis

5mC	5-methyl-Cytosin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (100 %)
ad.	addiere (auffüllen auf)
AGO	Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie e.V.
AK	Adenokarzinom
Aq. dest.	Aqua destillata - destilliertes Wasser
AT	Adenin und Thymin
bisulfit-DNA	bisulfitkonvertierte DNA
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Cytosin
ca.	circa
CGI	CpG-Insel
Cis	Cisplatin
CP	Carboplatin
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
Ct	Cycle threshold
CTx	Chemotherapie
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser (ion- und nucleasfrei)
DMR	differenziell methylierte Region(en)
DNA	Desoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
endomet	endometrioides
EOC	epithelial ovarian cancer - epitheliales Ovarialkarzinom
Ep	Epirubicin
FCS	fetales Kälberserum
FE	Feature Extraction
FFPE	Formalin fixed and Paraffin embedded
FIGO	Int. Federation of Gynecology and Obstetrics (Tumorklassifikation)
G	Grading (Tumorgrading)
g-DNA	genomische DNA
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
hg19	human genome 19 (GRCh37 Referenzgenom)
HPV	humane Papillomaviren
IHC	Immunhistochemie
konz.	konzentriert
LMPC	Laser Microdissection and Pressure Catapulting (Laser-Mikrodissektion)
LogRatio	Logarithmus der Ratio in Microarrayanalysen
max.	maximal
mCpG	5-Methylcytosin-Guanin Dinukleotid
MID	Multiplex Identifier (targetspezifische Identifikationssequenz für NGS)
min.	mindestens
MIRA	Methylated CpG-Island Recovery Assay
miRNA	micro ribunucleic acid
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	messenger ribunucleic acid

MS	methylierungsspezifisch(e)
MW	Mittelwert
NGbS	Next-Generation bisulfit-Sequenzierung
NGS	Next-Generation Sequenzierung
OFR	open reading frame - offener Leserahmen
OP	Operation
OvCa	Ovarian Cancer - Ovarialkarzinom
pap	papilläres
PCR	Polymerase chain reaction - Polymerase Kettenreaktion
PFS	progressionfreies Überleben
q-MS-PCR	quantitative Methylierungsspezifische PCR
q-PCR	quantitative PCR
R	Resektionsstatus
RISC	miRNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
siRNA	small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
Ta	annealing temperature - Annealingtemperatur
Tab.	Tabelle
Tax	Taxan
Tm	melting temperature - Schmelztemperatur
TNM	TNM-Klassifikation (Tumor, Nodes - Lymphknoten, Metastasen)
Top	Topotecan
UCSC	University of California Santa Cruz
vs.	versus (im Vergleich zu)

Einheiten

bp	Basenpaare	µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius	ml	Milliliter
s	Sekunden	l	Liter
min	Minuten	pmol	Pikomol
h	Stunde	nmol	Nanomol
d	Tage	µmol	Mikromol
a	Jahre	µM	mikromolar
ng	Nanogramm	mM	millimolar
µg	Mikrogramm	M	molar
mg	Milligramm	rpm	Umdrehungen je Minute
g	Gramm		

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	ii
Zusammenfassung	viii
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Ovarialkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathologische und histologische Einteilung.....	1
1.1.3 Tumorentstehung und Risikofaktoren.....	2
1.1.4 Symptome und Diagnose	2
1.1.5 Therapie und prognostische Faktoren	3
1.1.6 Prognostische und Prädiktive Marker	4
1.2 Epigenetik.....	5
1.2.1 Allgemeines	5
1.2.2 DNA-Methylierung.....	6
1.2.3 Das DNA-Methylom in entarteten Zellen	8
1.3 Epigenetik und epigenetische Marker des Ovarialkarzinoms.....	10
1.4 Techniken zur Detektion von DNA-Methylierung.....	12
1.5 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Patientenkollektiv	16
2.1.2 Zelllinien.....	17
2.1.3 Primer	18
2.1.3.1 <i>Primer für MIRA-PCR.....</i>	<i>18</i>
2.1.3.2 <i>Primer für quantitative Methylierungsanalysen</i>	<i>18</i>
2.1.3.3 <i>Fusionsprimer für Next-Generation Bisulfitsequenzierung</i>	<i>20</i>
2.1.3.4 <i>Primer für quantitative Expressionsanalysen</i>	<i>21</i>
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	21
2.1.5 Analyse- und Versuchssysteme (Kits).....	22

2.1.6	Enzyme	22
2.1.7	Antikörper	23
2.1.8	Chemikalien.....	23
2.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.10	Geräte und Zubehör	24
2.1.11	Software	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Versuchsschema	26
2.2.2	Gewebeproben.....	27
2.2.2.1	<i>Anfertigung von Gefrier- und Paraffinschnitten.....</i>	<i>27</i>
2.2.2.2	<i>Hämatoxylin-Eosin Färbung und Bestimmung des Tumorzellanteils</i>	<i>27</i>
2.2.2.3	<i>Mikrodissektion von Gewebeschnitten</i>	<i>28</i>
2.2.3	Nukleinsäureextraktion aus Gewebematerial und Zelllinien	29
2.2.3.1	<i>DNA-Isolation.....</i>	<i>29</i>
2.2.3.2	<i>RNA-Isolation.....</i>	<i>29</i>
2.2.4	Microarrayanalysen	30
2.2.4.1	<i>Ultraschallbehandlung von DNA</i>	<i>30</i>
2.2.4.2	<i>Anreicherung methylierter DNA.....</i>	<i>31</i>
2.2.4.3	<i>Fluoreszenzmarkierung von DNA</i>	<i>32</i>
2.2.4.4	<i>CpG-Island Microarray Hybridisierung</i>	<i>33</i>
2.2.4.5	<i>CpG-Island Microarray Auswertung</i>	<i>34</i>
2.2.5	Bisulfitkonvertierung von DNA für die Methylierungsanalysen	36
2.2.5.1	<i>Bisulfitbehandlung.....</i>	<i>36</i>
2.2.5.2	<i>Kontrollen und Standards.....</i>	<i>37</i>
2.2.6	Methylierungsanalysen mit q-MS-PCR	38
2.2.6.1	<i>Design methylierungsspezifischer Primer</i>	<i>38</i>
2.2.6.2	<i>Quantitative methylierungsspezifische PCR.....</i>	<i>39</i>
2.2.6.3	<i>Effizienzbestimmung der q-MS-PCR.....</i>	<i>40</i>
2.2.7	Methylierungsanalysen mit Next-Generation Bisulfitsequenzierung	40
2.2.7.1	<i>Primerdesign der Fusionsprimer</i>	<i>40</i>
2.2.7.2	<i>Amplifikation der DNA zur Kopplung der Fusionsprimern.....</i>	<i>42</i>
2.2.7.3	<i>Produktaufreinigung und Probenpool für die Sequenzierung</i>	<i>42</i>
2.2.7.4	<i>Auswertung der Sequenzdaten</i>	<i>43</i>
2.2.8	Expressionsanalysen.....	43
2.2.8.1	<i>Reverse Transkription und quantitative realtime PCR (q-PCR)</i>	<i>43</i>
2.2.8.2	<i>Immunhistochemie.....</i>	<i>45</i>
2.2.9	Kultivierung und Cisplatinbehandlung von Zellen.....	46

2.2.9.1	<i>Auftauen von Zellen</i>	47
2.2.9.2	<i>Kultivierung zur Vermehrung</i>	47
2.2.9.3	<i>Kultivierung unter Cisplatin</i>	47
2.2.9.4	<i>Ernten der Zellen für DNA und RNA Isolierung</i>	48
2.2.10	Statistische Verfahren	48
3	Ergebnisse	49
3.1	CpG-Island Microarrayanalysen	49
3.1.1	Anreicherung methylierter DNA aus Ovarialkarzinomen.....	49
3.1.2	Microarray-Hybridisierung und deren Qualität	53
3.1.3	Detektion differentiell methylierter Regionen	56
3.2	Etablierung der quantitativen methylierungsspezifischen PCR	60
3.2.1	Ausbeute und Effizienz der Bisulfitbehandlung.....	60
3.2.2	Etablierung methylierungsspezifischer Primer.....	61
3.2.3	Effizienz der quantitativen methylierungsspezifischen PCR	63
3.3	Validierung der Microarrays und differentiell methylierten Regionen	64
3.3.1	Validierung mit quantitativer methylierungsspezifischer PCR	64
3.3.2	Aufklärung der CpG-Methylierung mittels Next-Generation Sequencing	65
3.4	Marker für die Prognose des Ovarialkarzinoms	68
3.4.1	Prognostische Wertigkeit der differentiell methylierten Regionen	68
3.4.2	Methylierung in FFPE-Gewebe von Primärtumoren und Rezidiven	73
3.5	Korrelation der DNA-Methylierung mit der Expression	75
3.5.1	Expression auf Transkriptionsebene	75
3.5.2	Expression auf Translationsebene	78
3.6	DNA-Methylierung in Zelllinien und prädiktiver Wert von CAMK2N1	81
4	Diskussion	85
4.1	Methodik der Methylierungsanalysen	85
4.1.1	Patienten- und Probenkollektiv.....	85
4.1.2	Anreicherung methylierter DNA und Microarray-Hybridisierung.....	86
4.1.3	Validierung mit quantitativer methylierungsspezifischer PCR	88
4.1.4	Next-Generation bisulfit-Sequenzierung.....	89

4.2	Identifizierung und Validierung differentiell methylierter Regionen	89
4.3	Marker im FFPE Gewebe.....	91
4.4	Korrelation von DNA-Methylierung und Expression.....	92
4.5	Wertigkeit der prognostischen Marker für das EOC	94
4.6	Prädiktiver Wert von CAMK2N1.....	97
4.7	Schlussfolgerungen	98
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	99
6	Anhang	116
	Anhang für den wissenschaftlichen Teil	116
	Danksagung.....	117
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	118

Zusammenfassung

Aufgrund fehlender Früherkennung ist die erfolgreiche Behandlung mittels Operation und anschließender Chemotherapie entscheidend für die Prognose des epithelialen Ovarialkarzinoms (EOC). Nur der Resektionsstatus kann derzeit als Prognosefaktor genutzt werden. Für eine individuelle Behandlung notwendige zusätzliche, unabhängige prognostische und prädiktive Marker sind bis heute nicht etabliert. In den letzten Jahren wurde nach Markern auf Grundlage von Kopiezahlveränderungen (LOH), Mutationen (vor allem *BRCA*, *TP53*) und Genexpressionsprofilen gesucht. Auch epigenetische Marker waren Ziel vieler Studien. Ausreichend sensitive und spezifische Marker für das EOC, unabhängig von anderen Faktoren, konnten jedoch bis heute nicht gefunden werden. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung und Validierung von epigenetischen Markern auf Basis der DNA-Methylierung mit prognostischer und/oder prädiktiver Wertigkeit für das EOC. Des Weiteren wurde die Auswirkung der Methylierung auf die Expression der Markergene untersucht.

Für die Detektion von differentiell methylierten Regionen (DMR) wurde das DNA-Methylierungsmuster seröser EOC mit unterschiedlicher Prognose (jeweils n=6, ohne/mit Rezidiv innerhalb 3 Jahre), aber identischen klinischen Parametern (FIGO III, R0, pN1, Grading 2/3, Carboplatin-Taxan Chemotherapie) genomweit verglichen. Methylierte DNA aus Gefriermaterial wurde mittels „Methylated CpG Island Recovery Assay“ angereichert und vergleichend auf Agilent CpG-Island Microarrays hybridisiert. Eine Auswahl der 220 identifizierten DMR wurde an einem erweiterten Probenet (48 Patientinnen mit/ohne Rezidiv innerhalb 3 Jahre: n=30 / n=18) mittels quantitativer methylierungsspezifischer PCR (q-MS-PCR) untersucht, um Marker mit prognostischer Wertigkeit zu identifizieren. Weiterhin wurden auf demselben Weg parental sensitive und cisplatinresistente Zelllinien untersucht, um prädiktive Marker zu finden. Das Methylierungsmuster der validierten Marker wurde abschließend mit Next-Generation Bisulfidsequenzierung hochauflösend aufgeklärt. Expressionsanalysen gaben Aufschluss über die Auswirkungen der DNA-Methylierung auf die Transkript- und Proteinmenge in den jeweiligen Proben.

Die Microarraydaten konnten mittels q-MS-PCR in 35 von 37 der interessantesten DMR an identischer DNA erfolgreich bestätigt werden. Im Validierungsset wurden im Bereich der Gene *RUNX3*, *KATNAL2*, *ATL1*, *CAMK2N1*, *KRT86* und *ATOH8* Regionen der CpG-Inseln identifiziert, die in Abhängigkeit von der Prognose zum Teil signifikant unterschiedlich methyliert sind ($p < 0,05$). Kombinationen der Markergene konnten jedoch hoch und höchst signifikant ($p < 0,01$ / $p < 0,001$) die Prognosegruppen unterscheiden und zeigen eine ähnliche Wertigkeit wie der Resektionsstatus ($p = 0,02$). Insbesondere hatte die Methylierung von *RUNX3* / *CAMK2N1* auch im unabhängigen Validierungsset (n=36) prognosti-

sche Bedeutung. Patientinnen mit einer Methylierung von RUNX3 oder CAMK2N1 wiesen ein signifikant kürzeres progressionsfreies Intervall auf ($p < 0,05$). Die Aussagekraft der epigenetischen Markerkombinationen ist zudem unabhängig vom Resektionsstatus, da nach Ausschluss der Patientinnen mit postoperativ makroskopischen Tumorrest (R1) die Signifikanz der Markerkombination erhalten bleibt. Weiterhin konnte die Reproduzierbarkeit der Methylierungsmuster an Paraffingewebe in 82 bis 100 % der Fälle (außer für *ATOH8*) nachgewiesen werden. Die Methylierung im Rezidivgewebe (FFPE-Gewebe) stimmte zudem bei *KATNAL2* und *KRT86* weitestgehend, bei den anderen Genen nicht mit dem jeweiligen Primärtumor überein. Ein Anhalt für einen prädiktiven Wert war daraus nicht erkennbar. Während der *in-vitro* Cisplatinresistenzentwicklung in Zelllinien fand jedoch eine Hypermethylierung von CAMK2N1 statt. Somit könnte die Methylierung dieses Genes neben einer prognostischen, auch eine prädiktive Wertigkeit besitzen. Die Expression der untersuchten Gene war allgemein sehr gering (≤ 1 Kopie/Zelle) und eine signifikante Korrelation der DNA-Methylierung mit der mRNA-Expression konnte nur bei *ATL1* und *ATOH8*, mit der Proteinexpression ausschließlich bei *ATL1* festgestellt werden ($p < 0,05$).

Genomweite Analysen mit anschließender Kandidaten-Validierung ermöglichen die zuverlässige Identifizierung von DNA-Sequenzen mit signifikant unterschiedlicher Methylierung und können so für den Nachweis prognostischer und prädiktiver Marker eingesetzt werden. Die Expression der Gene korreliert nicht immer mit der Methylierung - dies hat aber keinen Einfluss auf die Wertigkeit eines epigenetischen Markers. Die Anwendbarkeit der identifizierten Marker muss jedoch in größeren Studien weiter untersucht werden. Durch epigenetische prognostische und prädiktive Marker könnte es in Zukunft möglich sein, die Therapie des EOC individueller zu gestalten, um das progressionsfreie Überleben oder die Lebensqualität zu verbessern.

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom (OvCa), mit etwa 8.000 Neuerkrankungen pro Jahr, steht nach dem Mamma-, Darm-, Lungen- und Endometriumkarzinom an fünfter Stelle der Krebserkrankungsfälle bei Frauen in Deutschland. Die Erkrankungsraten steigen mit dem Alter kontinuierlich an und erreichen mit dem 75. Lebensjahr ihren Höhepunkt, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren liegt (RKI und GEKID 2012). Das OvCa hat durch die meist späte Diagnose eine schlechte Prognose, sodass ca. 60 % der Patientinnen innerhalb von 5 Jahren nach der Erstdiagnose sterben. Pro Jahr erliegen in Deutschland über 5.500 Frauen dieser Krankheit. Mehr als die Hälfte der Karzinome (59 %) wird erst in den Stadien T3 / FIGO III und höher, bei welchen bereits Metastasen außerhalb des Beckens vorhanden sind, diagnostiziert. Nur 29 % werden, meist zufällig, in frühen Stadien (T1 / FIGO I) entdeckt (RKI und GEKID 2012). In diesen Fällen beträgt die 5-Jahres Überlebensrate über 80 % (Heintz *et al.* 2006).

Die Erkrankungsfälle nahmen in den letzten 20 Jahren stetig ab, jedoch konnte die Sterberate kaum gemindert werden (RKI und GEKID 2012). Im weltweiten Vergleich sind die altersstandardisierten Inzidenzen (je 100.000) für das OvCa in den westlichen Industriestaaten (Europa 4,3 – 14,9; USA 4,8 – 12,3) (Curado *et al.* 2007) deutlich höher als in Entwicklungsländern (Afrika 2,1 – 8,1) (Curado *et al.* 2007) und dem weltweiten Durchschnitt (6,3) (Ferlay *et al.* 2010).

1.1.2 Pathologische und histologische Einteilung

Von den Tumoren des Ovars sind 90 % maligne Karzinome die vom Epithel ausgehen (EOC – epithelial ovarian cancer). Diese lassen sich weiter in verschiedene histologische Typen einteilen (Tavassoli *et al.* 2003). Das seröse Karzinom ist die häufigste Form (> 50%) gefolgt von endometrioiden, muzinösen und klarzelligen Karzinom (jeweils 5 % – 20 %) (Seidman *et al.* 2004). In den letzten Jahren hat sich neben der histologischen Einteilung die Klassifikation nach Progression und genetischer Instabilität etabliert. Hierbei wird zwischen Typ I (Borderline und low-grade Karzinome) und Typ II (high-grade) unterschieden (Cho und Shih *le* 2009). Die Ausbreitung der Tumore im Körper wird über die FIGO-Klassifikation und den TNM-Status beschrieben.

1.1.3 Tumorentstehung und Risikofaktoren

Wie bei allen nicht virusinduzierten Karzinomen gelten zahlreich über das Genom verteilte Mutationen und Chromosomenaberrationen als initiale Ursache für die Entartung der Zellen (Cancer Genome Atlas Research 2011). Eine virale Immortalisierung durch HPV spielt, zumindest in Westeuropa, keine Rolle (Svahn *et al.* 2013). Neben der Entstehung aus dem Epithel der Ovarien, wird seit ein paar Jahren auch die Schleimhaut der Eileiter, insbesondere der Fibrienenden diskutiert, da bei prophylaktischen Adnexektomien von Frauen mit *BRCA1/2* Mutationen häufig Karzinome des Tubenepithels gefunden wurden (Dubeau 2008, Carlson *et al.* 2008).

Stärkster nicht genetischer Risikofaktor ist vor allem die Zahl der Ovulationen, welcher durch die Anzahl der Schwangerschaften, der Stillzeiten, dem Zeitpunkt der Menopause und der Einnahme von Kontrazeptiva (Ness *et al.* 2000) beeinflusst wird (RKI und GEKID 2012). Je öfter es zur Ovulation kommt, desto größer ist das Risiko an einem OvCa zu erkranken. Angenommen wird, dass die Proliferation der Zellen zur Heilung des durch den Eisprung verletzten Epithels Tumore begünstigt. Des Weiteren haben kinderlose und spätgebärende Frauen sowie Frauen die eine Hormonersatztherapie erhalten haben ein erhöhtes Risiko zu erkranken (Beral *et al.* 2007). Unabhängig von der Tumorentität erhöht zudem Übergewicht das Krebsrisiko (RKI und GEKID 2012).

In genetischer Hinsicht haben, wie beim Mammakarzinom, die Gene *BRCA1* und *BRCA2* eine Bedeutung. Bis zu 15 % der OvCa sind durch Keimbahnmutationen in diesen Genen geprägt und treten familiär gehäuft auf (Pal *et al.* 2005). Das Risiko für die Entstehung eines Karzinoms bei Mutationsträgerinnen steigt bis zum 80. Lebensjahr auf bis zu 54 % (*BRCA1*) bzw. 23 % (*BRCA2*) (King *et al.* 2003). Eine prophylaktische Entfernung der Eierstöcke und Eileiter nach Ende der Familienplanung kann das Risiko einer Erkrankung erheblich senken (Kauff *et al.* 2008). Weitere diskutierte genetische Faktoren sind zum Beispiel Mutationen von Genen in mismatch-Reparaturgenen und Apoptosemechanismen (*TP53*, *PTEN*, *BRCA1/2*, *MLH1*) (Aarnio *et al.* 1999, Landen *et al.* 2008). Neben genetischen Faktoren hat auch die Epigenetik, vor allem die DNA-Methylierung einen wesentlichen Einfluss auf die Karzinogenese (Hanahan und Weinberg 2000). Näheres dazu wird im Abschnitt 1.2 ausführlich erläutert.

1.1.4 Symptome und Diagnose

Die Symptomatik des OvCa ist unspezifisch und tritt erst im fortgeschrittenen Tumorstadium auf. Erste Anzeichen können diffuse abdominale Schmerzen, Probleme beim Stuhlgang, Meteorismus, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit sowie Zunahme des Bauchumfangs sein. 17 % der entdeckten OvCa haben sich bereits regional (FIGO II) und 62 % über die Grenzen des Beckens (FIGO III) ausgebreitet (Jelovac und Armstrong 2011). Eine

Frühdiagnose kleinerer Tumore erfolgt meist zufällig bei anderer Indikation. Die Diagnose für das OvCa wird in erster Linie mittels Tastuntersuchung und Transvaginalsonographie gestellt. Computertomographie und Kernspintomographie kommen für die differentialdiagnostische Abklärung zum Einsatz. Die Klassifikation des Tumorstadiums kann jedoch nur operativ erfolgen (du Bois *et al.* 2009).

Ein geeignetes Screening zur Früherkennung des OvCa ist bis heute nicht etabliert. Zahlreiche Studien befassten sich mit der viel diskutierten regelmäßigen Transvaginalsonographie in Verbindung mit der CA-125 Antigen Bestimmung, was die Mortalität jedoch nicht senken kann (Buys *et al.* 2011). Vor allem der Tumormarker CA-125 ist sehr unspezifisch und auch bei vielen anderen Erkrankungen erhöht (Bast *et al.* 1998).

1.1.5 Therapie und prognostische Faktoren

Das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Operation ist ein bedeutender Prognosefaktor. Die 5-Jahres Überlebensrate hängt signifikant vom Tumorstadium ab. So haben Patientinnen mit FIGO Stadium I eine > 80 %ige und mit FIGO Stadium IV eine nur noch 19 %ige Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren (Heintz *et al.* 2006).

Der wichtigste Prognosefaktor beim epithelialen Ovarialkarzinom (EOC) ist die Qualität der Therapie. Im Vordergrund steht bei allen Tumorstadien die maximale Reduktion der Tumorherde durch eine Operation. Nur bei FIGO IA ist ein fertilitätserhaltendes operatives Vorgehen möglich (Leitlinienprogramm-Onkologie *et al.* 2013). Sobald es zum Tumorkapseldurchbruch kommt oder beide Ovarien befallen sind, ist die verbleibende Tumorlast nach Operation neben dem Tumorstadium der stärkste unabhängige Prognosefaktor, welcher jedoch vom Operateur beeinflussbar ist (du Bois *et al.* 2009). Nur durch die komplette Resektion (makroskopisch tumorfrei – R0) ist eine deutlich bessere Prognose zu erzielen (du Bois *et al.* 2009). Weitere wichtige Prognosefaktoren sind der Differenzierungsgrad der Tumoren, das Alter sowie der Allgemeinzustand der Patientinnen. Auch der histologische Typ lässt auf die Malignität eines Tumors schließen. So hat das muzinöse EOC in der Regel eine schlechtere Prognose (du Bois *et al.* 2009). Nach der OP erfolgt eine Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel (ausgenommen FIGO IA, Grading 1) entsprechend dem Leitlinienprogramm Onkologie (Bois *et al.* 2005, Leitlinienprogramm-Onkologie *et al.* 2013), da bereits ab dem FIGO Stadium I, Grading 2 die Patientin durch Chemotherapie eine deutlich bessere Überlebenschance hat (Trimbos *et al.* 2003). Platin-basierte Chemotherapeutika binden an die DNA, verursachen Punktmutationen und DNA-Addukte, woraus eine Replikationshemmung, Apoptose oder die Aktivierung des DNA-Reparatursystems resultiert (Siddik 2003). Paclitaxel, ein trizyklisches Diterpen aus der Pazifischen Eibe, bindet an β -Tubulin und verhindert den Abbau von Mikrotubuli, was die Mitose verhindert und zur Apoptose führt (Manfredi und Horwitz

1984, Ke *et al.* 2004). Zusätzlich kann ab FIGO IIIB der VEGF-Inhibitor Bevacizumab gegeben werden, wodurch das mediane progressionsfreie Überleben von 10,3 auf 14,1 Monate steigt (Burger *et al.* 2011). Eine suboptimale Therapie lässt die Überlebenschance enorm sinken (Bois *et al.* 2005).

Auf die adjuvante Chemotherapie nach der Operation sprechen die meisten Patientinnen mit einer kompletten Remission an, bekommen aber trotzdem häufig ein Rezidiv innerhalb eines medianen Zeitraums von 18 Monaten (Greenlee *et al.* 2001). Für platinresistente Patientinnen ist eine erneute platinhaltige Kombinationstherapie (Leitlinienprogramm-Onkologie *et al.* 2013) von entscheidender Bedeutung und erhöht das rezidivfreie und gesamte Überleben (Pfisterer *et al.* 2006, Gladiëff *et al.* 2012). Bei einigen Frauen kommt auch eine Operation mit Ziel der kompletten Resektion in Frage (Gordon *et al.* 2004). Patientinnen mit platinresistenten Tumoren / Rezidiven profitieren eher von einer Monotherapie welche zur Steigerung der Lebensqualität ausgerichtet ist (Bois *et al.* 2009, Main *et al.* 2006). Die Qualitätserhebung zur Rezidivtherapie im Rahmen des Aktionsprogramms der AGO Kommission OVAR (Bois *et al.* 2009) machte deutlich, dass die richtige Wahl der Therapie auch bei Progression und Rezidiv entscheidend für das weitere Überleben und die Lebensqualität der Patientinnen ist. Bei dieser Studie erlitten nach einer leitliniengerechten Primärtherapie 68 % der Patientinnen ein Rezidiv, von denen 30 % platinresistente bzw. –refraktäre (Rezidiv innerhalb 6 Monaten nach oder während Chemotherapie) Tumoren waren. Rezidive von platinresistenten Primärtumoren (70 %) traten zu 16 % zwischen 6 und 12 Monaten und zu 23 % nach 12 Monaten auf. Rund ein Drittel der Patientinnen blieb in einem medianen Beobachtungszeitraum von 51 Monaten rezidivfrei (Bois *et al.* 2009). Die primäre und erworbene Resistenz gegen platinhaltige Chemotherapeutika stellt somit neben der generellen schlechten Prognose die zweite Eigenschaft des EOC dar, welche zu der starken Malignität dieser Krebsart führt. Trotz Cisplatinbehandlung wird bei einem resistenten Phänotyp die Apoptose inhibiert. Die Tumorzellen verringern die Platinwirksamkeit durch Kontrolle des Membrantransportes, Endo- und Exocytose sowie durch Entgiftung über Glutathion und Metallothioneine oder reparieren verstärkt platinbedingte DNA-Schäden und nutzen Polymerasen die DNA-Schäden tolerieren (Siddik 2003, Galluzzi *et al.* 2012). Weiterhin können durch genetische und epigenetische Veränderungen die platinabhängigen und –unabhängigen apoptotischen Signalwege gestört werden (Galluzzi *et al.* 2012, Shen *et al.* 2012).

1.1.6 Prognostische und Prädiktive Marker

Neben dem Tumorstadium, der Resektionsgüte und dem Vorliegen erblich bedingter Tumore (*BRCA1/2* Mutationen) gibt es keine prätherapeutische prognostische und prädiktive Marker, welche die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs oder das Therapieansprechen vor-

aussagen können. Lediglich die Normalisierung des prätherapeutisch erhöhten CA-125 Spiegels ist ein angewendeter Marker für das Therapieansprechen und das Überleben (Mogensen 1992). Um die First-Line-Chemotherapie dem Verlauf der Krankheit besser anpassen zu können und somit die Lebensqualität und das Überleben zu verbessern, werden Marker benötigt, die anhand des Primärtumors das Progressionsverhalten (Prognose) und das Ansprechen auf Chemotherapie (Prädiktion) vorhersagen können. Beeinträchtigende Nebenwirkungen durch nicht wirksame Therapien könnten dadurch vermieden werden.

In den letzten Jahren beschäftigten sich zahlreiche Studien mit verschiedenen Möglichkeiten die Prognose und Prädiktion zu verbessern. Dabei sind verschiedene Marker auf Grundlage von DNA-Kopiezahlveränderungen (LOH) (Wang *et al.* 2012), Mutationen (*BRCA1/2*) (Tan *et al.* 2008) und Genexpression (Konstantinopoulos *et al.* 2011, Volkmann *et al.* 2013) untersucht worden. Jedoch fehlen die zur Validierung nötigen größeren Studien. Die am häufigsten analysierten Gene im Zusammenhang mit dem OvCa ist das *Tumorprotein 53* Gen (*TP53*) und das *Breast Cancer 1* und *2* Gen (*BRCA1/2*). Ein durch Mutationen verändertes p35 Protein verliert zum einen seine tumorsuppressiven proapoptotischen Eigenschaften und begünstigt zugleich den Krebs als Onkogen (Brachova *et al.* 2013). Einen Einfluss auf die Prognose und vor allem das Therapieansprechen hat p53 in Zusammenhang mit BCL-2 und BAX (Ziolkowska-Seta *et al.* 2009). Patientinnen mit *BRCA*-Mutationen (Häufigkeit 15 %) haben einen Vorteil im 3-Jahres-Überleben und sprechen besser auf platinbasierte First-Line- und Rezidiv-Chemotherapie an (Tan *et al.* 2008, McLaughlin *et al.* 2013). Begünstigt wird die Therapie bei diesen Patientinnen außerdem durch Wirkung von PARP Inhibitoren, wodurch Einzelstrangbrüche nicht repariert werden, Doppelstrangbrüche entstehen und bei *BRCA* Mutationen zum Zelltod führen (Fong *et al.* 2010).

1.2 Epigenetik

1.2.1 Allgemeines

Die Epigenetik bezeichnet mitotisch und meiotisch vererbare Modifikationen der DNA, Chromosomen und im Allgemeinen der Genexpression, welche reversibel sind und nicht mit einer Änderung der genomischen DNA-Sequenz einhergehen (Egger *et al.* 2004, Bird 2007). Epigenetische Veränderungen spielen neben genetischen Einflüssen eine wichtige, zum Teil initiale Rolle bei der Entstehung und Ausprägung von Krankheiten, insbesondere Krebserkrankungen, wie dem OvCa (Egger *et al.* 2004, Michaelson-Cohen *et al.* 2011). Die Hauptmerkmale der Epigenetik sind die Regulation der Genexpression durch Histonmodifikationen, DNA-Modifikationen und micro-RNA (miRNA) (Delcuve *et al.* 2009).

Bei der Repression der Genexpression durch miRNA werden bereits transkribierte Gene durch die Bindung von spezifischer miRNA an die 3' untranslatierte Region der mRNA und die Rekrutierung von Proteinkomplexen (miRNA-induced silencing complex - RISC) abgebaut (Bartel 2004). Die Verbindung dieses nicht direkt vererbaren Mechanismus mit der Epigenetik ergibt sich durch die Regulierung der miRNA Expression durch DNA-Methylierung sowie umgekehrt, die Regulation von Histonmodifikationen und DNA-Methylierung durch miRNA's (Chuang und Jones 2007). Ein weiterer epigenetischer Mechanismus ist die Histonmodifikation durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und weiteren Veränderungen (Kouzarides 2007). Bestimmte acetylierte Lysine führen zur Genaktivierung durch Dekondensation des Chromatins und somit zur Zugänglichkeit für RNA-Polymerasen. Die Methylierung bestimmter Lysine hingegen unterdrückt die Genexpression durch Kondensation des Chromatins über Remodelling-Proteinkomplexe. Der durch diese Modifikationen gebildete „Histon-Code“ steht im direkten Zusammenhang mit der Genaktivität (Strahl und Allis 2000).

1.2.2 DNA-Methylierung

Der am besten verstandene und am häufigsten untersuchte Mechanismus der Epigenetik ist die DNA-Methylierung und deren Auswirkungen. Durch DNA-Methyltransferasen (DNMT's) werden Cytosine an fünfter Position des Pyrimidinringes methyliert (Abb. 1.1). Grundlegend erfolgt eine maintenance DNA-Methylierung bei der Replikation der DNA am neu synthetisierten DNA-Strang durch DNMT1 (Espada et al. 2004). Die bei Entwicklungsprozessen der Zellen (Differenzierung, Entartung) wichtige *de novo* Methylierung wird hauptsächlich durch DNMT3a und DNMT3b katalysiert (Okano et al. 1999). Alle DNA-Methyltransferasen arbeiten *in vivo* jedoch zusammen (Kim et al. 2002), sodass ein genomweiter hypomethylierender Effekt nur durch das Ausschalten mehrerer DNMT's erreicht werden kann (Paz et al. 2003).

Im Gegensatz zur Methylierung, deren Mechanismen lange bekannt sind, ist die Demethylierung von 5-Methylcytosin (5mC) erst seit wenigen Jahren erforscht. Dies kann passiv während der Replikation der DNA durch inaktivierte DNMT oder durch 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) (oxidiertes 5mC) inhibierte maintenance Methylierung erfolgen. Eine aktive Demethylierung wird durch Oxidation oder Desaminierung von 5mC und anschließender DNA-Reparatur erreicht (Abb. 1.1) (Bhutani et al. 2011). Die Oxidation von 5mC in 5hmC, 5-Formylcytosin (5fC) oder 5-Carboxycytosin (5caC) wird durch TET Proteine (Guo et al. 2011, Ito et al. 2011), die Desaminierung von 5mC zu Thymin oder 5hmC zu Hydroxymethyluracil (5hmU) durch Activation-induced Cytidin Deaminase (AID) (Bhutani et al. 2010) katalysiert. Anschließend führt eine Basenexzisionsreparatur, z. B. über Thymine-DNA Glycosylase, zum Einbau von Cytosin in die DNA (Cortellino et al.

2011, He et al. 2011). Durch Methylierungs- und Demethylierungsprozesse ist das Epigenom einer Zelle somit nicht statisch sondern sehr variabel.

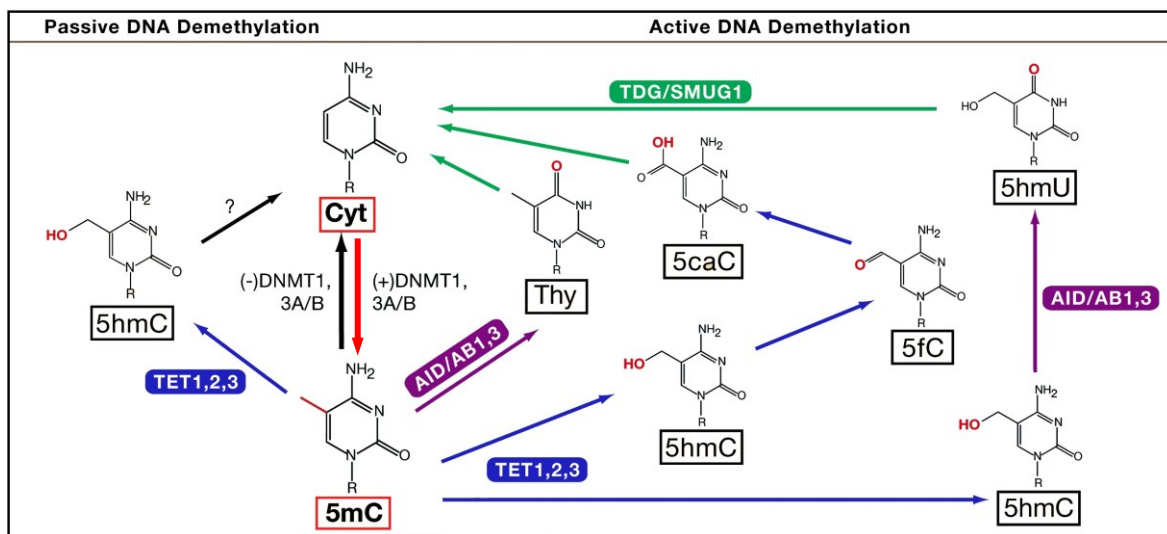


Abb. 1.1 Kreislauf der (De-) Methylierung von Cytosin, nach (Bhutani et al. 2011)

Die Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin (5mC) wird durch DNA-Methyltransferasen katalysiert (roter Pfeil). Bei der passiven Demethylierung (schwarze Pfeile) wird während der DNA-Replikation eine maintenance Methylierung durch inaktive DNMT's oder 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) verhindert. Aktiv kommt es durch Oxidation oder Desaminierung und anschließender Basenexzisionsreparatur (grüne Pfeile, TDG/SMUG1) zum Austausch von 5mC in Cytosin. Die Oxidation der Basen wird von TET Proteinen (blaue Pfeile), Desaminierung von AID/AB1 und 3 Proteinen (lila Pfeile) katalysiert.

Beim Menschen betrifft die Methylierung vorwiegend Cytosine in CpG Dinukleotiden. Nur in pluripotenten Stammzellen wurde bisher eine DNMT3-abhängige und vorwiegend in methylierten CpG-Regionen auftretende Cytosinmethylierung bei nicht-CpG Dinukleotiden gefunden, dessen Funktion aber noch nicht geklärt ist (Ziller *et al.* 2011, Arand *et al.* 2012). CpG's sind im Genom allgemein unterrepräsentiert und ungleichmäßig verteilt. Gehäuft treten sie jedoch in CpG-Inseln (CGIs) auf, welche sich vor allem in den Promotorregionen von ca. 50 % aller humanen Gene befinden (Antequera und Bird 1993). Erstmals wurden CGIs durch Verdau von DNA mit methylierungssensitiver HpaII Restriktionseendonuklease als „HpaII tiny fragments“ entdeckt (Bird 1986). Definiert werden CGIs ab einem GC-Gehalt von > 50 % und einer CpG Frequenz von > 0,6 (observed/expected) bei einer Länge von mindestens 200 bp (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Eine umstrittene stringenter Definition zum Ausschluss von CpG-Regionen in repetitiven Sequenzen wurde 2002 aufgestellt (Takai und Jones 2002).

Die Methylierung der CGIs stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Transkription dar, indem die Bindung von Proteinen an die DNA beeinflusst wird (Bird und Wolffe 1999, Cedar 1988). Zum einen wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren durch Hypermethylierung direkt inhibiert (Watt und Molloy 1988, Jones und Laird 1999), zum anderen binden Methyl-CpG-bindende Proteine wie MeCP2 (Boyes und Bird 1992) oder MBD's (Lopez-Serra *et al.* 2006) spezifisch an methylierte DNA. Außer MBD4 sind alle

Proteine dieser Familie mit Histonacetylasen assoziiert und somit ein Mediator der transkriptionellen Inhibierung durch Chromatinmodifikationen (Nan *et al.* 1998, Ballestar und Wolffe 2001, Ng *et al.* 1999). Die Stilllegung von Genen durch CGI-Methylierung im Promotorbereich ist wahrscheinlich nicht das initiale Ereignis, sondern schützt vorwiegend vor einer Reexpression (Deaton und Bird 2011). Grund für diese Annahme ist, dass ein Gen abgeschaltet bleibt, wenn die zugehörigen Histonmodifikationen entfernt werden (McGarvey *et al.* 2007). Besonders die Methylierung von CpG-Inseln im ersten Exon eines Gens führt zur Unterdrückung der Transkription (Brenet *et al.* 2011). In einzelnen Fällen kann eine Hypermethylierung allerdings auch zur Steigerung der Expression führen, indem Repressorkomplexe nicht mehr an den Promotor binden können (Berletch *et al.* 2008).

Mit den verschiedenen epigenetischen Mechanismen wird neben der Expression einzelner Gene das Imprinting (Allen *et al.* 1990), die X-Chromosom Inaktivierung (Avner und Heard 2001) und die gewebespezifische Differenzierung (Ohgane *et al.* 2008, Schilling und Rehli 2007) gesteuert. Letzteres findet man vor allem in der Embryogenese, wo es durch dynamische Änderung der Methylierung zu einer Veränderung der epigenetischen Information in den Keimbahnzellen und somit zu unterschiedlichen Zelldifferenzierungen kommt (Reik *et al.* 2001). Weiterhin wird DNA-Methylierung in CpG-armen Regionen mit chromosomaler Stabilität in Verbindung gebracht, da durch Methylierung repetitiver Sequenzen die Beweglichkeit von Transposons und homologe Rekombinationsereignisse unterdrückt werden (Pal *et al.* 2010). In diesen Regionen werden außerdem gesunde somatische Zellen durch Methylierung vor der Expression potentiell schädlicher Gene mit viralen Sequenzen geschützt (Herman und Baylin 2003). In den Promotorbereichen der meisten Gene sind die CpG-Inseln regulär unmethyliert, egal ob das betreffende Gen transkribiert wird oder nicht, wohingegen einzeln vorkommende intra- und extragenischen CpG's methyliert sind (Bird 2002).

1.2.3 Das DNA-Methylom in entarteten Zellen

Bei krankhaften und entarteten Zellen kann das Methylierungsmuster deutlich verändert sein. Zum Beispiel sind Fehler bei der Ausprägung des Imprinting und resultierende Krankheitsbilder auf Änderungen der Methylierung zurückzuführen (Horsthemke 2010). Für Parkinson (Jowaed *et al.* 2010), Diabetes (Volkmar *et al.* 2012), Psychosen (Mill *et al.* 2008) und viele andere Krankheiten sind in Verbindung stehende Aberrationen der DNA-Methylierung nachgewiesen worden. Schon 1979 wurde DNA-Methylierung mit Karzinogenese in Verbindung gebracht (Holliday 1979). Heute ist die Bedeutung der DNA-Methylierung bei der Entstehung von Krebs unumstritten und eröffnet neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten. Genomweit beobachtet man eine Hypomethylierung, vorrangig

von CpG-armen Regionen und gleichzeitig eine Hypermethylierung in vielen promotor-nahen CGIs (Herman und Baylin 2003). Die Hypomethylierung außerhalb von CGIs betrifft vor allem repetitive Elemente und die Zentromerregionen, was zur Expression von Transposons und viralen Genen führt, wobei der Mechanismus dieser Demethylierung noch weitgehend unklar ist (Wilson *et al.* 2007). Dies und die Demethylierung von X-chromosomalen und dem Imprinting unterliegenden Genen führt zu genomischer Instabilität, was ein Merkmal von Tumorzellen ist (Herman und Baylin 2003).

Vorwiegend von *de novo* Hypermethylierung in CGIs sind Promotorregionen in Genen betroffen, die in die DNA-Reparatur, Zellzyklusregulation und Apoptose involviert sind und eine große Rolle bei der Karzinogenese und Progression spielen (Esteller 2007). Diese können zum größten Teil als Tumorsuppressorgene klassifiziert werden (Herman 1999, Esteller 2002, Jones und Laird 1999). Bis heute gibt es unzählige Publikationen, die sich mit der Methylierung von Tumorsuppressorgenen bei den verschiedensten Tumorentitäten beschäftigen. Eines der ersten hypermethylierten Tumorsuppressorgene, welches mit Karzinogenese in Verbindung gebracht wurde, ist das Retinoblastomprotein *RB1* (Sakai *et al.* 1991) oder *CDKN2A / p16* (Merlo *et al.* 1995). Ein weiterer Aspekt ist die Aktivierung von Onkogenen wie *HRAS*, *KRAS*, *BCL2* und *MYC* durch deren Hypomethylierung (Singal und Ginder 1999, Costello und Plass 2001). Diese sind in gesunden Zellen durch Methylierung stillgelegt. Bei weiteren Onkogenen ist es durchaus denkbar, dass sie indirekt durch Methylierung von Transkriptionsrepressorgenen aktiviert werden. Die Aktivierung von Onkogenen durch Methylierung der Bindestelle von den eigenen Transkriptionsrepressoren wurde bei der Telomerase gezeigt (Berletch *et al.* 2008).

Für den Mechanismus der *de novo* Methylierung gibt es mehrere Hypothesen. Durch zufällige Methylierung und Selektion könnte es zur Proliferation und Progression von vorteilhaft methylierten Zellen kommen (Jones und Baylin 2007). Eine kontrollierte *de novo* Methylierung ist durch Entfernung schützender Transkriptionsfaktoren, die eine Methylierung verhindern sowie durch den Verlust von strukturellen Chromatingrenzen, wodurch ausgehend von bereits methylierten Sequenzen eine Ausweitung der Methylierung erfolgt, möglich (Turker 2002). Außerdem gibt es Anzeichen für eine targetspezifische *de novo* Methylierung durch die Rekrutierung von DNMT's durch Proteinkomplexe, welche an bestimmte Sequenzmotive binden (Keshet *et al.* 2006). Neben der *de novo* Methylierung von Tumorsuppressorgenen sind auch epigenetische Keimbahnmutationen bekannt, wodurch zum Beispiel das Reparaturgen *MLH1* vererbt methyliert vorliegt und mit Karzinogenese in Verbindung gebracht wird (Suter *et al.* 2004, Gazzoli *et al.* 2002).

Um ein methyliertes Gen wirksam abzuschalten, müssen meist beide Allele inaktiviert sein. Dies kann neben der Methylierung beider Allele auch durch Kombinationen mit Mutation oder Verlust (loss of heterozygosity - LOH) des zweiten Allel geschehen (Grady

et al. 2000). Da eine Methylierung der DNA im Gegensatz zu genetischen Veränderungen, wie Mutationen oder LOH reversibel ist, stellt sie ein Ziel für Therapeutika durch Inhibierung der DNA-Methylierungsmaschinerie dar (Jones und Baylin 2007). Das größte Potential hat die DNA-Methylierung klinisch gesehen jedoch in der Diagnostik und Prognostik, da die Methylierung von bestimmten Genen bei der Karzinogenese häufig schon in sehr frühen Stadien auftritt und tumorspezifisch ist (Wajed *et al.* 2001). Durch das spezifische Methylierungsmuster der Tumorentitäten ist es möglich den Ursprung eines Karzinoms zu bestimmen (Costello und Plass 2001, Esteller 2007). Methylierte Gene haben somit als Biomarker in den verschiedensten Tumorentitäten das Potential für die frühzeitige Diagnose, Prognoseabschätzung und durch den Einfluss von methylierten Genen auf das Ansprechen von adjuvanten Therapien auch als prädiktive Marker (Duffy *et al.* 2009). Neben der Untersuchung von operativ entnommenen Tumorgewebe lassen die spezifischen Methylierungsmuster sogar eine Detektion von freier Tumor-DNA bei großem Hintergrund durch normale DNA im Serum zu (Zhang *et al.* 2013). Viele Tumorentitäten können auch in den entsprechenden Exkreten wie Urin, Stuhl und Sputum nachgewiesen werden (Palmisano *et al.* 2000, Dulaimi *et al.* 2004, Petko *et al.* 2005). Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, dass die Konzentration an freier Tumor-DNA im Blut oder anderen Medien sehr gering ist und großen Schwankungen unterliegt (Jahr *et al.* 2001). Eine sehr aussichtsreiches Screeningverfahren durch Detektion einer Methylierungssignatur ist beim Zervixkarzinom gegeben, bei dem die zu untersuchenden Zellen am Entstehungsort eines möglichen Karzinoms oder dessen Vorstufen über einen einfachen Abstrich analysiert werden können (Hansel *et al.* in-press).

1.3 Epigenetik und epigenetische Marker des Ovarialkarzinoms

Die Epigenetik des OvCa verhält sich wie bei anderen Tumorentitäten (Balch *et al.* 2009). Man findet genomweit eine Hypomethylierung, zum Beispiel der Satellitenregion von Chromosom 1 und repetitiver Elemente wie LINE-1, was zu chromosomaler Instabilität führt und zum Teil einen prognostischen Faktor darstellt (Widschwendter *et al.* 2004, Pattamadilok *et al.* 2008). Die Expression von allgemein karzinogenen und EOC spezifischen miRNA's wurde zuletzt am häufigsten entdeckt. Diese haben neben der Methylierung ebenfalls das Potential als Marker oder therapeutisches Target (Balch *et al.* 2009). Epigenetische Veränderungen auf Basis der CGI-Methylierung, welche möglicherweise Einfluss auf die Karzinogenese, Progression oder Chemoresistenz des EOC haben, sind zahlreich publiziert, aber zum großen Teil nicht genügend validiert (Barton *et al.* 2008, Balch *et al.* 2010, Gloss und Samimi 2012). Es gibt jedoch einige wichtige methylierte Gene die häufig mit signifikanten diagnostischen, prognostischen oder prädiktiven Wert

oder in Zusammenhang mit nachgewiesener tumorsuppressiver oder onkogener Funktion einhergehen (Tab. 1.1) (Gloss und Samimi 2012).

Tab. 1.1 Meist untersuchte epigenetische Marker für das EOC, nach Gloss und Samimi 2012

hypermethyliertes Gen	Marker für / Korrelation mit
Einzelne Tumorsuppressorgene	
<i>BRCA1</i>	PFS und Therapieansprechen
<i>MLH1</i>	schlechter Verlauf, Cisplatinresistenz, gen. Instabilität
<i>HOXA9</i>	OvCa Risiko, aber reverse zu Malignität
<i>RASSF1A</i>	diagnostischer Marker, Malignität
<i>SPARC</i>	Tumorgrad
<i>HIC1</i>	Invasivität
<i>DAPK</i>	sehr Kontrovers
<i>OPCML</i>	diagnostischer Marker, Tumorgrad
<i>CCBE1</i>	verringertes PFS
Wnt Signalweg	
<i>SFRP5</i>	diagnost. Marker, schlechtes Therapieansprechen
<i>FZD4, DVL1, NFATC3, ROCK1, LRP5, AXIN1, NKD1</i>	verringertes PFS, schlechtes Therapieansprechen
TGF-beta Signalweg	
<i>TGFB1</i>	diagnostischer Marker
<i>FBXO32</i>	Tumorgrad, verringertes PFS
PFS, progressionsfreies Überleben	

In nur sehr wenigen Fällen reicht die Sensitivität und Spezifität der Marker aus, um sie klinisch einsetzen zu können, was vor allem auf prognostische und prädiktive Marker zutrifft. Marker mit guter Wertigkeit und hohem Potential für die Diagnose findet man im Tumorgewebe. Bei Einzelgenmarkern konnten Sensitivitäten von 67 % für *DAPK1* (Collins *et al.* 2006), 83 % für *OPCML* (Sellar *et al.* 2003) und 97,5 % für *HOXA9* (Gloss und Samimi 2012) nachgewiesen werden, wobei letzteres eine Falschpositivrate von 8 % aufwies. Hundertprozentige Sensitivität und hohe Spezifität lässt sich nur mit Kombinationen verschiedener methylierter Marker wie *BRCA1 / APC / CDKN1A / DAPK1* (Ibanez de Caceres *et al.* 2004) oder *HOXA9 / EN1 / CA-125-Serumspiegel* (Montavon *et al.* 2012) erreichen. In den diagnostisch relevanten Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma oder Peritonealflüssigkeit haben epigenetische Markersets jedoch immer noch eine zu geringe Sensitivität / Spezifität, z. B. von 90 % / 86,7 % für das Markersets *RASSF1A / CALCA / EP300* (Liggett *et al.* 2011). Da die große Mehrheit der gefundenen Marker neben dem EOC auch typisch für andere Tumorentitäten und Erkrankungen sind, ist die Spezifität für das EOC recht gering. Zum Beispiel ist der Marker *DAPK1*, welcher im Serum von 54 % aller OvCa-Patientinnen als methyliert detektiert wird (Collins *et al.* 2006) nicht spezifisch für Tumorerkrankungen (Hafner *et al.* 2011). Mit dem 12,3-fachen Risiko an einem EOC zu erkranken steht die Methylierung von *HOXA9* im gesunden Endometrium in Zusammenhang, dessen Funktion jedoch noch unklar ist (Widschwendter *et al.* 2009). Für eine Prognose des Krankheitsverlaufs gibt es weitaus weniger Gene die das Potential zu einem epigenetischen Marker besitzen. Vorreiter ist hier die Kombination aus

RASSF1A und *PGR-PROX* welche mit einer Sensitivität von 80 % und Spezifität von 73,3 % OvCa von gutartigen Erkrankungen des Ovars im Plasma unterscheiden kann (Liggett *et al.* 2011).

Bei der Ausprägung eines resistenten Phänotyps spielt wahrscheinlich die DNA-Methylierung und damit verbundene Stilllegung von Genen, die für die Zytotoxizität von Chemotherapeutika unabdingbar sind, eine Hauptrolle (Chang *et al.* 2010). Die Wirkung von Taxanen könnte zum Beispiel durch das Microtubulin-stabilisierende Protein *RASSF1A* unterstützt werden und durch Methylierung zur Resistenz führen (Balch *et al.* 2004). Durch die Beeinflussung von Apoptose- und Reparaturmechanismen nach Cisplatinbehandlung kann ebenso eine Resistenz herbeigeführt werden (Balch *et al.* 2004). Mehrere Studien haben unabhängig voneinander eine Hypermethylierung von *MHL1*, ein Mediator der Apoptose und dessen Einfluss auf das Therapieansprechen und Resistenz gegen Cisplatin nachgewiesen (Strathdee *et al.* 1999, Gifford *et al.* 2004, Zeller *et al.* 2012). Jedoch besitzen nur 25 % der Rezidive eine Methylierung des *HML1*-Gens (Gifford *et al.* 2004). Meist werden die resistenzassoziierten epigenetischen Veränderungen durch Vergleich von resistenten Ovarialkarzinomzelllinien (z. B. A2780) mit deren parental sensitiven Ursprungszelllinien detektiert und die funktionelle Eigenschaft durch Reexpression der Gene und Resensitivierung der Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren der Methylierung (5-Azacytidin) nachgewiesen (Zeller *et al.* 2012, Yu *et al.* 2011).

1.4 Techniken zur Detektion von DNA-Methylierung

Die Untersuchung der DNA-Methylierung kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Das prinzipielle Vorgehen besteht aus der Vorbehandlung der DNA mit methylierungsspezifischen enzymatischen Restriktionsverdau, Natriumbisulfitkonversion oder Affinitätsanreicherung methylierter DNA-Fragmente und anschließender Analyse über Gelelektrophorese, Southern Hybridisierung, (quantitativer) PCR, Microarray-Hybridisierung und (Next-Generation-) Sequenzierung (Laird 2010). Die erste Methode, welche zur Untersuchung von DNA-Methylierung entwickelt wurde, basierte auf der Restriktion der DNA mittels methylierungssensitiver Enzyme (z. B. *Bst*UI, *Hpa*II) (Bird und Southern 1978). Die verdauten DNA wurde anschließend durch Southern-Blot Analysen oder PCR untersucht.

Durch die Einführung der Bisulfitkonversion (Frommer *et al.* 1992) beschränkten sich die Analysen nicht weiter auf einzelne CpG Dinukleotide. Die Behandlung von genomischer DNA mit Natriumbisulfit führt in einer chemischen Reaktion zur Umwandlung von Cytosin in Uracil. Methylcytosin sowie alle anderen Nukleinbasen sind inert gegen Natriumbisulfit (Frommer *et al.* 1992). Konvertierte nicht CpG-assoziierte Cytosine definieren dabei den methylierungsunabhängigen, CpG-assoziierte den methylierungsabhängigen Sequenzunterschied, welcher genutzt werden kann, um das Methylierungsmuster genomweit oder

regional zu untersuchen. Die am häufigsten verwendete Methode zur Aufklärung der Methylierung einer „Region of Interest“ (ROI) ist die Methylierungsspezifische PCR (MSP), bei der mittels methylierungsspezifischer Primer bisulfitbehandelte DNA (bisulfit-DNA) amplifiziert wird (Herman *et al.* 1996). Das Produkt kann anschließend auf einem Agarosegel analysiert werden (Lo *et al.* 1999). Eine quantitative Erfassung der Methylierung erfolgt mit der MethyLight Technologie in einer Real-Time PCR im SybrGreen-Verfahren und / oder unter Verwendung von TaqMan Sonden (Eads *et al.* 2000). Dieses Verfahren eignet sich am besten für die schnelle und sensitive Aufklärung von locusspezifischer DNA-Methylierung in vielen Proben. Weitere Möglichkeiten der Analyse von bisulfit-DNA sind „Combined Bisulphite Restriction Analysis“ (COBRA) (Xiong und Laird 1997), „Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension“ (MS-SNuPE) (Gonzalzo *et al.* 1997) und vor allem die Bisulfitsequenzierung (Frommer *et al.* 1992) und Pyrosequenzierung (quantitativ) (Colella *et al.* 2003) von PCR-Produkten oder klonierter DNA.

Verfahren zur Anreicherung methylierter DNA und deren Detektion wurden 2005 entwickelt. Durch Immunpräzipitation von fragmentierter DNA mit Antikörpern gegen 5-methyl-Cytosin (Methyl-DNA Immunoprecipitation (MeDIP)) und anschließender Microarray-Hybridisierung und PCR konnte Weber *et al.* differentielle DNA-Methylierung in normalen und transformierten Zellen genomweit nachweisen (Weber *et al.* 2005). Im selben Jahr wurde auch die Anreicherung durch Bindung an Methyl-CpG Binding Domain Proteine (MBD2 und MBD3), der Methylated CpG-Island Recovery Assay (MIRA) entwickelt (Rauch und Pfeifer 2005). Neben der Analyse mit PCR wurde auch hier die angereicherte DNA auf Microarrays hybridisiert (Rauch *et al.* 2006). Beide Verfahren nutzen zur Anreicherung magnetische Beads, an welche der 5mC-Antikörper bzw. der MBD-Proteinkomplex gekoppelt ist. Im Vergleich ist die Ausbeute vor allem von dicht methylierten Sequenzen nach der Anreicherung mit dem MIRA höher, sodass mit diesem Verfahren weniger Ausgangs-DNA benötigt wird. Die Sensitivität gegenüber schwach methylierten Regionen kann zudem durch die Salzkonzentration angepasst werden (Robinson *et al.* 2010). Ein weiterer Vorteil ist die spezifische Affinität der MBD's zu mCpG's in doppelsträngiger DNA. Der 5-methyl-Cytosin Antikörper hingegen benötigt denaturierte DNA und bindet auch nicht CpG assoziierte 5-methyl-Cytosine (Jin *et al.* 2010). Die Analyse der methylierten DNA erfolgt bei beiden Anreicherungsverfahren über PCR (MIRA-PCR und MeDIP-PCR), locusspezifische oder genomweite (Next-Generation) Sequenzierung (MeDIP-seq, MIRA-seq) und vor allem über Microarrayanalysen. Eine extrem sensitive Methode zum Nachweis von methylierter DNA wurde von Gebhard und Kollegen entwickelt, wobei die Anreicherung und PCR in mit MBD2-Fusionsproteinen beschichteten Reaktionsgefäßen stattfindet und die Stringenz der Bindung durch die Salzkonzentration gesteuert werden kann (Gebhard *et al.* 2006a).

Die neuen Technologien Next-Generation-Sequenzierung NGS und Microarray-Hybridisierung machen es möglich die Methylierung jedes einzelnen CpG's genomweit zu untersuchen. Erstmals wurde 1999 durch Huan *et al.* ein Microarray in Verbindung mit Restriktionsendonukleasen zur differentiellen methylierungsspezifischen Hybridisierung (DMH) entwickelt (Huang *et al.* 1999). Die Arraytechnologie zur Methylierungsanalyse entwickelte sich rasch weiter und es folgten bisulfit-DNA spezifische Microarrays (Gitan *et al.* 2002), allelspezifische Methylierungsanalysen mit Affimetrix SNP Microarrays (Yuan *et al.* 2006) und beadbasierten Microarrays für bisulfit-DNA (Bibikova *et al.* 2006). Mit der Entwicklung der Anreicherungsverfahren für methylierte genomische DNA (MeDIP, MIRA) und chromosom- bzw. genomweiten CpG-Insel Microarrays (Heisler *et al.* 2005) ist es neben dem Vergleich von zwei Proben mittels DMH auch möglich, viele Proben untereinander durch Hybridisierung der angereicherten methylierten DNA gegen die Ausgangs-DNA und der damit verbundenen Normalisierung zu analysieren (Weber *et al.* 2005, Rauch *et al.* 2006). Die am besten quantifizierende Methode, mit welcher der Methylierungsstatus jedes einzelnen Cytosins allel- und targetspezifisch für viele Proben oder genomweit in einer Analyse detektiert werden kann, ist die Next-Generation-Sequenzierung (NGS), auch „massive parallel Sequencing“ genannt. Einen allgemeinen Überblick der verschiedenen Plattformen für die Anwendung bei Methylierungsanalysen bietet das Review von Peter W. Laird und Zuo *et al.* (Laird 2010, Zuo *et al.* 2009). Die NGS ist, wie auch die Microarray-Hybridisierung, auf alle Hauptprinzipien der Methylierungsanalyse (methylierungsspezifische Restriktion, Natriumbisulfitkonversion und Affinitätsanreicherung methylierter DNA-Fragmente) anwendbar. Durch Anreicherung über methylierungsspezifischen Restriktionsverdau von gDNA erhaltene Produkte können genomweit (Oda *et al.* 2009), oder durch Größenselektion nach Restriktionsverdau von bisulfit-DNA beschränkt auf CpG-Regionen (Meissner *et al.* 2008) sequenziert werden. Durch MIRA oder MeDIP angereicherte methylierte DNA kann ebenfalls ohne (Brinkman *et al.* 2010) oder nach Bisulfitkonversion (Taylor *et al.* 2007) sequenziert werden. Neuere Verfahren nutzen die targetspezifische Anreicherung von bisulfit-DNA über „array capture“ (Hodges *et al.* 2009) oder „padlock probes“ genomweit (Lister und Ecker 2009) oder auf CpG-Regionen beschränkt (Ball *et al.* 2009, Deng *et al.* 2009) mit anschließender Next-Generation-Bisulfitsequenzierung (NGbS). Am weitesten verbreitet ist inzwischen die targetspezifische Bisulfitsequenzierung über sequenzcodierte Fusionsprimer mit dem Roche 454 System (Korshunova *et al.* 2008). Für die Validierung von Ergebnissen aus CpG-Insel Microarrayanalysen und quantitativer methylierungsspezifischer PCR eignet sich dieses System am besten. Die bisulfit-DNA wird dabei mit target- und probenspezifischen Fusionsprimern amplifiziert, an Beads gekoppelt und in ca. 1 Million Microreaktoren auf einer Sequenzierplatte (Pico-Titer-Plate) klonal und parallel in einer Wasser-Öl Emulsion pyro-

sequenziert. Die Nucleotide (dNTP) werden dabei einzeln nacheinander über die Sequenzierplatte gespült. Bei Einbau eines oder mehrere dNTP's wird dies durch die Lichtemission der Pyrosequenzierung in jedem einzelnen Microreaktor detektiert. Die bis zu 500 bp langen Produktsequenzen können den Proben und Targets eindeutig durch den ebenfalls sequenzierten und codierten Fusionsprimer zugeordnet werden (Margulies *et al.* 2005, Roche-Diagnostics-Corporation 2009).

1.5 Zielsetzung

Für das EOC fehlen spezifische prognostische und prädiktive Marker um eine Individualtherapie abhängig vom Rezidivrisiko durchzuführen. Standardmäßig werden die Patientinnen nach Operation des Primärtumors chemotherapeutisch behandelt. Einzig bei nicht vollständiger Resektion des Tumors lässt sich das Auftreten eines Rezidivs mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen. Makroskopisch vollständig resektierte Patientinnen haben ein nicht vorhersehbares Rezidivrisiko. Zudem entwickelt der Tumor bei der Progression sehr häufig eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, wofür es zum heutigen Zeitpunkt noch keine effektiven Marker gibt.

Ziel dieser Arbeit ist es, spezifische Marker auf Basis der DNA-Methylierung für die Vorhersage des Auftretens von Rezidiven und der Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika zu finden. Durch die Etablierung eines Assay zur Anreicherung methylierter DNA Fragmente aus Gefriergewebe sowie Zellkulturen und anschließender vergleichender Hybridisierung auf CpG-Island Microarrays soll genomweit nach spezifischen Markern gesucht werden.

Das zur Verfügung stehende Patientenmaterial der laboreigenen Tumorbank wird in zwei Verlaufgruppen unterteilt, welche sich durch die rezidivfreie Zeit von größer bzw. kleiner als drei Jahren nach operativer Entfernung des Primärtumors unterscheiden.

Die durch genomweite Methylierungsanalysen detektierten Unterschiede in der Methylierung zwischen den Verlaufgruppen der Patientinnen werden anschließend mit quantitativer Methylierungsspezifischer PCR und Next-Generation-Sequenzierung an einem möglichst großen Probenset aus Gefrier- und FFPE-Gewebe validiert. Für die Überprüfung der prädiktiven Marker sollen resistente Zellkulturen bekannter Zelllinien *in-vitro* hergestellt werden. Die Etablierung eines sensitiven und spezifischen Markersets für die Prognose von Progression und Resistenz könnte vielen Patientinnen eine individuellere, wirksamere und zum Teil schonendere Therapie ermöglichen.

Die funktionellen Auswirkungen differentieller Methylierung der etablierten Marker auf die Tumorzellen wird abschließend auf der Ebene der Transkription (RNA Expressionsanalysen mit qPCR) sowie auf Translationsebene (Immunhistochemie) aufgeklärt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Tab. 2.1 Patientenkollektiv mit Gefriergewebe von Primärtumoren (n=48) für Methylierungs- und Expressionsanalysen und deren klinischen und pathologischen Parametern

Tumor Nummer	Alter	Histologie	TNM	FIGO	G	R	CTx	rezidivfreie Zeit [d]
2696 T1a*	54	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	229
6170 Ta	65	ser. pap. AK	pT3b pN0 M1	IV	3	R0	CP/Tax	230
4047 T1a	51	Karzinom	pT3c pN1 Mx	IIIC	3	R0	CP/Tax	238
2099 T1a	54	endomet. AK	pT3c pN0 M1	IV	2	R1	CP/Tax	266
433 T1	54	ser. pap. AK	pT3c pN1 Mx	IIIC	3	R1	CP	321
976 T1a	58	ser. pap. AK	pT3c pN1 Mx	IIIC	2	R1	CP/Tax	346
5342 Ta	64	tubuläres AK	pT3c pN0 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	367
5239 Ta	54	ser. pap. AK	pT3b pN0 M0	IIIB	x	R0	CP/Ge	400
1401 T1a	52	ser. pap. AK	pT3c pN1 M1	IV	3	R1	CP/Tax	401
2127 T1a	59	Adenokarzinom	pT3 pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	406
4574 T1a	42	ser. pap. AK	pT4 pN1 M1	IV	3	R0	CP/Tax	413
2467 T2	59	ser. pap. AK	pT3c pN0 M0	IIIC	2	R0	CP/Tax	420
5228 Ta	60	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	2	R0	CP/Tax	447
5006 T2	52	ser. pap. AK	pT3c pN1 Mx	IIIC	3	R1	CP/Tax	450
4913 Ta*	59	ser. pap. AK	pT3c pN0 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	457
5276 T	62	endomet. AK	pT3 pN1 M0	IIIC	2	R1	CP/Tax	463
4594 T1a*	50	ser. pap. AK	pT3c pN1 Mx	IIIC	2	R1	CP/Tax	466
4514 T	63	ser. pap. AK	pT3c pN0 M0	IIIC	2	R1	CP/Tax/Top	548
5214 Ta	60	ser. pap. AK	pT2a pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	553
5713 T	79	Karzinom	pT3c pN1 M0	IIIC	4	R0	CP/Tax	596
2011 T1	59	ser. pap. AK	pT3b pN0 M0	IIIB	3	R0	CP/Tax	629
1743 T	51	endomet. AK	pT3 pN1 M0	IIIC	3	R1	CP/Tax	676
6080 Ta	53	ser. pap. AK	pT3b pN0 M0	IIIB	3	R0	CP/Tax	738
1477 T1	53	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	754
1751 T1	58	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	3	R1	Cis	769
4797 T2	50	ser. pap. AK	pT3c pN1 M1	IV	2	R0	CP/Tax	912
3411 T1	74	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	2	R0	CP/Tax	928
3039 T1	61	ser. pap. AK	pT3b pN1 Mx	IIIC	3	R1	CP/Tax	982
2854 T1	46	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	2	R0	CP/Tax	1009
4575 T2a*	59	ser. pap. AK	pT3c pN1 Mx	IIIC	2	R0	CP/Tax	1021
4803 T2a	41	Adenokarzinom	pT3c pN1 Mx	IIIC	3	R0	CP/Tax	1299 ⁱ
4801 Ta	57	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	1302 ⁱ
6153 Ta	48	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	1391 ⁱ
5746 T	55	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	2	R0	CP/Tax	1431 ⁱ
5834 Ta	58	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	1547 ⁱ
5531 Tb	55	ser. pap. AK	pT3c pN0 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	1620 ⁱ
4168 T	51	Karzinom	pT2a pN1 M0	IIIC	2	R0	CP/Tax	1839 ⁱ
5171 T*	73	ser. pap. AK	pT3b pN1 Mx	IIIC	3	R0	CP/Tax	2155 ⁱ
3764 T1a*	46	ser. pap. AK	pT3c pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	2210 ⁱ
3573 T2a	38	ser. pap. AK	pT2a pN1 M0	IIIC	2	R0	CP/Tax	2326 ⁱ
3385 T1	49	Karzinom	pT3c pN1 M0	IIIC	3	R1	CP/Tax	2362 ⁱ
4349 T2a	58	ser. pap. AK	pT3c pN0 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	2615 ⁱ
3927 T1	44	Karzinom	pT2b pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax/Top	2671 ⁱ
4459 T1a	54	ser. pap. AK	pT3 pN1 Mx	IIIC	3	R0	CP/Pac	2797 ⁱ

Fortsetzung Tab. 2.1 – Patientenkollektiv mit Gefrierewebe

Tumor Nummer	Alter	Histologie	TNM	FIGO	G	R	CTx	rezidivfreie Zeit [d]
2340 T1a	63	ser. pap. AK	pT2b pN1 M0	IIIC	3	R0	CP/Tax	2919 ⁱ
3026 T1a	55	ser. pap. AK	pT3a pN1 Mx	IIIC	3	R0	CP/Tax	3881 ⁱ
2744 T1a	59	ser. pap. AK	pT3b pN1 Mx	IIIC	2	R0	CP/Tax	3929 ⁱ
23 T1a	59	ser. pap. AK	pT3c pN0 M1	IV	x	R0	Cis	3966 ⁱ

Für genomweite CpG-Insel Microarrayanalysen verwendete Gewebe sind fett markiert. RNA stand für mit * markierte Tumoren (n=6) nicht zur Verfügung. Die rezidivfreie Zeit bezieht sich auf das Biopsie-Datum, ⁱ auf die letzte Information bei rezidivfreien Patientinnen. Abkürzungen: endomet., endometrioides; pap., papilläres; AK, Adenokarzinom; CTx, Chemotherapie; CP, Carboplatin; Cis, Cisplatin; Ep, Epirubicin; Tax, Taxan; Top, Topotecan)

Tab. 2.2 Patientenkollektiv mit FFPE-Gewebe (n=22) für Methylierungsanalysen und Immunhistochemie

Tumor-Nr. Gefrierewebe	Alter	FFPE Gewebe				PT - Rez [d]
		PT / Rez	Befund-Nr.	Block-Nr.	Ursprung	
4047 T1a	51	PT	32396/00	I1(5)	Uterus, Adnexe	
		Rez 1	20961/01	(1)	Scheide	251
		Rez 2	4955/02	2(3)	Scheide	440
		Rez 3	13882/02	(1)	Leiste	534
976 T1a	58	PT	19760/96	II3(2)	Ovar	
		Rez 1	25233/98	II	Lymphknoten	793
		Rez 2	22571/99	I1(3)	Serosa	1128
2011 T1	59	PT	31289/97	III(3)	Adnexe	
		Rez 1	22516/99	II(1)	Lymphknoten	644
2127 T1a	59	PT	2717/98	II(4)	Ovar	
		Rez 1	6815/99	II(I)	Lymphknoten	413
4913 Ta	59	PT	8391/03	III6(2)	Ovar	
		Rez 1	19026/04	II(1)	Mesentrium	526
5214 Ta	60	PT	2780/04	(3)	Ovar, Adnexe	
		Rez 1	18307/05	III(1)	Fossa lumbosacralis	581
5239 Ta	54	PT	5073/04	IV1(4)	Ovar	
		Rez 1	12879/06	(1)	Dünndarm	841
6080 Ta	53	PT	7050/07	SS	Adnexe	
		Rez 1	8485/09	II(3)	Bauchnetz	755
433 T1	54	PT	26428/95	I1(1)	Uterus, Adnexe	
4594 T1a	50	PT	2590/02	IV1(1)	Ovar	
6170 Ta	65	PT	11950/07	III(1)	Ovar	

Die Parameter der Patientinnen sind über die Tumornummer des Gefriergewebes in Tab. 2.1 einzusehen. PT, Primärtumors; Rez, Rezidiv

2.1.2 Zelllinien

Tab. 2.3 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	bezogen von
Hey (DNA)	EOC (papilläres Zystadenokarzinom) aus Xenograft (HX-62)	AG Prof. Meinhold-Heerlein, Universitätsklinikum Aachen
SKOV3	Ascites (klarzelliges Adenokarzinom)	DKFZ Heidelberg
A2780	seröses Ovarialkarzinomgewebe	Universitätsfrauenklinik München
Keratinocyten	Vorhaut	laboreigene Kultur FK09-12 / 09-17

2.1.3 Primer2.1.3.1 *Primer für MIRA-PCR***Tab. 2.4** Verwendete Primer für MIRA-PCR von Sigma

Primername	Oligosequenz	Produktgröße	Ta
APC-F	GAGGAAGGTGAAGCACTCAGTT	338 bp	60 °C
APC-R	AGGGTGAGACATGGAGAGAAGA		
SNRPN-F	TACATCAGGGTGATTGCAGTTCC	126 bp	60 °C
SNRPN-R	TACCGATCACTTCACGTACCTTCG		
XIST-F	CACGTGACAAAAGCCATG	178 bp	60 °C
XIST-R	GGTTAGCATGGTGGTGGAC		

F, Forward; R, Reverse; Ta, Annealingtemperatur

2.1.3.2 *Primer für quantitative Methylierungsanalysen***Tab. 2.5** Verwendete MS-Primer für q-MS-PCR von Sigma, MWG

Primername	Oligosequenz	Produktgröße	Ta
ACTB-gDNA-F	GTGATGGAGGAGGCTCAGCAAGT	125 bp	61 °C
ACTB-gDNA-R	TGGGACCTGCTCCTCCCTTG		
ACTB-M-F	TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT	133 bp	61 °C
ACTB-M-R	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA		
ATF7IP2-M-F	TTAGTATTGTTAACGGTTGCGGTTT	173 bp	61 °C
ATF7IP2-M-R	CCGAAACCTCCGAAACCG		
ATL1-M-F	AATTGCGTTTAGCGCGGGTAC	89 bp	61 °C
ATL1-M-R	CGATAAAACGCTATCACTACGCTCG		
ATOH8-M-F	TTTAGTTTTCGGCGTTTTTTGTTTC	108 bp	63 °C
ATOH8-M-R	AACCTTACCGACCTCTCGATAACG		
CAMK2N1-M-F	TAGTCGTTGGTCGATTGATTC	184 bp	60 °C
CAMK2N1-M-R	AACCTCGATCGACTACCG		
CAMK2N1-M-F	TAGTCGTTGGTCGATTGATTC	132 bp	58 °C
CAMK2N1-M-R2	AAAACGAAACTAAATCGAAACG		
CLEC4G-M-F	TAGTTACGACGTGGGGTACGGTTC	264 bp	61 °C
CLEC4G-M-R	GTCCGCACTAAACTATTCCGAACG		
CSPG5-M-F	GTTTAGTTATTCGTAGGGTCCGGGGC	235 bp	61 °C
CSPG5-M-R	AAACCTAAACGATCGACTTCGC		
DSC3-M-F	GCGGTTTCGTTAGAGCGTAGC	231 bp	61 °C
DSC3-M-R	CGCCCTAAACGCTACACGA		
EMILIN2-M-F	GAGCGGTATCGTTTTCGGC	107 bp	61 °C
EMILIN2-M-R	CGAAACTCAAACGAAAATTCCG		
FAM194A-M-F	GCGTTTTGGTTGGGTACGAAC	107 bp	61 °C
FAM194A-M-R	ATCACGAACATCGATAACTACGACG		
GRIK7-M-F	CGTTGTTTTCGTTCCGGGATTC	251 bp	61 °C
GRIK7-M-R	AACGTCCGACAACGACTATATCTCG		
GRLF1-M-F	GTTGTATCGATCGTATCGCGGTC	203 bp	61 °C
GRLF1-M-R	CGCTACTTTCCCGAAAACAACG		
HNRNPH1-M-F2	ACGTTTCGCGTTTCAAGTTATTC	282 bp	61 °C
HNRNPH1-M-R2	CCGAACGCAAAAACCGACG		
HPDL-M-F	CGTTGTAGGGAGAATCGC	200 bp	60 °C
HPDL-M-R	CGACCATAACGCTCTAAACG		
HSF4-M-F2	GTTATTCGGTGTGGACGTTTTTC	147 bp	61 °C
HSF4-M-R2	ACGCTTACGTCCACGAAAACG		

Fortsetzung Tab. 2.5 - Verwendete MS-Primer für quantitative methylierungsspezifischen PCR

Primername	Oligosequenz	Produktgröße	Ta
KATNAL2-M-F KATNAL2-M-R	TTATTGTTGTTGCGGGACGATTTC AAATTTAACACCTCGACCGAACG	109 bp	61 °C
KRT86-M-F KRT86-M-R	TTTAGTTACGGGGTTCGGC GCCACCGCGAAAACACTACTAACG	256 bp	62 °C
KRT86-M-F2 KRT86-M-R	TTAGGTCGCGGTTGCGTTTGAC GCCACCGCGAAAACACTACTAACG	72 bp	62 °C
LMX1B-M-F LMX1B-M-R	GGAGAGTATTTGGAAGTCGTTTGC ATTAACCGATCTCGAATCCTTCG	298 bp	61 °C
LRRC41-M-F LRRC41-M-R	TTGGTTTTCGGAATTTTCGATTTTC GAACCGATAAACACGATAACCCG	167 bp	61 °C
MECOM-M-F MECOM-M-R	CGTATTTTGTGCGTTTTCGAAATC ACGTCTCCGAAATAAATCGTCCG	136 bp	61 °C
MSC-M-F MSC-M-R	TATTCGGGTACGTTTACGGGC GTAAAACGCAACTACGCCTCG	261 bp	61 °C
PAX2-M-F PAX2-M-R	TTGCGTTTAGATTTTCGGGC ACGCGAACGAATCTCTACCG	167 bp	61 °C
PDE4D-M-F PDE4D-M-R	GTTGTTGTTGTTGTTGTCGTCGTC CCTCTAACGAAACCGAACACCG	229 bp	66 °C
PROM1-M-F PROM1-M-R	GAAGGAGTGCCTTATGTTTCGC AACGACGACAACGATAACTAAAACG	126 bp	61 °C
PROX1-M-F PROX1-M-R	TATTACGACGTTTTTCGGTTTTGC CAAATACTACGACTACCGCGACG	245 bp	61 °C
RASGRP2-M-F RASGRP2-M-R	CGGTTAGCGAGGTTGGTC AATACGTCCCACGACGAAAC	154 bp	60 °C
RBP1-M-F2 RBP1-M-R2	CGGATGATTATATGGTTATCGTTTTGTAC GAAAACCCTAACAATATTCGCGAACG	210 bp	61 °C
RCOR2-M-F RCOR2-M-R	GTCGTTGGGTATCGTTTTGGTTC ACTCGACACTCGAAACGAATACG	158 bp	61 °C
RUNX2-M-F RUNX2-M-R	GCGGGGCGATTTTCGAGTTAC CTAAACCCACGCCGAATCTACG	164 bp	61 °C
RUNX3-M-F RUNX3-M-R2	GTGTTTCGATTTTCGGTTTAGCGTC CGCTCGACTCCGAAACCTCG	353 bp	64 °C
RUNX3-M-F3 RUNX3-M-R3	TTAGCGTCGTTTCGGTAAAATTTTC ACCGGAATAAAAATACGAACG	127 bp	60 °C
SCAMP5-M-F2 SCAMP5-M-R2	CGGATTTTAGTCGTTTTAGGGTTGC GACCAACGTTAAAATAAACCAAATCCG	124 bp	61 °C
SLC2A2-M-F SLC2A2-M-R	TAGGAAAGCGTTTTTGTGTGCG TAATTTCTACCGCCGTACTCCG	178 bp	61 °C
SPON2-M1-F SPON2-M1-R	GGAGATTTTCGTAGTTAGCGGC CTTAAACGACAACCTCCGACTCTTACG	276 bp	61 °C
SPON2-M2-F SPON2-M2-R	TTGTTTAGGGCGGCGGTC AAATCGCGAATACTCGAAACCG	155 bp	61 °C
TACSTD2-M-F TACSTD2-M-R	TGGGGTGTAGTCGATAGCGTTC GATAACGTACGCCGCACG	176 bp	61 °C
TMEM101-M-F TMEM101-M-R	CGTAGTTTTTCGATGTAGGCGGC CCGACTCGCAAAAAACCCG	169 bp	64 °C
TMOD1-M-F TMOD1-M-R	GTTGTAGGGCGCGTTTTTGGTC ACAACGTCTCCGCATATACGCG	101 bp	61 °C
ZNF671-M-F2 ZNF671-M-R2	CGGAGGACGTAGTATTTATTCGC CTACGTCCCCGATCGAAACG	103 bp	61 °C

gDNA, genomische DNA; M, methylierungsspezifisch; F, Forward; R, Reverse; Ta, Annealingtemperatur

2.1.3.3 Fusionsprimer für Next-Generation Bisulfidsequenzierung

Tab. 2.6 Genspezifische Primersequenzen und deren Parameter von Sigma

Primernamen	Oligosequenz	Produktgröße	Ta 1	Ta 2
ATL-Seq-F ATL-Seq-R	TGTGATGTTGAGTTTGGTTTAT CAAACACCTAACAACCCTTAAC	338 bp	53 °C	56 °C
ATOH8-Seq-F ATOH8-Seq-R	TTTAGTAAGTGAGAGTGGATTGGGT ACCCAAAACCTACCTCCTCC	366 bp	60 °C	58 °C
CAMK2N1-Seq-F CAMK2N1-Seq-R	GGTTAGGGTTTGGTTTGG AAAAACCRAAACAAAACCTCC	362 bp	56 °C	56 °C
KATNAL-Seq-F KATNAL-Seq-R	AGGGTTTTAGTATAGTGTGGATG AATCCAAAATCTAATAACACCTCC	378 bp	53 °C	57 °C
KRT-Seq-F KRT-Seq-R	TGTTTAGATGGAGGGTTATAGA TTAATAATACCCACCACCAC	392 bp	52 °C	55 °C
RUNX-Seq-F RUNX-Seq-R	GTAAARGTTTGGAGAGTAGTGT AACACCCRATTCAATCTAATA	400 bp	52 °C	57 °C

Seq, Sequenzierung; F, Forward; R, Reverse; Ta 1, Annealingtemperatur der genspezifischen Sequenzen; Ta 2, Annealingtemperatur der Fusionsprimer

Tab. 2.7 Probenspezifische ID-Sequenzen (MID) der Fusionsprimer

MID	Oligosequenz	MID	Oligosequenz	MID	Oligosequenz
MID 1	ACGAGTGCCT	MID 22	TACGAGTATG	MID 34	CACGCTTACGT
MID 2	ACGCTCGACA	MID 26	ACATACGCGT	MID 39	TACAGATCGT
MID 4	AGCACTGTAG	MID 27	ACGCGAGTAT	MID 40	TACGCTGTCT
MID 7	CGTGTCTCTA	MID 28	ACTACTATGT	MID 41	TAGTGTAGAT
MID 11	TGATACGTCT	MID 32	AGTACGCTAT	MID 42	TCGATCACGT
MID 14	CGAGAGATAC	MID 33	ATAGAGTACT	MID 45	TCTATACTAT
MID 15	ATACGACGTA	MID 34	CACGCTACGT		
MID 18	TCTACGTAGC	MID 35	CAGTAGACGT		

Tab. 2.8 Zuordnung der MID's zu den Proben und Genen

Probe	ATOH8	ATL1	KATNAL2	KRT68	RUNX3	CAMK2N1
2744T1a	1	40	1	1	1	1
3764T1a	4	4	4	4	4	4
4801Ta	7	7	7	7	7	7
5746T	11	11	11	11	11	
5834Ta	18	18	40	40	18	
6153Ta	22	22	22	22	22	
1477T1	26	26	26	26	26	
2854T1	28	28	28	28	28	
3411T1	32	32	41	32	32	32
2696T1a	33	33	42	33	33	33
4575T2a	34	34	34	34	34	2
5228Ta	35	35	35	35	35	
SKOV3 ohne Cisplatin						14
SKOV3 0,8 µM Cisplatin						15
SKOV3 12,8 µM Cisplatin						22
A2780 ohne Cisplatin						26
A2780 0,8 µM Cisplatin						27
A2780 12,8 µM Cisplatin						37
Plazenta, in-vitro methyliert	39	39	39	39	39	45

2.1.3.4 Primer für quantitative Expressionsanalysen

Tab. 2.9 Verwendete transkriptspezifische Primer für die q-PCR

Primername	Oligosequenz	Produktgröße	Ta
ACTB-F	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	294 bp	56 °C
ACTB-R	GCAGTGATCTCCTTCTGCATC		
ATL1-TV1+2-F	TCTGTGTGAACTCGGGCTTG	265 bp	60 °C
ATL1-TV1-3-R	CCGAAAATCCACCCCAACT		
ATL1-TV3-F	GGTGTCCATTATCTGCAGCTTG	212 bp	62 °C
ATL1-TV1-3-R	CCGAAAATCCACCCCAACT		
ATOH8-F	GAAGCGCAAGGAGTGACTG	122 bp	60 °C
ATOH8-R	GGCATCTTGGAGAAGACCAC		
CAMK2N1-F	GACACCAACAACCTTCTTCGG	84 bp	58 °C
CAMK2N1-R	CAATAACAACCCGCTTGCT		
HPRT-F	ACGAAGTGTTGGATATAAGC	214 bp	56 °C
HPRT-R	ATAATTTTACTGGCGATGTC		
KATNAL2-F	CACCAGTCAGAAAGCAGCGA	110 bp	52 °C
KATNAL2-R	TGAGCCAGATTCTTTGCGG		
RUNX3-TV1-F	ATGGCATCGAACAGCATCTTC	337 bp	60 °C
RUNX3-TV1/2-R	CCAATGCCACCACCTTGAA		
RUNX3-TV2-F	ATGCGTATTCCTGAGACCC	295 bp	60 °C
RUNX3-TV1/2-R	CCAATGCCACCACCTTGAA		

TV, Transkriptvariante; F, Forward; R, Reverse; Ta, Annealingtemperatur

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tab. 2.10 Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Ammoniumacetatlösung 7,5 M	5,78 g Ammoniumacetat ad. 10 ml ddH ₂ O
Citratpuffer pH 6,0	Stammlösung A 180 ml + B 820 ml A: 21,01 g Citronensäuremonohydrat ad. 1000 ml ddH ₂ O B: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad. 1000 ml ddH ₂ O
DNA / RNA Gelladepuffer 5x	25 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 25 % Glycerol
EDTA 0,5 M, pH 8,0	18,6 g EDTA 70 ml ddH ₂ O pH 8,0 mit 10 M NaOH konz. Einstellen ad. 1000 ml ddH ₂ O
Hämatoxylinlösung	0,5 g Hämatoxylin 5 ml Ethanol, abs. ad. 500 ddH ₂ O 0,1 g Kaliumiodat 25 g Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat 25 g Chloralhydrat 0,05 g Zitronensäure fertige Lösung filtrieren

Fortsetzung Tab. 2.10 - Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Kresylviolettlösung	1 % Kresylviolettacetat in abs. Ethanol
TBE Puffer 10x	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 <i>ad.</i> 1000 ml ddH ₂ O
TBST Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
TE Puffer pH 8,0	10 mM Tris/HCL, pH 8,0 1 mM EDTA autoklavieren
Tris/HCl 1 M, pH 8,0 oder 7,5	121 g Tris 800 ml ddH ₂ O pH mit HCl konz. einstellen <i>ad.</i> 1000 ml ddH ₂ O
Trypsin/EDTA Lösung	1x PBS 0,05 % Trypsin 0,05 M EDTA pH 8,0
Verdaupuffer für DNA-Isolation	100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 25 mM EDTA, pH 8,0 0,5 % SDS

2.1.5 Analyse- und Versuchssysteme (Kits)

Tab. 2.11 Verwendete Analyse- und Versuchssysteme

Kit	Hersteller
Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit	Agilent Technologies
BioPrime® Total Genomic Labeling System	Invitrogen
EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	Dako
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research
innuPREP DOUBLEpure DNA Kit	Analytik Jena
MethylCollector™ Ultra Kit	Active Motif
NucleoSpin® RNA II Kit	Machery-Nagel

2.1.6 Enzyme

Tab. 2.12 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
AmpliTaq Gold® inkl. 10x Puffer und MgCl ₂	Applied Biosystems
CpG Methyltransferase (M.SssI) inkl. SAM, NEB2	New England BioLabs
FastStart Universal SYBR Green Master Mix	Roche
Proteinase K	Roth
SuperScript™ III Reverse Transkriptase inkl. First Strand Buffer, DTT	Invitrogen

2.1.7 Antikörper**Tab. 2.13** Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
ATL1 Antikörper aus Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich
Ki67 MIB-1 Antikörper aus Maus, monoklonal	Dako
RUNX3 (R3-5G4) Antikörper aus Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnologie

2.1.8 Chemikalien**Tab. 2.14** Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	Sigma-Aldrich
Agarose	Serva
Ammoniak	Merck
Borsäure	Merck
Chloralhydrat	Roth
Cisplatin	Sigma-Aldrich
Citronensäure-Monohydrat	Sigma-Aldrich
Cot-1 human DNA	Roche
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ICN Biomedicals
DNA 1 kb – Marker	Fermentas
DNA 100 bp – Marker	Fermentas
Eosinlösung, alkoholisch	Sigma-Aldrich
Ethanol, 96 %	J.T. Baker
Ethanol, 96 %, 1 % MEK	Roth
Ethanol, abs., 1 % MEK	Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Foramid, deionisiert	Roth
Gelatine (Glycerol-Gelatine)	Serva
Hämatoxylin	Merck
Kalialaun	Roth
Kaliumiodat	Roth
Kresylviolettacetat	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Calbiochem
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 1 und 2	Agilent Technologies
PCR-Primer	MWG, Sigma
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Roth
Random Primer (für reverse Transkription)	Invitrogen
RNAseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)	Invitrogen
Roti®-Histokit II	Roth
RPMI-Medium	Life Technologies
Salzsäure konz.	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
Stabilization & Drying Solution	Agilent Technologies
Tissue-Tek®	SAKURA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth

Fortsetzung Tab. 2.14 – Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Tris	Roth
Trypsin	Life Technologies
Tween 20	Sigma-Aldrich
Wasser, bidest, ultrarein für PCR	Life Technologies
Wasserstoffperoxid 30%	Roth
Xylol	Merck
Ziegenserum	Dako
Zitronensäure	Sigma-Aldrich

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.15 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser	Menzel-Gläser
Falcon-Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one
LPC-Microfugetubes	Zeiss
Mikroarray Gasket Slides	Agilent Technologies
Objektträger, Palm® MembraneSlide NF	Zeiss
Objektträger, Standard	Menzel-Gläser
Objektträger, SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser
PCR 96-well Platten	Sarstedt
PCR Reaktionsgefäße 0,1 ml 4er Streifen	Qiagen
PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml	Brandt
PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml 8er Streifen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Biozym
Rasierklingen	Wilkinson
Reaktionsgefäße (0,5 ml / 1,5 ml / 2,0 ml)	Eppendorf, Sarstedt
Reaktionsgefäße / CryoTubes 3,6 ml	Simport
SurePrint G3 ChIP/CH3 2x400K Microarrays AMADID: 028863	Agilent Technologies
Vollglasstäbe	Roth
Zellkulturflaschen	BD Biosciences

2.1.10 Geräte und Zubehör

Tab. 2.16 Verwendete Geräte und Zubehör

Gerät / Zubehör	Hersteller
Aqua bidest Automat	Millipore
Brutschrank	Heraeus
Elektrophoresesystem	Biometra
Gefriermikrotom Cryotome®	Shandon
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C)	Forma Scientific
Hitzeschrank	Heraeus
Hybridisierungsöfen für Microarrays	Agilent Technologies
Hybridisierungsschalen (Färbekästen und -gestell)	Roth
Hybridization Chamber	Agilent Technologies
Invertmikroskop Axiovert 135 mit Mikromanipulator	Zeiss
Küvette	Roth
Magnetührgerät	IKA
Magnetührstäbe	Roth
Mastercycler Gradient, PCR-Gerät	Eppendorf

Fortsetzung Tab. 2.16 – Verwendete Geräte und Zubehör

Gerät / Zubehör	Hersteller
Microarrayscanner G2565CA	Agilent Technologies
Mikrowellenherd	Bosch
Mikroskop AxioPlan 2 mit Kamera und AxioVision Software	Zeiss
Mikrotom	Microm
Nadelziehgerät	Narishige
NanoDrop® 1000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Palm MicroBeam System	Zeiss
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Rotationsmischer	Dynal
RotorGene Q, PCR-Gerät	Qiagen
Slide holders für Microarrayscanner	Agilent Technologies
Sterilwerkbank	Baker
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
Ultraschallbad USR3 mit Einsatz 042	Julabo
UV-Geldokumentationssystem	Biostep
Vakuumsystem für Säulen QIAvac 24 Plus	Qiagen
Wasserbad	Microm
ABI 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Vakuumentrifuge RC 10.22	Jouan
Feinwaage	Satorius
pH Messgerät	WTW
Eismaschine	Simag
Sterilwerkbank	The Baker Company
Pipettierhilfe	Brand
Pipetten 5 ml - 25 ml, Glas	Hirschmann
Megafuge 1.0R	Heraeus

2.1.11 Software

Tab. 2.17 Verwendete Software

Software, Version	Hersteller
ABI 7300 SDS Software V 1.2	Applied Biosystems
Agilent Scanner Control Software V 8.3	Agilent Technologies
AxioVision40 V 4.5.0.0.	Zeiss
BiQAnalyzer HT	MPI für Informatik
eArray, Online Microarray Konfiguration	Agilent Technologies
Feature Extraction Software 10.5.1.1	Agilent Technologies
FeatureExtraction V 10.5.1.1	Agilent Technologies
Genomic Workbench Software V 7.0	Agilent Technologies
LinRegPCR V 11.0	Ruijter <i>et al.</i> 2009
Methyl Primer Express Software V 1.0	Applied Biosystems
Microsoft Office 2003 und 2007	Microsoft
Palm Robo V 3.02	Zeiss
PerlPrimer V 1.1.19	Sourceforge
Primer Express Software V 2.0	Applied Biosystems
Primer3web V 4.0.0	Untergrasser <i>et al.</i> 2012
RotorGene Q Series Software V 1.7	Qiagen
Spotfire V 4.5.0	TIBCO Software Inc.
SPSS Statistics V 21	IBM

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsschema

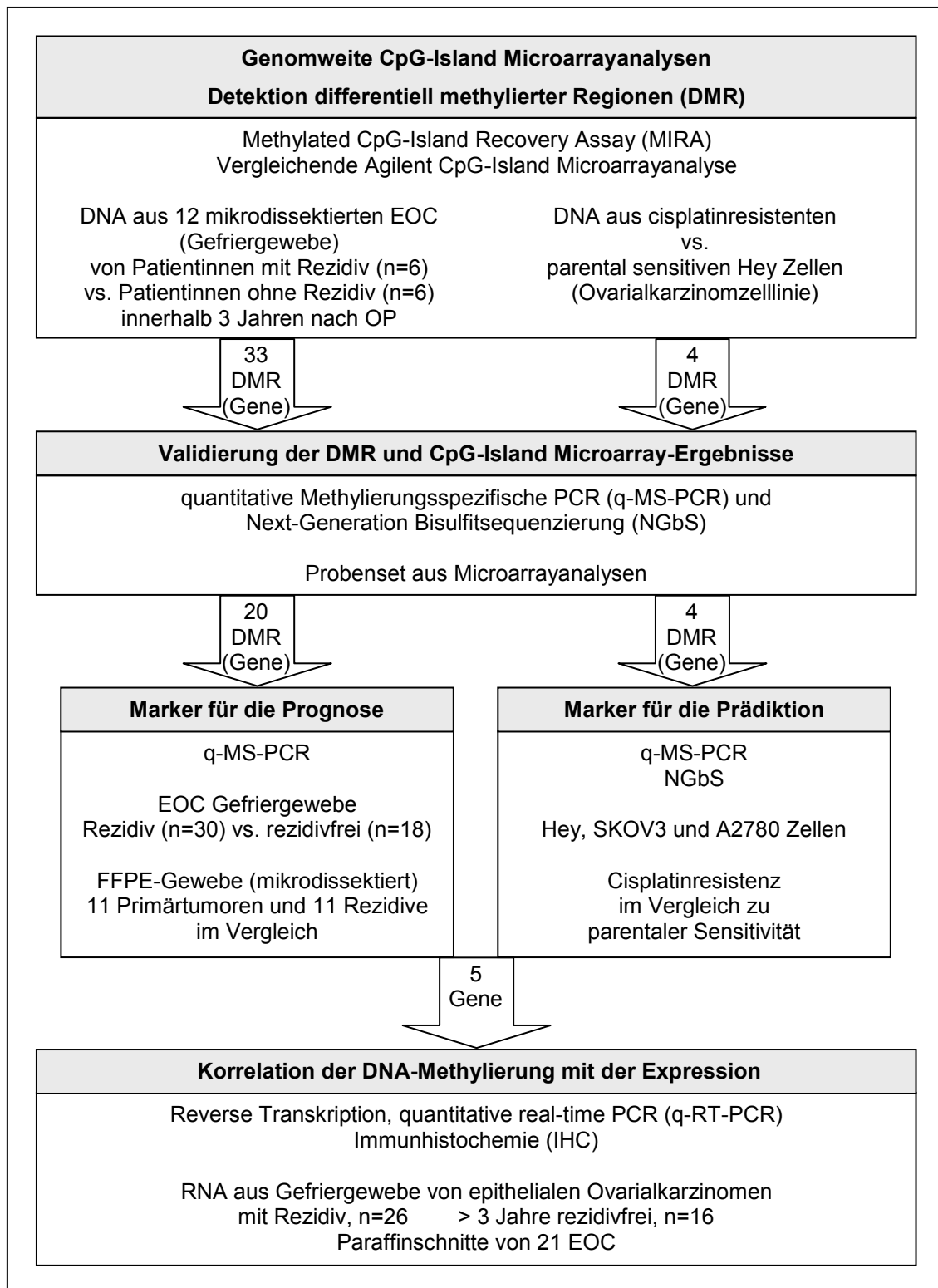


Abb. 2.1 Versuchsschema

Systematischer Versuchsablauf zur Detektion epigenetischer prognostischer und prädiktiver Marker und deren Expression für das epitheliale Ovarialkarzinom (EOC).

Zur Charakterisierung epigenetischer Marker, welche eine prognostische (Krankheitsverlauf) und prädiktive (Therapieansprechen bei Behandlung mit Chemotherapeutika) Aussage ermöglichen, wurde das folgende Versuchsschema zugrunde gelegt (Abb. 2.1). Im Mittelpunkt stand die Detektion von epigenetischen Markern mittels genomweiten Microarrayanalysen und die folgende Validierung mit quantitativer methylierungsspezifischer PCR (q-MS-PCR) und Next-Generation Bisulfitsequenzierung. Prädiktive Marker wurden mit Hilfe von resistenten und parental sensitiven (gegen Cisplatin / Paclitaxan) Zelllinien untersucht. Des Weiteren ist der Einfluss der DNA-Methylierung einiger Marker auf deren Expression analysiert worden. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt (#2582-6/09).

2.2.2 Gewebeproben

2.2.2.1 *Anfertigung von Gefrier- und Paraffinschnitten*

Für DNA und RNA Isolation, Mikrodisektion, HE-Übersichtsfärbung und Immunhistochemie wurden Gewebeschnitte mit folgenden Parametern (Tab. 2.18) aus Gefriergewebe der laboreigenen Tumorbank (eingebettet in Tissue-Tek®) sowie FFPE-Gewebe aus dem Archiv der Pathologie des Universitätsklinikum Jena angefertigt. Paraffinschnitte wurden auf dem Objektträger 45 min bei 56 °C zur Fixierung inkubiert. Jeweils der erste und letzte der Reihenschnitte wurde Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Tab. 2.18 Parameter der Gefrier- und Paraffinschnitte für die jeweiligen Analysemethoden

Methode	Schnittdicke Kryo / FFPE	Anzahl	Objektträger / Tube
HE-Färbung	7 µm / 3 µm	2	Standardträger
Immunhistochemie	7 µm / 3 µm	4	SuperFrost Plus
Manuelle Mikrodisektion	12 µm	6 bis 12	Standardträger
Laserbasierte Mikrodisektion	10 µm	12	Palm MembraneSlide
DNA / RNA Isolation	5 µm	5	2 ml Tube

2.2.2.2 *Hämatoxylin-Eosin Färbung und Bestimmung des Tumorzellanteils*

Zur morphologischen Beurteilung und Bestimmung des Tumorzellanteils wurde von jedem verwendeten Gewebe eine HE-Färbung zu Beginn und Ende der Serienschritte angefertigt. Der Tumorzellanteil wurde objektiv bei 100facher Vergrößerung unter dem Mikroskop als Mittelwert über den Gesamtschnitt geschätzt.

Färbeprotokoll für Hämatoxylin-Eosin Färbung:

- je 5 min in Xylol I und II entparaffinieren (nur FFPE-Gewebeschnitte)
- 5 min mit abs. Ethanol fixieren
- je 5 min mit 96 %, 70%, 50 % Ethanol rehydrieren
- 3x mit Aq. dest. spülen
- 3 min Kernfärbung mit Hämatoxylinlösung
- in Leitungswasser spülen und mit 0,1 % Ammoniakwasser bläuen
- 3x mit Aq. dest. spülen
- 2 min Plasmafärbung mit alkoholischer Eosinlösung
- je 3x spülen in 70 %, 96 % und abs. Ethanol (Differenzierung und Entwässerung)
- je 5 min in absolutem Ethanol I und II waschen (Entwässerung)
- 5 min in Xylol-Ethanol Gemisch waschen (Entsprittung)
- je 5 min in Xylol I und II waschen (Entsprittung)

Anschließend wurden die Objektträger mit Einschlussmittel (Roti®-Histokit II) versiegelt.

2.2.2.3 Mikrodissektion von Gewebeschnitten

Gewebeschnitte, welche mikrodisektiert werden sollten um den Tumorzellanteil zu erhöhen, sind für die manuelle Mikrodisektion auf Standardobjektträger und für die laserbasierte Mikrodisektion auf Palm® MembraneSlides gebracht worden. Zur Differenzierung der Gewebestrukturen wurde bei Bedarf eine Kresylviolett färbung durchgeführt. Dazu ist der Objektträger 3 min gefärbt und anschließend kurz mit 70 %igem Ethanol gespült worden.

Die manuelle Mikrodisektion ist je nach Größe der zu entfernenden Strukturen unter einem Invertmikroskop mit Mikromanipulator oder mittels Rasierklinge durchgeführt worden.

Die laserbasierte Mikrodisektion wurde mit dem PALM MicroBeam System von Zeiss im LMPC-Verfahren (Laser Microdissection and Pressure Catapulting) nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Die Objektträger (Membrane Slides) sind zur Fixierung der Schnitte 30 min in der Sterilwerkbank unter UV-Licht (254 nm) inkubiert und anschließend mit Kresylviolett gefärbt worden.

Dissektiertes Gewebe wurde in ein Reaktionsgefäß mit DNA-Isolationspuffer überführt.

2.2.3 Nukleinsäureextraktion aus Gewebematerial und Zelllinien

2.2.3.1 *DNA-Isolation*

Zur Isolation von DNA aus Gewebeschnitten, mikrodisektierten Gewebe und Zellkulturen fand die Phenol-Chloroform Methode Anwendung.

Entparaffinierung von FFPE-Gewebe:

- 2 x mit 1 ml Xylol gründlich vortexen und anschließend bei 24 °C und 14000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet 2 x waschen mit abs. Ethanol, danach trocknen

DNA-Isolation von paraffinfreien Gewebe und Zellen:

- Zugabe von 0,5 ml Verdaupuffer und 5 µl Proteinase K (100 mg/ml)
- über Nacht bei 56 °C schütteln
- Zugabe von 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, mehrere Sekunden vortexen
- zentrifugieren bei 14000 rpm für 10 min, obere wässrige Phase entnehmen
- Zugabe von 1/10 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Vol. 96 % Ethanol (eiskalt) zu wässriger Phase, gut mischen
- 30 min bei -80 °C lagern, danach 20 min bei +4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und das Pellet mit 70 % Ethanol waschen
- Pellet trocknen
- Pellet in von 20 µl - 50 µl TE-Puffer lösen
- Vermessung der DNA-Probe mit dem NanoDrop®.

DNA aus FFPE-Gewebe wurde auf ein 1,5 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen, um die Qualität der genomischen DNA zu bestimmen.

2.2.3.2 *RNA-Isolation*

Zur Isolation von RNA aus Gewebeschnitten, mikrodisektierten Gewebe und Zellkulturen wurde der NucleoSpin® RNA II Kit von Machery-Nagel nach Herstellerprotokoll verwendet. Die isolierte RNA ist zur Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop® vermessen und auf ein 1,5 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen worden.

2.2.4 Microarrayanalysen

Die teilweise mikrodissizierte DNA von Patientinnen (Tab. 2.1, Abschnitt 2.1.1) wurde zu Pools mit je drei Fällen zu gleichen Teilen vereinigt. Für jede Verlaufsgruppe (Patientinnen mit und ohne Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP) sind zwei Pools gebildet worden. Außerdem ist DNA von cisplatinresistenten und parental sensitiven Hey-Zellen verwendet worden. Nach Ultraschallbehandlung zur Fragmentierung und Anreicherung der methylierten DNA-Regionen durch MIRA wurde die methylierte DNA fluoreszenzmarkiert und nach folgendem Schema (Abb. 2.2) auf Agilent 2x400K CpG-Insel Microarrays hybridisiert und die Daten anschließend ausgewertet.

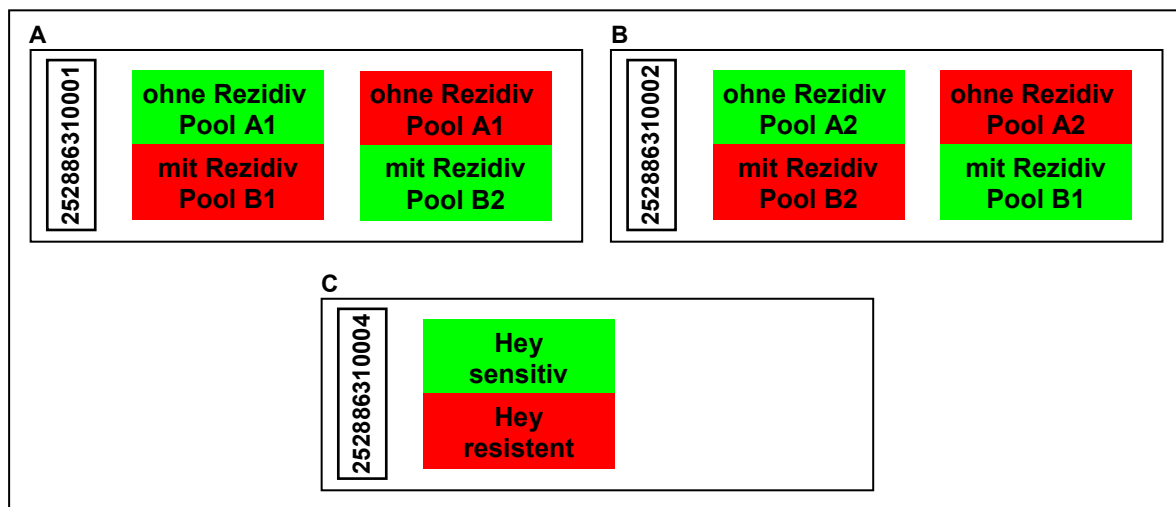


Abb. 2.2 Hybridisierungsschema der Microarrayanalysen

Für die genomweiten Microarrayanalysen verwendete Agilent 2x400K CpG-Insel Microarrays mit je zwei verfügbaren Arrays. Die 2-Farben-Hybridisierung (grün, Alexa Fluor 3; rot, Alexa Fluor 5) erfolgte vergleichend jeweils mit (A-B) einem DNA-Pool aus Patientinnen ohne Rezidiv (Pool A1, A2) vs. DNA-Pool aus Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP (Pool B1, B2) sowie (B) DNA aus cisplatin-sensitiven vs. -resistenten Hey Zellen.

2.2.4.1 *Ultraschallbehandlung von DNA*

Die sequenzunabhängige und gleichmäßige Fragmentierung der DNA-Proben wurde in einem Ultraschallbad mit folgenden etablierten Parametern durchgeführt:

- Je 3,5 µg DNA in 35 µl TE Puffer (100 ng/µl) in 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes
- Ultraschallbad Julabo USR3, gefüllt mit Eiswasser bis zur Markierung
- Julabo Tubehalter (Einsatz 042), mittig ausgerichtet, Tubes zwischen inneren und äußeren Positionen locker, etwas aufschwimmend positionieren
- 4 Zyklen mit je 30 s An und 60 s Aus (Abkühlung) beschallen
- Tubeposition nach jedem Zyklus untereinander tauschen

Je 250 ng beschallte DNA wurde anschließend auf ein 2 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen, um die Größe der Fragmente zu bestimmen.

2.2.4.2 Anreicherung methylierter DNA

Methylierte DNA ist mit dem MethylCollector™ Ultra Kit von Active Motif angereichert bzw. isoliert worden, welches auf Grundlage des Methylated CpG-Island Recovery Assay (MIRA) (Rauch und Pfeifer 2009, Rauch *et al.* 2006) basiert.

Für die Microarrayanalysen war es notwendig, mindestens 2 µg DNA in die Anreicherung einzusetzen. Da der MethylCollector™ Ultra Kit für bis zu 1 µg DNA je Reaktion ausgelegt ist, wurde das Herstellerprotokoll modifiziert. Die Bindung der methylierten DNA an MBD Proteine und magnetische Beads sowie das Waschen wurde in 500 µl Reaktionsgefäßen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Magnetische Nickelbeads 20 µl
 - Complete Binding Buffer (AM7) 140 µl
 - Fragmentierte DNA 20 µl / 2 µg
 - His-MBD2/MBD3 Proteinkomplex 20 µl / 2 µg
 - Gesamtvolumen 200 µl
-
- Inkubation auf Rotationsmischer im Kühlraum bei 4 °C für 1,5 h
 - Überstand abgenommen
 - Waschschritte laut Protokoll mit je 400 µl Binding Buffer
 - Elution mit 200 µl Complete Elution Buffer laut Protokoll

Die Aufreinigung der Elution erfolgte anschließend mit dem innuPREP DOUBLEpure von Analytik Jena nach modifiziertem Protokoll zur Aufreinigung von PCR-Produkten:

- Elutionen aus MIRA (200 µl) mit 2 ml Bindepuffer in 3,6 ml Cryotubes gemischt
- Durchfluss der Lösung zur Bindung der DNA an Säulen mittels Vakuum (QIAvac 24 Plus)
- Elution mit 25 µl TE-Puffer (3 min Inkubation) durch Zentrifugation (14.000 rpm)

Um die Effizienz der Anreicherung methylierter DNA durch MIRA zu kontrollieren, wurden die Produkte mittels quantitativer PCR untersucht (MIRA-PCR).

Verwendete DNA:

- Input DNA (Kontrollen): 10 ng, 1 ng, 0,1 ng aus dem jeweiligen ultraschallbehandelten DNA-Pool (100 ng/µl), dekadisch verdünnt
- MIRA DNA: 1 µl DNA aus 25 µl Elution 1:8 verdünnt (entspricht 10 ng/µl Input-DNA)

Verwendete Primer (Tab. 2.4, Abschnitt 2.1.3.1):

- *APC* (Negativkontrolle, aus MethylCollector™ Ultra Kit, Version B1)
- *XIST* (Positivkontrolle, paternal imprinted, aus MethylCollector™ Ultra Kit, Version B1)
- *SNRPN* (Positivkontrolle, maternal imprinted) (Gebhard *et al.* 2006b)

PCR Ansatz:

- 5 µl Roche FastStart Universal SYBR Green Master Mix
- 0,5 µl Primer-Mix (5 µM each)
- 1 µl DNA
- 3,5 µl ddH₂O

PCR Protokoll für RotorGene Q:

- | | | |
|---------------------------------|-------|--------|
| - Aktivierung | 95 °C | 10 min |
| ----- | | |
| - Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| - Annealing | 60 °C | 20 s |
| - Elongation: | 72 °C | 30 s |
| - Zyklenzahl | 43 | |
| ----- | | |
| - Standard-Schmelzkurvenanalyse | | |

Die Daten wurden mit der RotorGene Q Series Software 1.7 ausgewertet. Der Threshold wurde manuell auf 0,03 gesetzt, die Dynamic Tube Normalisierung angewendet und die Input-DNA als Standard für 10 ng, 1 ng und 0,1 ng definiert. Die Software kalkulierte die Ausbeute der angereicherten methylierten DNA anhand der Amplifikation mit den Primern für *XIST* und *SNRPN*. Da diese beiden Gene in der Input-DNA nur auf einem Allel methyliert sind, jedoch beide Allele gemessen werden, wurde der Wert für die Ausbeute an MIRA-DNA verdoppelt.

2.2.4.3 Fluoreszenzmarkierung von DNA

Die durch MIRA angereicherte DNA wurde für die Microarray-Hybridisierung mit dem BioPrime® Total Genomic Labeling System von Invitrogen genau nach Protokoll fluores-

zenzmarkiert und aufgereinigt. Die Wahl des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff für die verschiedenen Proben ist dem Hybridisierungsschema in Abb. 2.2 (Abschnitt 2.2.4, oben) oder der Tab. 2.19 (Abschnitt 2.2.4.4, unten) zu entnehmen.











Mit dem NanoDrop (Applikationsauswahl „Microarray“) wurde anschließend die Konzentration, Qualität und der Fluoreszenzfarbstoffgehalt der markierten DNA gemessen. Da die Farbstoffe Alexa Fluor® 3 und 5 nicht in der NanoDrop Software auswählbar waren, wurden die Parameter für Alexa Fluor® 555 und 647 verwendet, welche laut Invitrogen dieselben Eigenschaften wie die verwendeten Farbstoffe aufweisen.

2.2.4.4 CpG-Island Microarray Hybridisierung

Für die Microarrayanalysen wurden benutzerdefinierte SurePrint G3 ChIP/CH3 2x400K Mikroarrays (AMADID: 028863) verwendet. Mit dem Online-Microarray-Konfigurationstool eArray von Agilent Technologies (<https://earray.chem.agilent.com>) sind die Sonden des regulär angebotenen Human CpG Island Microarray 1x244K (AMADID: 014791) als Duplikat auf die benutzerdefinierten Microarrays übertragen worden. Ein weiterer Vorteil war, dass das neue Microarraydesign dem aktuellen menschlichen Referenzgenom hg19 entsprach.

Das Hybridisieren, Waschen und Scannen der Microarrays erfolgte strikt nach Herstellerprotokoll „Agilent Microarray Analysis of Methylated DNA Immunoprecipitation Protocol“ Version 1.1 ab Abschnitt „Hybridisation and Wash“. Für die Hybridisierungslösung wurde die fluoreszenzmarkierte DNA aus Abschnitt 2.2.4.3 zu jeweils gleichen DNA Anteilen und einer DNA Gesamtmenge von 500 ng bis 3000 ng je Microarray laut Tab. 2.19 gemischt.

Tab. 2.19 Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierungsschema der Proben

Pool / Probe	Fluoreszenzmarkierung (55 µl Elution)					Hybridisierung		
	Farbstoff	DNA Konz. [ng/µl]	Farbstoff [pmol/µg]	260/280	DNA [µl]	DNA [ng]	Array ID*	
A 1 MIRA I	 Alexa Fluor 3	72	14	1,90	40,50	2916	1_1	
B 1 MIRA II	 Alexa Fluor 5	79	23	1,86	37,00	2923	1_1	
A 1 MIRA II	 Alexa Fluor 5	73	26	1,89	33,30	2431	1_2	
B 2 MIRA I	 Alexa Fluor 3	45	16	1,99	54,00	2430	1_2	
A 2 MIRA I	 Alexa Fluor 3	101	15	1,87	5,00	505	2_1	
B 2 MIRA II	 Alexa Fluor 5	9	30	1,85	54,00	486	2_1	
A 2 MIRA II	 Alexa Fluor 5	50	21	1,95	50,80	2540	2_2	
B 1 MIRA I	 Alexa Fluor 3	47	17	1,93	54,00	2538	2_2	
Hey sensitiv	 Alexa Fluor 3	15	20	1,88	52,00	780	4_1	
Hey resistent	 Alexa Fluor 5	81	24	1,88	9,70	786	4_1	

* Array ID: 25288631000x_x

Da das DNA-Volumen für den Hybridisierungsansatz 40 µl betragen muss, wurden die DNA Lösungen mit der Vakuumzentrifuge bei 40 °C, 1200 rpm, pulsierender Ventilation und maximalem Vakuum auf < 40 µl eingeengt und mit Wasser auf genau 40 µl aufgefüllt.

2.2.4.5 CpG-Island Microarray Auswertung

Die Microarray-Rohdaten wurden mit der Feature Extraction Software von Agilent Technologies mit den Parametern laut Protokoll „Agilent Microarray Analysis of Methylated DNA Immunoprecipitation Protocol“ Version 1.1, Abschnitt 4 generiert. Die Analyse und Normalisierung der Daten, vor allem der Log2Ratio Werte und der grünen bzw. roten prozessierten Signale entspricht laut technischem Support von Agilent dem Vorgehen nach Rauch *et al.* (2006).

Die Feature Extraction Software lieferte gleichzeitig einen Qualitätsreport mit Gitterpositionierung, Verteilung und Ausprägung der Signalintensität und Hindergrundsignale sowie Fehlerstatistik, welcher für die Beurteilung der Microarray-Hybridisierung genutzt wurde.

Die Analyse der Daten zur Auswahl differentiell methylierter Region erfolgte mittels Microsoft Excel 2007 nach folgendem Protokoll (Übersicht). Das detaillierte Protokoll ist im Anhang auf der beiliegenden CD zu finden.

- Das FE-File (txt-file aus FeatureExtraction Software) wurde mit Microsoft Excel 2007 geöffnet. Nicht verwendete Zeilen und Spalten sind im Laufe der Auswertung zur Minimierung des Speicherbedarfs gelöscht worden.
- Alle Sonden mit dem „ControlType“ Wert „1“ und „-1“ (systematische Kontrollen) wurden entfernt. Sonden mit dem „ControlType“ Wert „0“ sind genau die Proben, die auch in der microarrayspezifischen Agilent Gen-List aufgeführt sind.
- Die Werte der LogRatio (Logarithmus zur Basis des Quotienten aus rotem zu grünem prozessiertem Signal) wurden in einer neuen Spalte in den Logarithmus zur Basis 2 umgewandelt (Excel Funktion =log(10^Wert[LogRatio];2)).
- Arithmetische Mittelwerte der Duplikate (Sonden mit gleichem „Probenname“) für Log2Ratio und geometrisches Mittel für grünes und rotes prozessiertes Signal wurden mittels Pivot Tabelle ermittelt und die weiteren Attribute (z. B. „SystematicName“) wieder angefügt.
- Die zur jeweiligen Design ID des Arrays (hier: 028863) gehörende Genliste und Sequenzliste (Verfügbar über Agilent eArray) wurde in die Tabelle passend nach „Probenname“ eingefügt.
- Sonden mit dem Wert „unmapped“ oder „A_17_Pxxxxxxx“ in Spalte „SystematicName“ wurden entfernt.
- Attribut "SystematicName" durch Befehl „Text in Spalten“ nach Chromosom und Position aufgegliedert.
- Daten nach genomischer Position sortiert und allen Sonden eine laufende Nummer nach Genomposition zugeordnet.

- Attribute „CpG-Island“, „CytoBand“ und „Tm“ aus Agilent Genomic Workbench Software (Exportfunktion) über eine Microsoft Access 2003 Abfrage eingefügt.
- Laufende CpG-Island Nummer durch die Excel Formel in Abb. 2.3 A berechnet, sodass eine CpG-Region vom UCSC CpG-Island Name oder einem maximalen Sondenabstand von 300 bp begrenzt wird. Damit wurde sicher gestellt, dass nah flankierende Sonden einer CpG-Insel in die Methylierungsanalysen einfließen.
- Berechnung der Mittelwerte für Log2Ratio, grünem und roten prozessiertem Signal von jeweils drei aufeinander folgenden Sonden einer CpG-Region mit gleicher laufender CpG-Island Nummer laut Formeln in Abb. 2.3 B.

A: Zuordnung der Sonden zu CpG-Regionen (Laufende CpG-Island Nummer) mit gleichen UCSC CpG-Island Namen oder maximal 300 bp Sondenabstand

=Wenn((Oder(Wert[UCSC-CpGIslandName]z=Wert[UCSC-CpGIslandName]z-1;Abs(Wert[Position]z-Wert[Position]z-1)<300));Wert[LfdCpGIsland]z-1; Wert[LfdCpGIsland]+1)

B: Berechnung der Mittelwerte

Berechnungsspalte 1:

=Wenn((ZählenWenn(Spalte[LfdCpGIsland];Wert[LfdCpGIsland]z=1));Wert[Attribut]z;0)

Erläuterung: Übernahme des Einzelwertes bei CpG-Regionen mit nur 1 Sonde.

Berechnungsspalte 2:

=Wenn((UND((ZählenWenn(Spalte[LfdCpGIsland];Wert[LfdCpGIsland]z=2));Wert[LfdCpGIsland]z=Wert[LfdCpGIsland]z-1));Mittelwert(Wert[Attribut]z-1;Wert[Attribut]z);0)

Erläuterung: Mittelwert der zwei Attribute bei CpG-Regionen mit 2 Sonden.

Berechnungsspalte 3:

=Wenn((UND((ZählenWenn(Spalte[LfdCpGIsland];Wert[LfdCpGIsland]z>2));Wert[LfdCpGIsland]z=Wert[LfdCpGIsland]z-2));Mittelwert(Wert[Attribut]z-2;Wert[Attribut]z);0)

Erläuterung: Mittelwert von drei aufeinander folgenden Attributen bei CpG-Regionen mit mehr als 2 Sonden.

Berechnungsspalte 4:

=Summe([Berechnungsspalte1];[Berechnungsspalte3])

Erläuterung: Zusammenführung der Ergebnisse von CpG-Regionen mit 1, zwei oder mehr als 2 Sonden.

Legende

UCSC-CpGIslandName:	CpG-Island Bezeichnung nach UCSC Genome Browser
Position:	Chromosomale Nukleotidposition der ersten Base einer Sonde
LfdCpGIsland:	Laufende CpG-Island Nummer
Attribut:	Log2Ratio (Logarithmus zur Basis 2 des Quotienten aus rotem zu grünem prozessiertem Signal), g- oder rProcessedSignal (grünes / rotes normalisiertes Signal)
Spalte:	Bezug, gesamte Spalte
Wert:	Bezug, Zelle
z; z-1; z-2:	Bezug, (vorherige) Zeilennummer(n)

Abb. 2.3 Angewendete Funktionen in Microsoft Excel zur Berechnung der Mittelwerte aus jeweils 3 fortlaufenden Sonden einer CpG-Region

A: Als Variable für die Zuordnung der Sonden zu einer CpG-Region (gleicher UCSC CpG-Island Name oder max. 300 bp Sondenabstand) wurden die laufende CpG-Island Nummer berechnet.

B: Anhand dieser Zuordnung sind die Mittelwerte von jeweils 3 aufeinander folgenden Sonden über eine gesamte CpG-Region hinweg berechnet worden. Regionen, welche mit nur ein oder zwei Sonden abgedeckt sind werden ebenfalls berücksichtigt (Berechnungsspalte 1 und 2).

- Zeilen mit dem Wert „0“ für die Mittelwerte von bis zu 3 aufeinanderfolgenden Sonden in Log2Ratio, dem grünen und roten prozessierten Signal wurden entfernt. Diese Werte entstehen bei der Berechnung der 3er Mittelwerte für die ersten zwei

Sonden einer CpG-Insel mit mehr als 2 Sonden. Jeweils Zeile 3 enthält den ersten Mittelwert aus 3 Sonden.

- Die Daten der vier Microarrays der Verlaufsgruppen (Patientenproben) wurden in einem Tabellenblatt zusammengeführt und die Summe der Log2Ratios, g- und rProcessedSignal (Mittelwerte über 3 Sonden) der Arrays gebildet.
- Zur Einschränkung von differentiell methylierten Regionen (DMR) wurden anschließend Summen der Log2Ratios aller 4 Microarrays mit einem Wert von ≤ -7.5 bzw. ≥ 4.2 ausgewählt, sodass jeweils ca. 750 hyper- und hypomethylierte Regionen erfasst wurden.
- Fortlaufendes Auswahlkriterium der DMR waren mindestens 3 aufeinander folgende positive bzw. negative SumLog2Ratios ≤ -7.5 bzw. ≥ 4.2 in einer CpG-Insel.
- Bei den Microarrayanalysen von cisplatinresistenten und parental sensitiven Hey Zellen wurden zur Eingrenzung von DMR Log2Ratio-Mittelwerte gewählt, die dreimal in Folge einen Wert $< -3,0$ bzw. $> 2,0$ aufwiesen.

2.2.5 Bisulfitkonvertierung von DNA für die Methylierungsanalysen

Um den Methylierungsstatus mittels q-MS-PCR oder Sequenzierung abzufragen, muss dieser durch einen spezifischen Sequenzunterschied von methylierter und unmethylierter DNA vorliegen. Dies wird durch die Bisulfitbehandlung, erstmals beschrieben durch Frommer, eingeführt (Frommer *et al.* 1992). Dabei werden alle unmethylierten Cytosine in Uracil umgewandelt, methylierte Cytosine sind dagegen beständig. So erhält man je nach ursprünglichen Methylierungs-zustand verschiedene, der Methylierung entsprechende Sequenzen, welche mit methylierungsspezifischen Primern amplifiziert oder sequenziert werden können.

2.2.5.1 *Bisulfitbehandlung*

Für die Konversion der genomischen DNA (g-DNA) aus Gefrier- und FFPE-Gewebe, sowie Zelllinien in bisulfitbehandelte DNA (bisulfit-DNA) wurde der EZ DNA Methylation-Gold™ Kit von Zymo Research verwendet. Je nach Herkunft der DNA sind laut Tab. 2.20 unterschiedliche Mengen g-DNA für die Konversion verwendet und die bisulfit-DNA mit bestimmtem Volumen an M-Elution Buffer eluiert worden. Jede bisulfitbehandelte DNA wurde anschließend mit dem NanoDrop® vermessen. Die höher konzentrierten Proben ($> 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) aus Zelllinien und Kontrollen wurden mit TE-Puffer auf Aliquote von $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ eingestellt.

Tab. 2.20 Proben- und Versuchsparameter der Bisulfitbehandlung

DNA-Quelle	Input-DNA	Elutionsvolumen	Endkonzentration
Gefriergewebe	300 ng	40 µl	≈ 5 ng/µl
FFPE-Gewebe	1000 ng	20 µl	0 - 20 ng/µl
Zelllinien	1000 ng	40 µl	auf 5 ng/µl eingestellt
Kontrollen	1000 ng	40 µl	auf 5 ng/µl eingestellt

2.2.5.2 Kontrollen und Standards

Als Positiv- und Negativkontrolle sowie Gemische dieser zur Quantifizierung der Methylierung bei der q-MS-PCR wurde bisulfit-DNA und vorher *in-vitro* methylierte bisulfit-DNA aus Keratinozyten verwendet. Die im eigenen Labor aus Vorhaut gewonnenen und kultivierten Keratinozyten sind bewusst gewählt worden, da Karzinome aus dem Deckgewebe der Haut (Epithel) entstehen, welches zu ca. 90 % aus Keratinozyten besteht.

Die DNA aus Keratinozyten ist laut Abschnitt 2.2.3.1 isoliert worden. Für die Positivkontrolle (methylierte DNA) wurde diese mit CpG Methyltransferase (M.SssI) *in-vitro* methyliert:

- 1 µg Keratinozyten DNA
- 2 µl NEB Buffer 2 (der M.SssI beiliegend)
- 2 µl S-adenosylmethionine (1600 mM) (der M.SssI beiliegend)
- 1 µl CpG Methyltransferase (M.SssI) (4000 U/ml)
- ad. 20 µl ddH₂O
- mindestens 6 h bei 37 °C inkubieren

Die Bisulfitbehandlung der Negativkontrolle (native Keratinozyten DNA) und Positivkontrolle (*in-vitro* methylierte Keratinozyten DNA) erfolgte wie im Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben.

Für die Quantifizierung der Methylierung mit q-MS-PCR sind für die Standardreihe je 5 ng Kontroll-DNA und deren Gemische nach Tab. 2.21 verwendet worden. Für die Next-Generation-Bisulfitsequenzierung und Gradienten-PCR ist als Positivkontrolle Plazenta-DNA verwendet wurden, was nach *in-vitro* Methylierung jedoch keinen Unterschied zu Keratinozyten DNA zeigte.

Tab. 2.21 Für die Quantifizierung mit q-MS-PCR verwendete Kontrollen / Standardreihe

Kontroll-DNA / Standardreihe	Anteil nativer bisulfitbehandelter DNA	Anteil <i>in-vitro</i> methylierter bisulfitbehandelter DNA
nicht methyliert	100 %	-
1 % methyliert	99 %	1 %
10 % methyliert	90 %	10 %
vollständig methyliert	-	100 %

2.2.6 Methylierungsanalysen mit q-MS-PCR

2.2.6.1 *Design methylierungsspezifischer Primer*

Die DNA-Referenzsequenzen (hg19) der zu validierenden differentiell methylierten Regionen (DMR) wurden dem UCSC Genome Browser entnommen. Anhand der Signale der einzelnen Microarraysonden in einer DMR konnten die am stärksten hyper- bzw. hypomethylierten Bereiche für ein effizientes Primerdesign ausgewählt werden. Entsprechende methylierungsspezifische Primer (MS-Primer) wurden mit dem Programm „Methyl Primer Express® Software V 1.0“ von Applied Biosystems mit folgenden Parametern in Tab. 2.22 entworfen.

Tab. 2.22 Parameter für das Primerdesign mit Methyl Primer Express® Software

CpG-Insel Einstellungen	
Größe	300 bp - 2000 bp
GC-Gehalt	> 50%
CpG Gehalt „observed/expected“	> 0,6
Primer Settings	
PCR Produktlänge	100 bp - 300 bp
Primerlänge	18 bp - 28 bp
Annealingtemperatur (Ta)	62 °C bis 68 °C
delta Ta Primer	< 3°C
Anzahl CpG je Primer	mindestens 3
Anzahl C's, nicht in CpG, je Primer	mindestens 4
C aus CpG am Primer 3' Ende	ja
Sucheffizienz der Software	variabel nach Ergebnisanzahl

Konnten mit diesen Einstellungen keine Primer gefunden werden, wurde die Anzahl an CpG Dinucleotiden in den Primern auf mindestens zwei herunter gesetzt. Die Spezifität der MS-Primer ist mittels BLAST gegen das bisulfitkonvertierte Genom und die Bildung eventueller Sekundärstrukturen von Primerdimeren mit dem Programm PerlPrimer analysiert worden. Da erfahrungsgemäß die Annealingtemperatur in der PCR gut mit den Berechnungen der Primer Express Software (Parameter: 50 mM Salz; 0,05 mM Primer) übereinstimmt, wurde diese zur Bestimmung verwendet. Primer, für die unspezifische PCR-Produkte, energetisch günstige Primerdimere, Annealingtemperaturen unter 60 °C vorausgesagt worden, oder sehr AT-reich (vor allem Wiederholungen) waren, bzw. kein Cytosin aus einem CpG am 3' Ende des Primers enthielten, wurden ohne Software erneut entworfen bzw. die Vorgeschlagenen um einige Basenpaare verschoben.

Für die Analyse von bisulfit-DNA aus FFPE-Gewebe sind die Primerpaare für RUNX3, KRT und CAMK2N1 nachträglich verschoben worden, um kürzere PCR-Produkte zu erhalten und somit eine effiziente PCR Reaktion zu erreichen. Einzig der MS-Primer für ACTB (ACTB-M-F/R) stammt aus einer anderen Studie (Wisman *et al.* 2006).

Die exakte Annealingtemperatur für alle Primerpaare ist mittels Gradienten-PCR nach folgendem Protokoll ermittelt worden.

Gradienten-PCR Ansatz je Primer (9x):

- 45 µl Roche FastStart Uni Sybr Green Master Mix (ROX)
- 2,25 µl Primer Mix (5 mM each)
- 38,25 µl ddH₂O
- 4,5 µl (22,5 ng) *in-vitro* methylierte bisulfitbehandelte DNA
- Aufgeteilt zu je 8 x 10 µl

Two-Step Gradienten-PCR Protokoll für Eppendorf Mastercycler Gradient:

- | | | |
|--------------------------|----------------|--------|
| - Aktivierung | 95 °C | 10 min |
| ----- | | |
| - Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| - Annealing & Elongation | 63 °C +/- 6 °C | 40 s |
| - Zyklenanzahl | 40 | |

Die Produkte wurden mit einer Schmelzkurvenanalyse im RotorGene Q PCR-Cycler sowie anschließender Gelelektrophorese (2 % Agarose) überprüft und die optimale Annealingtemperatur bestimmt.

2.2.6.2 *Quantitative methylierungsspezifische PCR*

Die q-MS-PCR zur Detektion und Quantifizierung der Methylierung in den differentiell methylierten Regionen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

q-MS-PCR Ansatz je Probe:

- 5 µl Roche FastStart Uni Sybr Green Master Mix (ROX)
- 0,25 µl Primer Mix (5 mM each)
- 3,75 µl ddH₂O
- 1 µl (5 ng) bisulfit-DNA

Two-Step q-MS-PCR Protokoll für RotorGene Q:

- | | | |
|---------------------------------|-------------------|--------|
| - Aktivierung | 95 °C | 10 min |
| ----- | | |
| - Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| - Annealing & Elongation | T _a °C | 40 s |
| - Zyklenanzahl | 40 | |
| ----- | | |
| - Standard-Schmelzkurvenanalyse | | |

In jeder q-MS-PCR wurde die Standardreihe aus unmethylierter, 1 %, 10 % und vollständig methylierter Kontroll-DNA (siehe Abschnitt 2.2.5.2) mitgeführt. Die Semiquantifizierung der Methylierung erfolgte mittels der ΔC_t -Methode.

$$\Delta C_t = C_{t_{GOI}} - C_{t_{ACTB}}$$

Durch den Abgleich mit der Standardreihe wurden Proben mit einer Methylierung von unter 1 % als unmethyliert eingestuft. Schwach methylierte Proben sind zu 1 % bis 10 % methyliert. Ab einer Methylierung von 10 % lag eine starke Methylierung vor. Bei der Analyse von Triplikaten sind die q-MS-PCR getrennt voneinander durchgeführt worden. Eine Probe wurde als positiv (methyliert) gewertet, wenn mindestens zwei von drei Analysen eine schwache oder starke Methylierung detektierten.

2.2.6.3 Effizienzbestimmung der q-MS-PCR

Die mittlere Effizienz für die Amplifikation mit einem bestimmten MS-Primer in einem PCR-Ansatz wurde durch die Funktion „Comparativ Quantification“ der RotorGene Q Software nach manueller Auswahl aller positiver Proben mit einem Produkt über 1 (df/dt) angegeben. Die mittlere Effizienz eines Primerpaares errechnete sich anschließend aus dem arithmetischen Mittel der PCR-Ansätze eines Primerpaares.

2.2.7 Methylierungsanalysen mit Next-Generation Bisulfitsequenzierung

Die Next-Generation Bisulfitsequenzierung (NGbS) wurde bei der Firma eurofins MWG GmbH in Ebersberg in Auftrag gegeben. Verwendet wurde die Nanotechnologiemethode des Roche GS-FLX Systems mit Titanium-Chemie. So können bis zu 1 Mio. Sequenzen mit einer Länge von 350 bp bis 450 bp generiert werden. Für die in dieser Arbeit sequenzierten Proben sind neben weiteren Projekten des Labors ca. 180.000 von 400.000 (entspricht $\frac{1}{2}$ Sequenzierplatte) genutzt worden. Die Probenvorbereitung (Bisulfitbehandlung, Amplifikation mit Fusionsprimern, Aufreinigung und Erstellen des DNA-Pools) wurde im eigenen Labor durchgeführt. Verwendet wurde die bisulfit-DNA aus mikrodisektierten Gefriergewebeproben, welche auch für die Validierung der Microarrays mittels q-MS-PCR verwendet wurde.

2.2.7.1 Primerdesign der Fusionsprimer

Bisulfit-DNA spezifische methylierungsunabhängige Primer, welche die Produkte der q-MS-PCR zur Validierung der Kandidatengen einschließen, wurden mit der „Methyl Primer

Express® Software V 1.0“ von Applied Biosystems und vorgegebenen Standardparametern für bisulfit-Sequenzierungsprimer entworfen. Jeweils dem 3' Ende der Forward Primer wurde anschließend der zur Sequenzierreaktion benötigte A-key Primer inklusive probenspezifischer ID-Sequenz (MID, siehe Tab. 2.7 und Tab. 2.8, Abschnitt 2.1.3.3) (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-MID-3') und dem Reverse Primer den B-key Primer ohne MID (5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3') angehängt. Die Spezifität der Primer ist mittels BLAST gegen das bisulfitkonvertierte Genom und die Bildung eventueller Sekundärstrukturen von Primerdimeren mit dem Programm PerlPrimer analysiert worden. Primer, für die unspezifische PCR-Produkte oder energetisch günstige Primerdimere vorausgesagt worden sind, wurden ohne Software erneut entworfen, um einige Basenpaare verschoben oder mit einer anderen MID gekoppelt. Die Spezifität und die exakte Annealingtemperatur aller Primerpaare (mit und ohne key-Primer + MID) ist mittels Gradienten-PCR nach folgendem Protokoll ermittelt worden.

Gradienten-PCR Ansatz (1x):

- 2,5 µl 10x PCR Puffer (inkl. 15 mM MgCl₂) (der AmpliTaq Gold beiliegend)
- 0,25 µl MgCl₂ (25 mM) (der AmpliTaq Gold beiliegend)
- 1,25 µl DMSO
- 0,6 µl dNTP (10mM)
- 2 µl Primer Mix (10 pmol/µl each)
- 0,25 µl AmpliTaq Gold Polymerase
- 17,15 µl ddH₂O
- 1 µl (100 ng) bisulfit-DNA

Gradienten PCR Protokoll für Eppendorf Mastercycler Gradient:

- | | | |
|-----------------|----------------|--------|
| - Aktivierung | 95 °C | 10 min |
| ----- | | |
| - Denaturierung | 95 °C | 30 s |
| - Annealing | 55 °C +/- 6 °C | 20 s |
| - Elongation | 72 °C | 45 s |
| - Zyklenanzahl | 40 | |

Die Produkte wurden mit einer Schmelzkurvenanalyse im RotorGene Q PCR-Cycler sowie anschließender Gelelektrophorese (2 % Agarose) überprüft und die optimale Annealingtemperatur, bei der die größte Produktmenge bei Ausschluss von unspezifischen Produkten erhalten wurde, bestimmt.

2.2.7.2 Amplifikation der DNA zur Kopplung der Fusionsprimern

Die Amplifikation der bisulfit-DNA zum Koppeln der Sequenzierungs-Tags wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

PCR Ansatz (1x):

- 5 µl 10x PCR Puffer (inkl. 15 mM MgCl) (der AmpliTaq Gold beiliegend)
- 0,5 µl MgCl₂ (25 mM) (der AmpliTaq Gold beiliegend)
- 2,5 µl DMSO
- 1,2 µl dNTP (10mM)
- 4 µl Primer Mix (10 pmol/µl each)
- 0,5 µl AmpliTaqGold Polymerase
- 34,3 µl ddH₂O
- 2 µl (100 ng) bisulfit-DNA

Aufgeteilt auf 2 x 25 µl PCR Reaktionen

PCR Protokoll für Eppendorf Mastercycler Gradient:

- | | | |
|-----------------|-------|--------|
| - Aktivierung | 95 °C | 10 min |
| ----- | | |
| - Denaturierung | 95 °C | 30 s |
| - Annealing | *Ta 1 | 20 s |
| - Elongation | 72 °C | 45 s |
| - Zyklenanzahl: | 10 | |
| ----- | | |
| - Denaturierung | 95 °C | 30 s |
| - Annealing | *Ta 2 | 20 s |
| - Elongation | 72 °C | 45 s |
| - Zyklenanzahl | 30 | |
| ----- | | |
| - Elongation | 72 °C | 5 min |

*Ta: Annealingtemperatur, (1) Primer ohne, (2) Primer mit key-Primer und MID

2.2.7.3 Produktaufreinigung und Probenpool für die Sequenzierung

Im Anschluss an die PCR wurden die jeweils gleichwertigen PCR-Reaktionen zusammen über ein 1,5 %iges Agarosegel präparativ aufgereinigt, die zu verwendenden Banden ausgeschnitten und die DNA mit dem innuPREP DOUBLEpure von Analytik Jena laut Herstellerprotokoll isoliert, aufgereinigt und mit 15 µl Elutionspuffer eluiert. Anschließend ist die DNA mit dem NanoDrop® vermessen worden.

Von jeder Probe (n=78) ist ein gleicher Anteil an DNA zu einem Pool zusammengefügt worden. Das Gesamtvolumen für die anteilige Sequenzierreaktion war auf 8 µl mit 550 ng

DNA beschränkt. Aus diesem Grund wurde der DNA-Pool einer Ethanolfällung unterzogen:

- 300 µl DNA-Pool (anteilig 20 ng DNA jeder Probe)
- 30 µl Natriumacetat (3M)
- 600 µl Ethanol (96 %)
- mischen und bei -80 °C über Nacht inkubiert
- Zentrifugation 20 min bei 4 °C, 14.000 rpm
- Überstand verwerfen, Pellet mit 1 ml 70 %igem, eiskaltem Ethanol waschen
- Zentrifugation 10 min bei 4 °C, 14.000 rpm
- Pellet trocknen und in 10 µl 10 mM Tris/HCl pH 8 gelöst.

Die DNA ist anschließend mit dem NanoDrop® vermessen worden und eine Verdünnung mit 550 ng DNA in 8 µl Tris/HCl (10 mM, pH 8) für die Sequenzierreaktion hergestellt worden.

2.2.7.4 Auswertung der Sequenzdaten

Nach bisulfit-Tiefensequenzierung durch eurofins MWG GmbH wurden die Sequenzdaten dem Labor zur Verfügung gestellt. Die Auswertung der relativen und absoluten Methylierung sowie der statistischen Verteilung der Reads und die grafische Darstellung erfolgten mit dem Programm BiQAnalyzer HT (Max-Planck-Institut für Informatik). Die Anzahl in den Primerbindestellen vollständig methylierten Sequenzen ist durch manuelles Zählen bestimmt worden.

2.2.8 Expressionsanalysen

2.2.8.1 *Reverse Transkription und quantitative realtime PCR (q-PCR)*

Reverse Transkription:

Für die Expressionsanalysen auf RNA Ebene wurde diese wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben isoliert. Die reverse Transkription von jeweils 500 ng RNA je Probe in einem 20 µl Ansatz erfolgte mit der SuperScript® Reverse Transcriptase von Life Technologies unter Verwendung von random-Priming nach Herstellerprotokoll. Die cDNA wurde abschließend mit ddH₂O auf 40 µl verdünnt.

Design transkriptspezifischer Primer:

Exonüberspannende transkriptspezifische Primer für *RUNX3* (TV1 und 2), *ATL1* (TV 1+2 und 3), *CAMK2N1*, *KATNAL2* und *ATOH8* sind manuell und mit Hilfe des Onlineprogramms Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>) (Untergasser *et al.* 2012) entworfen worden. Die optimale Annealingtemperatur für jedes Primerpaar ergab sich aus der durchgeführten Gradienten-PCR nach folgendem Protokoll.

Gradienten-PCR Ansatz je Primer (9x):

- 90 µl Roche FastStart Uni Sybr Green Master Mix (ROX)
- 9 µl Primer Mix (5 mM each)
- 76,5 µl ddH₂O
- 4,5 µl cDNA (Gemisch aus Proben und Zelllinien)
- Aufgeteilt zu je 8 x 20 µl (8er 0,2 ml PCR-Streifen)

PCR Protokoll für Eppendorf Mastercycler Gradient:

- | | | |
|-----------------|----------------|--------|
| - Aktivierung | 95 °C | 10 min |
| ----- | | |
| - Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| - Annealing | 54 °C +/- 8 °C | 20 s |
| - Elongation | 72 °C | 30 s |
| - Zyklenanzahl | 40 | |

Die Produkte wurden mit einer Schmelzkurvenanalyse im ABI 7300 Real-Time PCR System sowie anschließender Gelelektrophorese (2% Agarose) überprüft und die optimale Annealingtemperatur bestimmt.

Die Primer für die Housekeepinggene *ACTB* und *HPRT* waren bereits im Labor etabliert.

Quantitative realtime PCR:

Die q-PCR wurde mit dem ABI 7300 Real-Time PCR System nach folgendem Protokoll durchgeführt.

q-PCR Ansatz (1x):

- 5 µl Roche FastStart Uni Sybr Green Master Mix (ROX)
- 0,5 µl Primer Mix (5 mM each)
- 3,5 µl ddH₂O
- 1 µl cDNA

q-PCR Protokoll für ABI 7300 Real-Time PCR System:

- Aktivierung	95 °C	10 min

- Denaturierung	95 °C	15 s
- Annealing	Ta	20 s
- Elongation	72 °C	30 s
- Zyklenanzahl	40	

Standard-Schmelzkurvenanalyse		

Auswertung:

Die durch ABI 7300 SDS Software analysierten Ct-Werte (bei Treshhold=0,2; Auto Baseline) und Fluoreszenzen (delta Rn v. Cycle bei Treshold=2,0; Manual Baseline Cycle 1 bis 1) sind exportiert worden. Die durchschnittliche PCR-Effizienz für ein Primerpaar in einem PCR-Lauf ist anhand der Analyse der Fluoreszenzen (delta Rn v. Cycle) mit dem Programm LinRegPCR (Ruijter *et al.* 2009) bestimmt worden. Die relative Expression eines Gens bzw. einer Transkriptvariante berechnete sich nach dem effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodell (delta delta Ct Methode) (Pfaffl 2001) nach folgender Formel.

$$Expression = \frac{Geomittel \left(\frac{Ct_{ACTB}}{E_{ACTB}} ; \frac{Ct_{HPRT}}{E_{HPRT}} \right)}{\frac{Ct_{GOI}}{E_{GOI}}}$$

Um die Expression in methylierungsabhängigen (methyliert / nicht methyliert) und verlaufsabhängigen (Rezidiv innerhalb 3 Jahren / kein Rezidiv) Gruppen zu vergleichen, ist jeweils der Median gebildet worden.

2.2.8.2 Immunhistochemie

Zur Expressionsanalyse auf Proteinebene sind die nach Abschnitt 2.2.2.1 angefertigten Paraffinschnitte immunhistologisch gegen die Proteine RUNX3, ATL1, Ki67 und eine Negativkontrolle (ohne primären Antikörper) mit dem Dako EnVision™ Detection Systems nach folgendem Protokoll gefärbt worden:

- je 5 min in Xylol I, II, abs. Ethanol, 96 %, 70 %, 50 % Ethanol entparaffinieren
- 7 min in 3 % Wasserstoffperoxid in TBST zur Blockierung endogener Peroxidasen
- 2 x spülen und 5 min waschen mit TBST Puffer

- Antigendemaskierung (HIER) 4 x 5 min mit Zitratpuffer pH 6,0 in Mikrowelle kochen, in den Pausen mit Aq. dest. auffüllen, langsam (30 min) abkühlen lassen
 - 5 min in TBST waschen
 - 20 min mit Ziegen Serum (1:5) zur Blockierung inkubieren, danach abklopfen
 - über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörper, verdünnt in Antibody Diluent* inkubieren (siehe Tab. 2.23)
 - 3 x 5 min mit TBST waschen
 - 30 min Inkubation mit s Antikörper, konjugiert mit HRP*
 - 3 x 5 min mit TBST waschen
 - 10 min Inkubation mit Chromogen-Substratlösung für Peroxidase (1:50)*
 - Schnitte gründlich mit Aq. dest. Spülen
 - 5 min Inkubation mit Hämatoxylinlösung zur Gegenfärbung der Kerne
 - spülen mit Leitungswasser und anschließend 1 min in Ammoniakwasser (1:1000) bläuen
 - Objektträger gründlich mit Aq. dest. spülen und mit Gelatine eindecken
- * In EnVision™ Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse enthalten

Tab. 2.23 Primäre Antikörper und die verwendete Verdünnung

Antikörper	Verdünnung
Anti-RUNX3 5G4	1:50
Anti-ATL1, polyklonal	1:150
Ki67 MIB-1, monoklonal	1:100
Kontrolle ohne prim. AK	TBST

Die semiquantitative Auswertung der Expression von RUNX3, ATL1 und Ki67 erfolgte am Invertmikroskop bei 100facher Vergrößerung durch möglichst objektive Erfassung des Histo-Score (H-Score) (van Diest *et al.* 1996, Bosman *et al.* 1992). Dieser berechnete sich für den jeweiligen Antikörper aus der Summe der Produkte der jeweiligen Färbeintensitätsstufen 0 bis 3 mit dem Anteil positiver Zellen.

$$H = \sum_{i=0}^3 (I_i \cdot A_i) \quad (H, \text{Histo-Score}; I, \text{Intensität}; A, \text{Anteil positiver Zellen})$$

2.2.9 Kultivierung und Cisplatinbehandlung von Zellen

Die Zellkultivierung der SKOV3 und A2780 Zellenlinien diente der Vermehrung und Kultivierung mit Cisplatin. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank bei sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.9.1 Auftauen von Zellen

Die verschiedenen Zelllinien lagern bei ca. $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Einfriermedium, welches DMSO enthält. Da DMSO sehr toxisch auf Zellen wirkt, muss die Zellsuspension schnell aufgetaut werden. Die Zellsuspension wurde mit 7 ml RPMI-Medium unter auf- und abpipetieren aufgetaut und resuspendiert. Anschließend wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 1100 rpm zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Zur Kultivierung wurde das Pellet in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert und in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche überführt.

2.2.9.2 Kultivierung zur Vermehrung

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und einer Luftfeuchte von ca. 92 % in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin in 75 cm^2 Zellkulturflächen kultiviert. Jeweils alle zwei bis drei Tage wurde die Morphologie gesichtet, die Konfluenz bestimmt und demnach das Medium gewechselt, oder die Zellen nach Bedarf (80% Konfluenz) gesplittet. Zum Splitten der Zellen wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen gelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden in insgesamt 8 ml (2 ml Trypsin-EDTA + 6 ml Medium) resuspendiert und 1:2, 1:4, 1:8 oder 1:16 gesplittet, in neue 75 cm^2 Zellkulturflaschen überführt und mit Medium auf 15 ml aufgefüllt.

2.2.9.3 Kultivierung unter Cisplatin

Um eine Cisplatinresistenz der Zellen herbeizuführen, wurden diese laut Tab. 2.24 mit Cisplatin versetzten RPMI-Medium (inkl. 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin) unter oben genannten Bedingungen kultiviert. Vor einer DNA und RNA Isolation betrug die Kultivierung ohne Cisplatin weitere 3 Tage.

Tab. 2.24 Cisplatinbehandlung von SKOV3 und A2780 Zellen

Cisplatinkonzentration	Behandlungszyklen	Behandlungsphase	Erholungsphase
0,1 μM	2	3 Tage	4 Tage
0,2 μM	2	3 Tage	4 Tage
0,4 μM	2	3 Tage	4 Tage
0,8 μM	2	3 Tage	4 Tage
3,2 μM	3	3 Tage	bis 80 % Konfluenz
6,4 μM	4	3 Tage	bis 80 % Konfluenz
12,8 μM	6	3 Tage	bis 80 % Konfluenz

2.2.9.4 Ernten der Zellen für DNA und RNA Isolierung

Zur Isolation der DNA wurden die Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 6 ml Medium resuspendiert und bei 1100 rpm (4 °C) zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet mit PBS gewaschen. Zellen für die Isolation von RNA wurden direkt in der Kulturflasche, nach dem Waschen mit PBS, im Lysepuffer aufgenommen. Das Lysat wurde bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die DNA bzw. RNA Isolation erfolgte laut Abschnitt 2.2.3.

2.2.10 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung zur Bestimmung der Signifikanz des Unterschiedes von Messgrößen zweier Gruppen wurde mit der IBM SPSS Statistics Version 21 durchgeführt. Alle Stichproben (jeweils k=2) waren unabhängig voneinander. Die Prüfung auf nicht Normalverteilung der stetigen Messreihen erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnova Test (SPSS-Funktion: Analysieren > Nichtparametrische Tests > Unabhängige Stichproben). Die folglich verwendeten Testverfahren zur Bestimmung der Signifikanz für die jeweiligen Analysen (Methylierungs-, Expressionsanalysen und Immunhistochemie) zeigt Tab. 2.25.

Tab. 2.25 Verwendete statistische Testverfahren

Analyse	Gruppen (k=2)	Messniveau	Testverfahren
Methylierungsanalysen	Rezidiv < 3 Jahre vs. rezidivfrei	nominal	Fisher's exact test
Expressionsanalysen	Methyliert vs. nicht methyliert	stetig	Mann-Whitney U-Test
	Rezidiv < 3 Jahre vs. rezidivfrei	stetig	Mann-Whitney U-Test
IHC (Histo-Score)	Methyliert vs. nicht methyliert	stetig	Mann-Whitney U-Test

Der exakte Test nach Fisher wurde mit der SPSS-Funktion: Analysieren > Deskriptive Statistik > Kreuztabellen unter Auswahl des Chi-Quadrat-Tests ausgeführt. Der Mann-Whitney U-Test mit der SPSS-Funktion Analysieren > Nichtparametrische Tests > Unabhängige Stichproben.

3 Ergebnisse

Durch genomweite Methylierungsanalysen von Patientenmaterial sowie Zelllinien und anschließender Validierung mit q-MS-PCR konnten prognostische und prädiktive Marker für das EOC identifiziert werden. Außerdem wurde die Korrelation der DNA-Methylierung mit der Gen- und Proteinexpression aufgeklärt. Eine Übersicht der Versuche und Analysemethoden ist in Abschnitt 2.2.1, Abb. 2.1 zu finden.

3.1 CpG-Insel Microarrayanalysen

3.1.1 Anreicherung methylierter DNA aus Ovarialkarzinomen

Für genomweite Methylierungsanalysen wurden insgesamt 12 Patientinnen (sechs je Verlaufsgruppe, Tab. 3.1) mit definierten Eigenschaften ausgewählt, um eine möglichst von anderen Variablen unabhängige Analyse durchzuführen. Alle Karzinome waren vom serösen Typ, klassifiziert als FIGO IIIc bzw. pT3 pN1 und wiesen ein Grading der Stufe 2 oder 3 auf. Alle Patientinnen erhielten nach primärer OP mit makroskopisch tumorfreier Resektion (R0) eine Standardchemotherapie mit Carboplatin und Taxan. Weitere Eigenschaften sind der Tab. 2.1 in Abschnitt 2.1.1 zu entnehmen.

Die Gefrierschnitte der epithelialen Ovarialkarzinome (EOC) wurden mikrodisektiert, die Tumor-DNA isoliert, ultraschallbehandelt und methylierte DNA Fragmente mittels Methylated CpG Island Recovery Assay (MIRA) angereichert.

Tab. 3.1 Tumorzellanteil der Gefrierschnitte aus EOC und Anreicherung durch Mikrodisektion

Verlauf	Pool	Tumorbank-Nr.	Tumorzellanteil Gesamtschnitt	Mikrodisektion	Tumorzellanteil nach Dissektion	
kein Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP	A 1	6153 Ta	80 %	keine	80 %	
		5834 Ta	80 %	keine	80 %	
		5746 T	60 %	keine	60 %	
						MW: 73 %
	A 2	4801 Ta	50 %	manuell	90 %	
		3764 T1a	40 %	manuell	80 %	
2744 T1a		20 %	laser-basiert	50 %		
					MW: 73 %	
Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP	B 1	1477 T1	75 %	keine	75 %	
		3411 T1	80 %	keine	80 %	
		2854 T1	75 %	keine	75 %	
						MW: 77 %
	B 2	2696 T1a	40 %	manuell	100 %	
		5228 Ta	40 %	manuell	80 %	
4575 T2a		40 %	manuell	50 %		
					MW: 77 %	
Mittelwert			57 %		75 %	

Ein wichtiges Kriterium für die Proben stellte der Tumorzellanteil dar. Dieser sollte für jede Probe mindestens 50 % betragen, sodass der Einfluss infiltrierender Immunzellen und Stromazellen auf die zu messende Methylierung möglichst gering bleibt. Die Tumoreale der Gefriergewebe waren in den meisten Fällen von nicht dissektierbaren Stroma infiltriert und gleichzeitig von gut abgegrenzten und zusammenhängenden Stromaarealen umgeben. Die manuelle Mikrodissektion von sechs der zwölf Fälle diente der Anreicherung von Tumorzellen durch Entfernen angrenzender Stroma- und Fettarealen (Tab. 3.1). Tumorblock 2744 T1a war der einzige mit relativ kleinen Tumorzellen, welche nur 20 % des Gesamtschnittes ausmachten. Durch laser-basierte Mikrodissektion war es auch hier möglich den Tumorzellanteil auf mindestens 50 % zu erhöhen. Insgesamt konnte der durchschnittliche Anteil in der Gesamtheit der Proben von 57 % auf 74 % gesteigert werden (Tab. 3.1).

Für die genomweite Methylierungsanalyse standen vier Microarrays für vergleichende Hybridisierungen zur Verfügung. Die Patientengruppen wurden in jeweils zwei Pools (A1, A2 und B1, B2) geteilt. Diese wurden jeweils zweifach hybridisiert, sodass jeder Pool von Patientinnen ohne Rezidiv mit jedem Pool von Patientinnen mit Rezidiv verglichen werden konnte (siehe Hybridisierungsschema Abb. 2.2 in Abschnitt 2.2.4). Die Pools wurden so zusammengestellt, dass der Tumorzellanteil gleichverteilt im Mittel 73 % bis 77 % betrug (siehe Tab. 3.1).

Um lokal methylierte DNA anzureichern, ist es notwendig die DNA gleichmäßig und sequenzunabhängig zu fragmentieren. Dazu wurden die DNA-Pools Ultraschallbehandelt. Die Größe der Fragmente sollte nach Beschallung 100 bp bis 400 bp betragen (Abb. 3.1). Da die Größe der Fragmente für Pool B2 geringfügig höher war (150 bp – 600 bp), wurde diese Probe nochmals beschallt, um die richtige Fragmentgröße zu erhalten (Abb. 3.1).

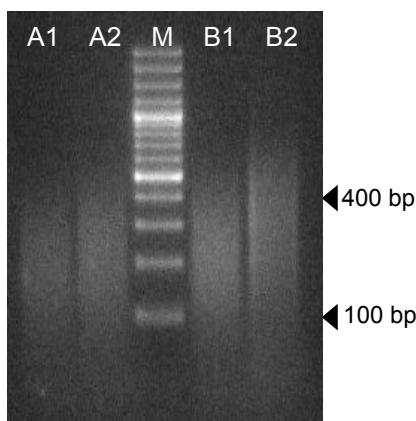


Abb. 3.1 DNA Fragmentierung nach Ultraschallbehandlung
Die DNA liegt nach Ultraschallbehandlung in Fragmenten zwischen 100 und 400 bp vor. Probe B2 zeigt geringfügig größere Fragmente bis 600 bp.
(1,5 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid mit M, 100 bp Marker; A1-B2, Probenpools)

Methylierte DNA-Regionen wurden anschließend mittels MIRA angereichert. Durch die Bindung eines His-MBD2b-MBD3L1 Proteinkomplexes an methylierte DNA Fragmente mit mindestens fünf methylierten CpG-Dinukleotiden und dessen Kopplung an magnetische

Nickel-Beads werden die nicht methylierten DNA-Fragmente durch auswaschen entfernt (Rauch *et al.* 2006, Rauch und Pfeifer 2009). Zur Bestimmung der Effizienz der Anreicherung wurden die Produkte im Vergleich zur eingesetzten DNA (Input) mittels quantitativer PCR (MIRA-PCR) an geeigneten Genregionen überprüft (Abb. 3.2). Die CpG-Insel im Promotor des Gens *APC* (*Adenomatosis polyposis coli*) ist in gesunden Geweben unmethyliert und in EOC in 11 % bis 47 % der Fälle methyliert (Makarla *et al.* 2005, Rathi *et al.* 2002, Tam *et al.* 2007). Somit ist bei der Anreicherung methylierter DNA aus gesundem Gewebe diese Genregion als Negativkontrolle geeignet, für OvCa-Gewebe jedoch nur bedingt. Um den Ausschluss unmethylierter DNA dennoch zu gewährleisten wurde MseI-verdaute genomische Kontroll-DNA mitgeführt, welche aus gesunden Menschen stammt. Neben dieser Kontrolle zeigten aber auch die Produkte des MIRA aus den EOC keine Anreicherung der *APC* Promotorregion. Dies zeigt, dass nicht methylierte CpG Inseln erfolgreich entfernt wurden (Abb. 3.2 A).

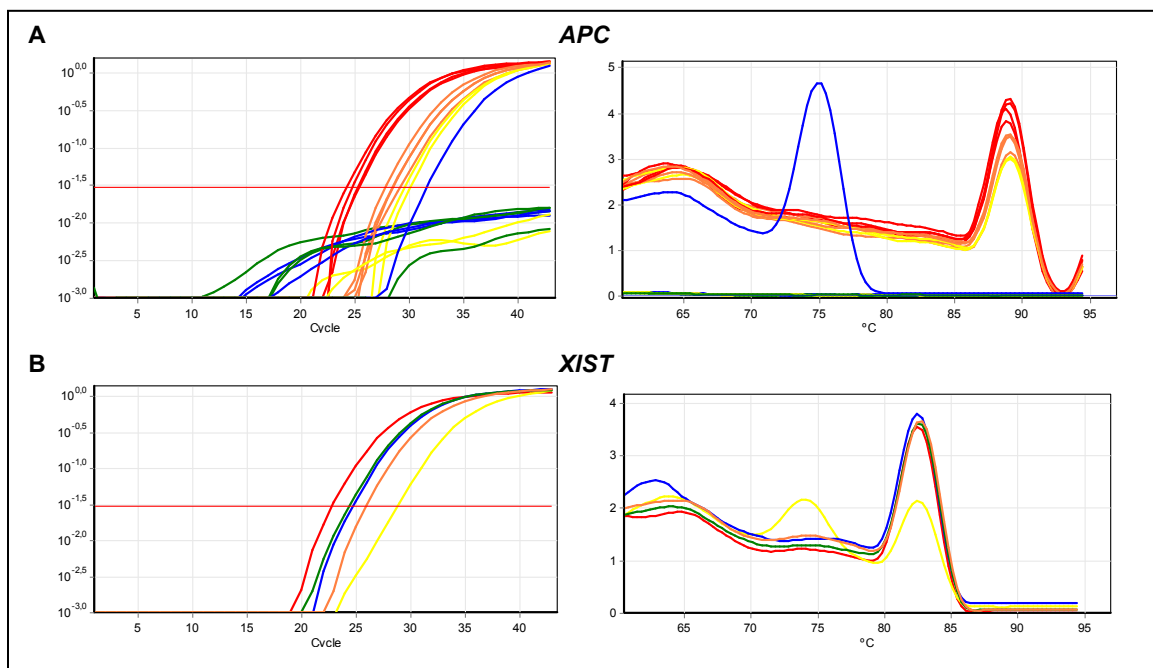


Abb. 3.2 MIRA-PCR zur Kontrolle der Anreicherung methylierter DNA Fragmente

A: Amplifikation der Negativkontrolle (*APC*) zeigt kein spezifisches Produkt mit der MIRA-DNA (grün, blau)

B: Amplifikation der Positivkontrolle am Beispiel *XIST* mit der angereicherten MIRA-DNA (Pool A1, blau; Pool A2, grün) zeigt eine Ausbeute zwischen 1 ng und 10 ng bzw. 10 % und 100 %. (Amplifikationsplot, links; Schmelzkurve, rechts; Input DNA: 10 ng (100 %), rot; 1 ng (10 %), orange; 0,1 ng (1 %), gelb)

Um die Ausbeute der Anreicherung für methylierte DNA Fragmente zu bestimmen, wurden die Promotorregionen der Gene *XIST* (*X inactive specific transcript*) und *SNRPN* (*small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) der MIRA-Produkte amplifiziert und quantitativ im Vergleich zu 10 ng, 1 ng und 0,1 ng Ausgangs-DNA bestimmt (Abb. 3.2 B). Beide Gene unterliegen dem Imprinting, wodurch *SNRPN* maternal (Reed und Leff 1994)

und *XIST* paternal (Beard *et al.* 1995, McDonald *et al.* 1998) methyliert ist. Da jeweils ein Allel nicht methyliert und eines methyliert vorliegt, beträgt die theoretische Ausbeute im Vergleich zur Input DNA 50 %. Die Anreicherung methylierter DNA-Fragmente konnte nachgewiesen werden. Am Beispiel des Pools A1 und A2 (Abb. 3.2 B) wurde gezeigt, dass eine Rückgewinnung methylierter DNA zwischen 10 % und 100 % erfolgte. Die durch Roter Gene Q Software ermittelten Ausbeuten auf Basis einer Standardkurve (10 ng, 1 ng, 0,1 ng und 0 ng Input DNA) für alle Anreicherungen sind in Tab. 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2 Ausbeute / Rückgewinnung methylierter DNA Fragmente durch MIRA

Pool / MIRA-Probe	Ausbeute* <i>XIST</i> [%]	Ausbeute* <i>SNRPN</i> [%]
A1 MIRA	48,6	34,6
A1 MIRA	56,8	35,2
A2 MIRA	31,4	12,8
A2 MIRA	53,0	19,8
B1 MIRA	42,8	28,4
B1 MIRA	52,6	48,8
B2 MIRA	35,2	40,2
B2 MIRA	9,6	8,4
PCR Effizienz	1,75 ± 0,01	1,75 ± 0,01

* Ausbeute (2-fach) unter Berücksichtigung, dass ein Allel methyliert ist.











Für den Promotorbereich von *XIST* wurde eine Ausbeute von 31 % bis 57 % und für *SNRPN* 13 % - 49 % ermittelt (ausgenommen Probe B2 MIRA II). Hingegen wurde nicht methylierte DNA vollständig aus den Ansätzen ausgewaschen. Bei einer Probe (B2 MIRA II) konnten methylierte DNA Fragmente nur geringfügig angereichert werden, mit einer Ausbeute von unter 10 % (Tab. 3.2). Die mittlere PCR Effizienz, welche durch RotorGene Q Software mittels Anstieg des Fluoreszenzsignals in der linearen Phase berechnet wird, betrug für die Amplifikation von *XIST* sowie *SNRPN* jeweils $1,75 \pm 0,01$.

Für genomweite Methylierungsanalysen zur Suche von Genen, die in Abhängigkeit von Resistenzen gegen Chemotherapeutika hyper- oder hypomethyliert sind, wurden neben den Analysen mit Tumorgewebe cisplatinresistente Hey-Zellen mit deren parentalen Zelllinie verglichen. Hey-Zellen entstammen einem humanen OvCa-Xenotransplantat und wurden durch Kultivierung in cisplatinhaltigen Medium resistent gegen Cisplatin bzw. Paclitaxan gemacht (DNA aus Zellkultur erhalten von der AG Prof. Meinhold-Heerlein, Universitätsklinikum Aachen) (Brautigam *et al.* 2009). Die Anreicherung methylierter DNA wurde analog zu den Patientenproben durchgeführt. Die Ausbeute nach MIRA betrug für beide Kontrollen (*XIST*, *SNRPN*) jeweils > 34 %. Somit war genügend angereicherte DNA vorhanden, um eine Microarray-Hybridisierung durchzuführen. Nicht methylierte DNA wurde auch hier erfolgreich entfernt.

3.1.2 Microarray-Hybridisierung und deren Qualität

Um beide Patientengruppen mit rezidivfreiem Verlauf jeweils mit beiden Patientengruppen schlechteren Verlaufs (Rezidiv innerhalb 3 Jahre nach OP) direkt vergleichen zu können, wurde jeder DNA-Pool doppelt hybridisiert (Tab. 3.3). Neben den Microarrayanalysen zur genomweiten Methylierungsanalyse von Patientinnen mit und ohne Rezidiv wurde in einer weiteren Hybridisierung cisplatinresistente Hey-Zellen mit deren Wildtyp (cisplatin sensitiv) verglichen. Vor der Hybridisierung der Proben mussten die jeweiligen Hybridisierungspaare mit den Fluoreszenzfarbstoffen AlexaFluor 3 (grüne Fluoreszenz) bzw. AlexaFluor 5 (rote Fluoreszenz) markiert werden. Um Unterschiede in den Fluoreszenzeigenschaften der beiden Farbstoffe auszugleichen, wurden beide Proben eines Pools jeweils AlexaFluor 3 oder 5 markiert (Tab. 3.3). Die Markierung basierte auf dem Einbau von fluoreszierenden Nukleotiden mittels exo-Klenow Fragment und unspezifischen Primern (Lieu *et al.* 2005). Dabei wurde die DNA gleichzeitig um das vielfache amplifiziert. Tab. 3.3 zeigt die Ausbeuten markierter DNA. Ausgenommen Probe B2 MIRA II, welche infolge der geringen Anreicherung durch MIRA (Abschnitt 3.1.1) nach der Fluoreszenzmarkierung lediglich ca. 500 ng (9 ng/µl) aufwies, zeigten alle anderen Patientenproben eine ausreichende Markierung mit 14 bis 30 pmol/µg Farbstoffgehalt und einer DNA-Menge von mindestens 2,5 µg.

Tab. 3.3 Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierungsschema der Proben

Pool / Probe	Fluoreszenzmarkierung (55 µl Elution)				Hybridisierung		
	Farbstoff	DNA Konz. [ng/µl]	Farbstoff [pmol/µg]	260/280	DNA [µl]	DNA [ng]	Array ID*
A 1 MIRA I	 Alexa Fluor 3	72	14	1,90	40,50	2916	1_1
B 1 MIRA II	 Alexa Fluor 5	79	23	1,86	37,00	2923	
A 1 MIRA II	 Alexa Fluor 5	73	26	1,89	33,30	2431	1_2
B 2 MIRA I	 Alexa Fluor 3	45	16	1,99	54,00	2430	
A 2 MIRA I	 Alexa Fluor 3	101	15	1,87	5,00	505	2_1
B 2 MIRA II	 Alexa Fluor 5	9	30	1,85	54,00	486	
A 2 MIRA II	 Alexa Fluor 5	50	21	1,95	50,80	2540	2_2
B 1 MIRA I	 Alexa Fluor 3	47	17	1,93	54,00	2538	
Hey sensitiv	 Alexa Fluor 3	15	20	1,88	52,00	780	4_1
Hey resistent	 Alexa Fluor 5	81	24	1,88	9,70	786	

* Array ID: 25288631000x_x

Die Markierung der DNA aus Hey-Zellen erbrachte 810 ng (15 ng/µl) bzw. 4,4 µg (81 ng/µl) (Tab. 3.3). Die Anteile der eingesetzten DNA für eine Hybridisierung sollten laut Protokoll „Agilent Microarray Analysis of Methylated DNA Immunoprecipitation“ V2.0 jeweils 2,5 µg bis 5 µg betragen. Diese Bedingungen konnten für den Array 252886310001_1, 1_2 und 2_2 erfüllt werden (Tab. 3.3). Durch die begrenzte DNA-Menge der Probe B2 MIRA II und Hey cisplatinresistent konnte Array 2_1 und 4_1 lediglich mit je 500 ng bzw. 764 ng DNA hybridisiert werden.

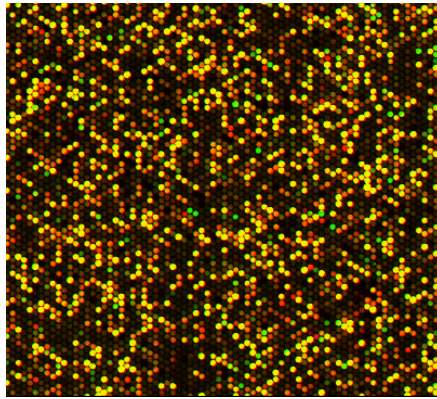


Abb. 3.3 Visuelles Beispiel einer CpG-Island Microarray Hybridisierung
Ausschnitt aus Array 1_1. Jeder Punkt entspricht einer spezifischen Sonde. Die Farben repräsentieren die Hybridisierung der Alexa Fluor 3 (grün) und Alexa Fluor 5 (rot) markierten Proben.

Nach 40 stündiger Hybridisierung wurden die Arrays gescannt (Abb. 3.3) und die Signale der rund 400.000 Spots mit Feature Extraction Software ausgelesen und normalisiert. Neben den Signalen und daraus errechneten Werten für jede Sonde wurde ein Qualitätsreport für jeden Microarray erstellt. Dieser beinhaltete die durchschnittlichen Signalwerte und Hintergrundfluoreszenzen sowie deren Verteilung und Anordnung auf den Microarrays. Im weiteren Abschnitt sind die Abbildungen des Qualitätsreports jeweils exemplarisch für Array 252886310001_1 gezeigt, Abbildungen für die anderen drei Microarrays sind im Anhang (auf beiliegender CD) zu finden.

Im ersten Schritt der Extraktion wurde ein Gitter zur genauen Positionierung jeder Sonde über den Array gelegt und anhand der vier Ecken eines Array überprüft (Abb. 3.4 A).

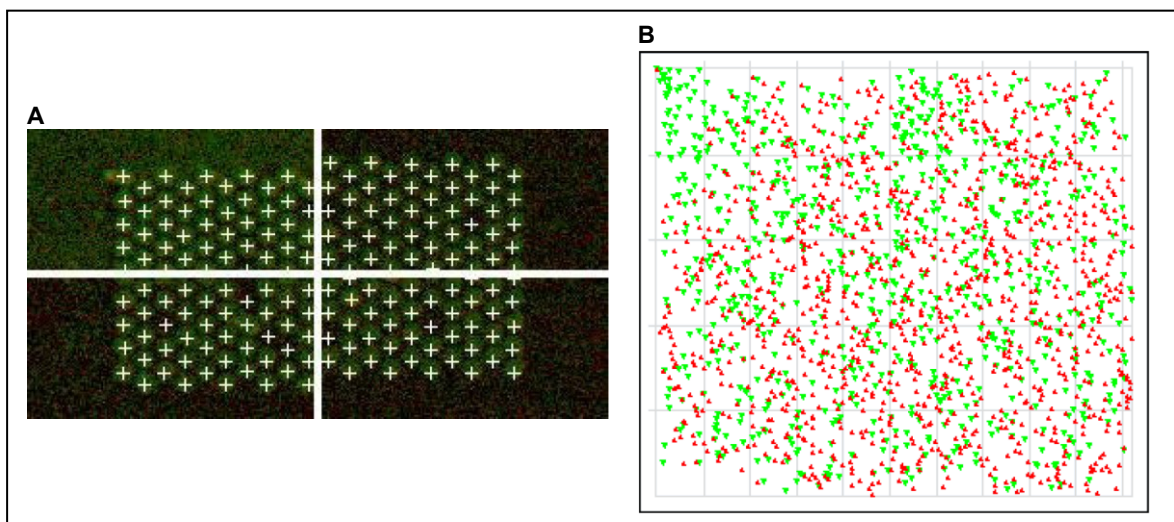


Abb. 3.4 Platzierung des Gitternetzes zur Ortung der Spots (A) und räumliche Verteilung pos. und neg. LogRatios (B) am Beispiel des Array 1_1

A: Feature Extraction Software ordnet jedem Spot mittels eines „Grid-Template“ die Position der Sonden zu. Die Qualität der Zuordnung wird anhand der vier Ecken des Arrays bestimmt. B: Die Signale von 5000 zufälligen Sonden sind überwiegend räumlich gleichverteilt, was auf eine gleichmäßige Hybridisierung schließen lässt. Rot: positive LogRatios; grün: negative LogRatios.

Bei allen Microarrays wurde das Gitter richtig positioniert („IsGoodGrid=1“ Tab. 3.4). Die Zuordnung ist Voraussetzung für die Extraktion der Eigenschaften jeder Sonde aus der digitalen hochauflösenden Grafik des Arrays. Ob eine Hybridisierung gleichmäßig über die gesamte Fläche des Microarrays erfolgte, lässt sich anhand der räumlichen Verteilung positiver und negativer Verhältnisse des grünen und roten Signals (LogRatio) bestimmen. Wie in Abb. 3.4 B exemplarisch für Array 1_1 zu sehen ist, und für die weiteren Arrays ebenfalls galt (siehe Anhang, beiliegende CD), waren die Signale für hyper- und hypomethylierte Signale gleichmäßig verteilt.

Tab. 3.4 Feature Extraction Software Qualitätsreport für die Microarrays

Qualitätsmerkmal	Array 1_1	Array 1_2	Array 2_1	Array 2_2	Array 4_1	Sollwert
IsGoodGrid	1	1	1	1	1	1
Non Uniform Outlier [%]	0,07	0,06	0,04	0,08	0,03	
Population Outlier [%]	0,03	0,02	0,03	0,03	0,04	
g_BGNoise	2,87	2,83	2,16	2,09	1,95	< 10,0
g_Signal2Noise	4,78	3,18	2,17	4,23	3,33	
g_SignalIntensity	13,70	8,99	4,68	8,85	6,50	
r_BGNoise	2,24	2,41	2,10	2,25	1,83	< 10,0
r_Signal2Noise	9,02	9,68	2,58	8,78	30,58	
r_SignalIntensity	20,15	23,33	5,43	19,74	55,87	

IsGoodGrid, räumliche Zuordnung der Sonden; Non Uniform / Population Outlier, systematische Fehler / Ausreißer; BGNoise, Hintergrundfluoreszenz; Signal2Noise, Signal-Hintergrund Verhältnis; SignalIntensity, Signalintensität; g, grün; r, rot.

Anormale Spots, welche durch Fremdkörper oder Fehler beim Scannen eine ungleichmäßige Fluoreszenz der Sonden selbst oder des lokalen Hintergrundes aufwiesen, wurden als „Non Uniform Outlier“ klassifiziert, was einem systematischen Fehler entspricht. Gleichmäßig fluoreszierende Spots deren Signale ein bestimmtes Konfidenzintervall überschritten, sind so genannte echte „Ausreißer“ und wurden als „Population Outlier“ klassifiziert. Die Anteile an anormalen Sonden sind für jeden Array in Tab. 3.4 gezeigt. Im Mittel waren 0,056 % der Spots mit systematischen Fehlern (Non Uniform Outlier) behaftet und 0,03 % aller Sonden waren Ausreißer mit ungewöhnlich hoher Fluoreszenz (Population Outlier). Im Vergleich unterschieden sich die vier Arrays kaum in der Anzahl anormaler Spots. Im schlechtesten Fall konnte lediglich jede 909. Sonde (Array 2_2) nicht ausgewertet werden. Den Wert, welcher das spezifische Signal jeder Sonde beschreibt, berechnet sich aus der Signalintensität abzüglich des gemessenen Hintergrundsignals. Die mittlere Signalintensität und das mittlere Hintergrundsignal sind in Tab. 3.4 für jeden Array dargestellt. Der Hintergrund sollte einen Sollwert von 10 nicht überschreiben, da sonst davon auszugehen ist, dass die Hybridisierung oder der Waschvorgang der Microarrays fehlerhaft verlaufen ist. Alle fünf Arrays zeigten eine Hintergrundfluoreszenz von unter 2,9. Die Hybridisierung des Array 2_1 mit nur 500 ng DNA spiegelte sich in den

Signalintensitäten wider. Arrays, welche mit mindestens 2,4 µg DNA hybridisiert wurden, zeigten vor allem im roten Kanal ein deutlich höheres Signal (Tab. 3.4).

Ein wichtiger Indikator für eine spezifische Hybridisierung und Auswertbarkeit ist das Verhältnis zwischen Hintergrund und Signalintensität. Für die Anwendung MIRA - angereicherter DNA gibt es jedoch keine vorgegebenen Grenzwerte seitens des Chip-Herstellers. Erfahrungsgemäß ist aber ein Verhältnis von mindestens 3 ausreichend. Dieses Kriterium erfüllten die Arrays 1_1, 1_2, 2_2 und 4_1 (Tab. 3.4).

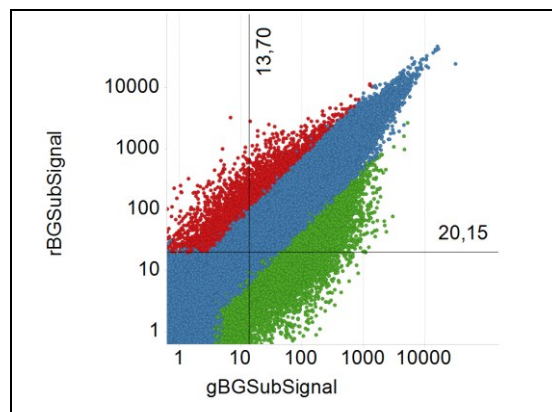


Abb. 3.5 Gegenüberstellung der roten und grünen hintergrundkorrigierten Signale des Array 1_1
Die Linearität des Plots beweist die einwandfreie Normalisierung der Signale gegen den Hintergrund durch Feature Extraction Software. Die vertikale und horizontale Linie zeigt jeweils den medianen Signalwert. Sonden aus hypomethylierten ($\text{Log}_2\text{Ratio} < -2,0$; grün) und hypermethylierten ($\text{Log}_2\text{Ratio} > 2,0$; rot) Regionen sind farblich hervorgehoben.

In Abb. 3.5 wurden die hintergrundsabtrahierten Signale (BGSubSignal) der beiden Farbkanäle gegenübergestellt, um eine Aussage zum Wert der Normalisierung gegen den Hintergrund zu treffen. Die Ausprägung der BGSubSignals verhielt sich über die Population hinweg linear. Zu sehen ist weiterhin, dass sich die mittleren Signalintensitäten (vertikale und horizontale Linie, Abb. 3.5) ebenfalls auf der Regressionsgeraden schneiden. Um die Populationen von Signalen, welche signifikante Unterschiede zwischen zwei Patientengruppen darstellten hervorzuheben, wurden diese rot ($\text{Log}_2\text{Ratio} > 2,0$) bzw. grün ($\text{Log}_2\text{Ratio} < -2,0$) markiert (Abb. 3.5).

3.1.3 Detektion differentiell methylierter Regionen

Zur genomweiten Detektion differentiell methylierter Regionen (DMR) wurden Agilent Custom SurePrint G3 ChIP-on-chip / DNA Methylation 2x400K Microarrays verwendet, welche die Sonden des regulären Agilent Human CpG Island Microarray 1x244K als Duplikat enthalten. Durch die Verwendung kundenspezifischer 2x400K Arrays konnten die Kosten der Analysen gesenkt und die Qualität der Daten durch Duplikate jeder Sonde gesteigert werden. Insgesamt 199.419 verschiedene Sonden, die 27.800 CpG-Inseln (21 MB) in einem mittleren Abstand von 95 bp abdecken, detektieren quantitativ hybridi-

sierte DNA. Um einzelne, durch fehlerhafte Hybridisierung detektierte Werte und unrelevante Methylierungsunterschiede sehr kurzer DNA-Bereiche (< 100 bp) auszugleichen bzw. auszuschließen, sind zur Detektion von DMR die Mittelwerte von jeweils drei aufeinander folgenden Sonden gebildet worden (3er MW). Die durch 3er Mittelwerte einschließenden Sequenzen sind im Mittel 285 bp lang.

Das Maß für die vergleichende Methylierung zwischen den jeweils hybridisierten Proben wird im Weiteren als Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses von rotem zu grünem Signal angegeben (Log2Ratio). Da die Proben der Verlaufsgruppen nicht einheitlich mit jeweils demselben Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, sondern auf Array 1_2 und 2_1 entgegengesetzt markiert wurden, werden die Daten dieser als *additiv inverses* (Gegenzahl) angegeben. Bei vorausgegangen Microarrayexperimenten und deren Validierung mittels q-MS-PCR, anhand DNA aus Tumor- und Normalgeweben der Zervix hat sich gezeigt, dass arraybasierte Werte > 1,5 bzw. < -1,5 (Log2Ratio) validierbare Unterschiede in der Anreicherung und somit in der Methylierung zeigen. Ab einem vierfachen Unterschied ($|\text{Log2Ratio}| > 2,0$) wurden deutliche Unterschiede gemessen.

Die Anzahl unterschiedlich methylierter DNA Regionen ($|\text{Log2Ratio}| > 1,5$) schwankt unter den vier Microarrays von 735 hypermethylierten (Array 2_1) bis 8800 hypomethylierten (Array 1_1) Regionen deutlich (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Anzahl differentiell methylierter Regionen (3er MW) über einem Grenzwert

Array* / Pool	Log2Ratio < -1,5	Log2Ratio > 1,5
1_1 / A1 vs. B1	8800	2079
1_2 / A1 vs. B2	8272	1584
2_1 / A2 vs. B2	1900	735
2_2 / A2 vs. B1	1955	3157
Summe Log2Ratio der "3er MW" (~185 bp) aller 4 Arrays	Array-Σ Log2Ratio < -4,0	Array-Σ Log2Ratio > 4,0
	5449	899
	Array-Σ Log2Ratio < -7,5	Array-Σ Log2Ratio > 4,2
	729	749

* Array ID: 25288631000x_x; Array- Σ Log2Ratio, Summe der Log2Ratios aller vier Microarrays.

Zur Eingrenzung der DMR und Auswahl der Kandidatengene, welche validiert werden sollten, ist die Summe (Array- Σ) der Methylierung (Log2Ratio) der vier Microarrays für jede Region (3er MW) gebildet worden. Dabei zeigte sich bei Betrachtung der Anzahl von Regionen mit einer Array- Σ < -4,0 bzw. > 4,0, dass hypomethylierte Regionen ca. 6fach häufiger vertreten waren, als hypermethylierte Regionen (Tab. 3.5). Um eine äquivalente Anzahl betrachten zu können, sind die Grenzwerte für die Array- Σ auf -7,5 für hypomethylierte und 4,2 für hypermethylierte Regionen gesetzt worden. Somit ergaben sich 729 bzw. 749 DMR, die zur weiteren Auswahl von Kandidatengenen / -regionen genutzt wurden (Tab. 3.5).

Im darauf folgenden Auswahlverfahren wurde die Größe der differentiell methylierten DNA-Regionen weiter erhöht, sodass mindestens drei aufeinander folgende 3er Mittelwerte die vorherigen Kriterien erfüllen mussten. Dadurch erhöhte sich die durchschnittliche Größe auf 475 bp, detektiert durch fünf fortlaufende Sonden. Aus 220 differentiell methylierten Regionen (103 hypomethyliert, 117 hypermethyliert) wurden anschließend die zu validierenden Kandidatengene (37) ausgewählt (Tab. 3.6 und Tab. 3.7 nächste Seite).

Tab. 3.6 Anzahl differentiell methylierter Regionen (ca. 475 bp) mit min. 3 aufeinander folgenden 3er MW und Auswahl für die Validierung mit q-MS-PCR

	Array-Σ Log2Ratios < -7,5	Array-Σ Log2Ratios > 4,2	gesamt
Anzahl DMR	103	117	220
davon ausgewählte DMR für Validierung mit q-MS-PCR	18	19	37

Durch eine Kooperation des Labors mit der Arbeitsgruppe von Prof. Meindl vom Klinikum rechts der Isar in München lagen Daten aus genomweiten Expressionsanalysen von acht der zwölf in den CpG-Island Microarrayanalysen verwendeten Tumoren vor. Zehn Gene, die auch in der Expression Unterschiede zwischen den Verlaufgruppen zeigten, wurden für die Validierung mittels q-MS-PCR ausgewählt, gefolgt von 19 Genen, die expressionsunabhängig in der Liste differentiell methylierter Regionen am stärksten, umfangreichsten und in der Mehrzahl der Hybridisierungsansätze hyper- oder hypomethyliert waren (Tab. 3.7). Weitere vier Gene wiesen interessante Genfunktionen (Signaltransduktion, Tumorsuppressoren, Onkogen) auf und die DMR betraf den Promotorbereich oder das 1. Exon (Tab. 3.7). Bei weiteren genomweiten CpG-Island Microarrayanalysen ist die DNA-Methylierung von Hey-Zellen, einer cisplatinempfindlicher Ovarialkarzinomzelllinie, mit DNA aus cisplatinresistenten Hey-Zellen (erhalten von der AG Prof. Meinhold-Heerlein, Universitätsklinikum Aachen) (Brautigam *et al.* 2009) verglichen worden. Vier differentiell methylierte Regionen (*CAMK2N1*, *HPDL*, *LMX1B*, *RASGRP2*) zeigten auch bei diesem Versuch eine deutlich unterschiedliche Methylierung zwischen den beiden Zelllinien und wurden in die Validierung eingeschlossen (Tab. 3.7, nächste Seite).

Tab. 3.7 Für die Validierung ausgewählte 37 differentiell methylierte Genregionen nach Kriterien

Auswahl-Kriterium	Sonden		CpG Island		Gene Symbol	Lokalisation Methylierung*	Σ Log2 Ratio
	Lfd. Position	Lfd. Nr.	UCSC- Name	Chr			
differentielle Expression und differentielle Methylierung	7837 - 7841	1094	CpG: 146	1	TACSTD2	INSIDE	-9,11
	36297 - 36302	4580	CpG: 18	3	RBP1	INSIDE	9,05
	41130 - 41138	5224	CpG: 134	4	PROM1	PROMOTER	-9,73
	60372 - 60381	7609	CpG: 60	6	RUNX2	PROMOTER	5,24
	86600 - 86606	10956	CpG: 118	9	TMOD1	INSIDE	-9,02
	96947 - 96951	12265	CpG: 66	10	PAX2	PROMOTER	5,78
	105496 - 105501	13316	CpG: 96	11	RCOR2	INSIDE	5,09
	133919 - 133924	16922	CpG: 81	15	SCAMP5	INSIDE	-8,90
	151483 - 151491	19221	CpG: 23	17	TMEM101	PROMOTER	-9,90
157849 - 157853	20006	CpG: 142	18	EMILIN2	INSIDE	6,07	
sehr stark hypermethyliert bei rezidivfreiem Verlauf	166735 - 166740	21204	CpG: 133	19	CLEC4G	INSIDE	-12,52
	14944 - 14950	1975	CpG: 84	1	PROX1	PROMOTER	-11,92
	178427 - 178432	22822	CpG: 42	19	ZNF671	PROMOTER	-11,91
	39459 - 39469	4978	CpG: 189	4	SPON2	INSIDE	-11,70
	39444 - 39449	4977	CpG: 47	4	SPON2	INSIDE	-10,99
	79280 - 79286	10062	CpG: 88	8	MSC	INSIDE	-9,62
	159066 - 159072	20144	CpG: 130	18	DSC3	INSIDE	-9,47
	139291 - 139298	17618	CpG: 59	16	ATF7IP2	PROMOTER	-9,33
	185362 - 185372	23697	CpG: 61	21	GRIK1	INSIDE	-9,25
6911 - 6918	984	CpG: 149	1	LRRC41	INSIDE	-9,18	
sehr stark hypermethyliert bei Verlauf mit Rezidiv < 3 Jahren	175098 - 175102	22325	CpG: 40	19	GRLF1	INSIDE	7,11
	22081 - 22086	2808	CpG: 166	2	ATOH8	PROMOTER	7,33
	37401 - 37405	4694	CpG: 39	3	MECOM	PROMOTER	7,66
	159574 - 159578	20205	CpG: 23	18	KATNAL2	INSIDE	7,90
	49280 - 49287	6176	CpG: 68	5	PDE4D	PROMOTER	8,46
	125660 - 125664	15929	CpG: 52	14	ATL1	INSIDE	8,49
	37557 - 37561	4712	CpG: 20	3	SLC2A2	PROMOTER	9,41
	4043 - 4050	597	CpG: 311	1	RUNX3	INSIDE	11,59
	114097 - 114105	14382	CpG: 63	12	KRT86	INSIDE	11,79
Methylierung im Promotor oder 1. Exon + inter. Genfunktion	32202 - 32207	4079	CpG: 170	3	CSPG5	PROMOTER	5,92
	36877 - 36882	4639	CpG: 53	3	FAM194A	PROMOTER	-9,21
	55517 - 55521	6961	CpG: 169	5	HNRNPH1	PROMOTER	5,40
	142586 - 142598	18040	CpG: 294	16	HSF4	PROMOTER	8,28
Auch im Array cisplatinresisten- ter Hey Zellen hypermethyliert	3513 - 3518	515	CpG: 245	1	CAMK2N1	INSIDE	6,49
	6798 - 6803	969	CpG: 95	1	HPDL	INSIDE	-8,23
	88240 - 88245	11156	CpG: 394	9	LMX1B	PROMOTER	-9,36
	105942 - 105949	13362	CpG: 297	11	RASGRP2	PROMOTER	5,16

*Lokalisation der Methylierung: INSIDE, OFR; PROMOTER, vor Transkriptionsstart.

3.2 Etablierung der quantitativen methylierungsspezifischen PCR

Zur Validierung der differentiell methylierten Gene wurde das Verfahren der quantitativen methylierungsspezifischen PCR gewählt (Herman *et al.* 1996). Die durch Bisulfitbehandlung konvertierte, ursprünglich methylierte DNA (Frommer *et al.* 1992) wird durch spezifische Primer amplifiziert und im SybrGreen Verfahren quantitativ detektiert.

3.2.1 Ausbeute und Effizienz der Bisulfitbehandlung

In jede Bisulfitbehandlung wurden 300 ng DNA eingesetzt und bei DNA aus Gefrierewebe eine Ausbeute von mindestens 80 % erreicht. Bei Verwendung von FFPE-Gewebe ist die Ausbeute weitaus geringer und abhängig vom Grad der DNA-Fragmentierung (Abb. 3.6). Es zeigte sich, dass eine Bisulfitbehandlung von Fragmenten unter 500 bp kaum möglich ist. Aber auch geringe Fragmentierungsgrade beeinträchtigen die Ausbeute im Vergleich zu hochmolekularer DNA aus Zellkulturen wie zum Beispiel Keratinozyten. Die Ausbeute einer Bisulfitbehandlung korreliert somit mit der Qualität eingesetzter genomischer DNA (Abb. 3.6).

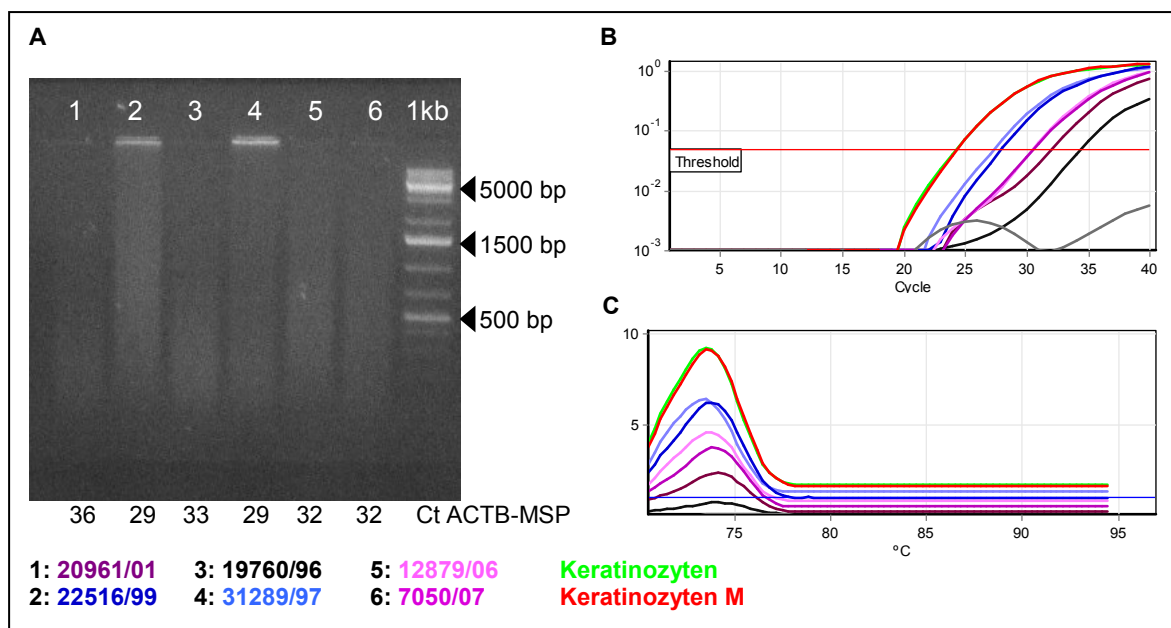


Abb. 3.6 Qualität der genomischen DNA korreliert mit der Ausbeute bisulfitbehandelter DNA

Aus FFPE-Gewebe isolierte genomische DNA (500 ng), aufgetragen auf ein 1,25 % iges Agarosegel mit Ethidiumbromid zeigt den Grad der Fragmentierung (A). Ausbeute bisulfitbehandelter DNA nimmt im Vergleich zu hochmolekularer Keratinozyten DNA (grün, rot) stark ab, gemessen mittels β -Actin q-MS-PCR (Amplifikation, B; Schmelzkurve, C). B: Diagramm / Funktion der normalisierten Fluoreszenz (Norm. Fluoro.) in Abhängigkeit vom PCR Zyklus (Cycle). C: Diagramm / Funktion der zeitlichen Änderung der Fluoreszenz (dF/dt) in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur (°C).

Die vollständige Konversion der nicht methylierten Cytosine ist für die spätere quantitative Analyse der Methylierung von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurde die Effizienz der Bisulfitbehandlung nach jeder Konversion mit bisulfit-DNA spezifischen

Primern aus einer Region des β -Actin Gens (*ACTB*) überprüft. Diese Primer enthalten keine Guanin-assoziierten Cytosine, sodass diese bisulfitspezifisch aber nicht spezifisch für differentielle CpG-Methylierung sind. Bei der Amplifikation mit Primern für genomische (nicht konvertierte) DNA sollte nach Bisulfidbehandlung kein Produkt amplifiziert werden können. Der Test mit DNA aus Keratinozyten (Abb. 3.7) zeigt beispielhaft die Amplifikation mit bisulfid-DNA spezifischen sowie genomischen Primern. Mit letzteren wird bisulfidbehandelte DNA nicht, oder im Vergleich zu genomischer DNA nur im ganz geringen Maße amplifiziert ($\Delta\Delta Ct=9,73$) (Abb. 3.7 A). Dies traf auf alle untersuchten bisulfidbehandelten DNA Proben zu.

Die Amplifikation mit bisulfitspezifischen Primern lässt auf die Spezifität der Primern an sich schließen. Wurde ausschließlich bisulfidbehandelte DNA amplifiziert, sind die Primer spezifisch (Abb. 3.7 B). Die Prüfung auf Spezifität wurde für alle verwendeten Primer durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.2).

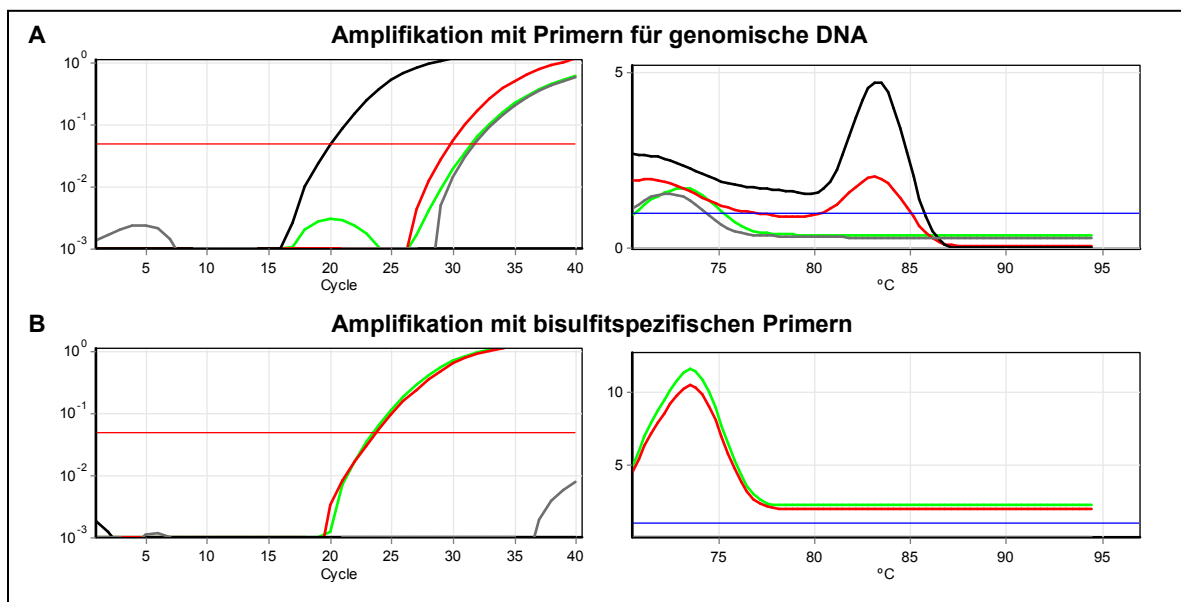


Abb. 3.7 Bestimmung der Bisulfidbehandlungseffizienz mittels quantitativer MS-PCR

Die Effizienz der Bisulfidbehandlung kann mit spezifischen Primern für genomische (A) und bisulfidbehandelte (B) DNA überprüft werden (Amplifikation, links; Schmelzkurve, rechts). Verwendet wurde in diesem Beispiel 5 ng DNA aus Keratinozyten: bisulfidbehandelt, grün; *in vitro* methyliert und bisulfidbehandelt, rot; genomisch, schwarz; NTC, grau.

3.2.2 Etablierung methylierungsspezifischer Primer

Im Zuge der Validierung wurden für jedes der 37 Gene / Regionen methylierungsspezifische Primer entworfen. Durch richtige Wahl der Anzahl und Verteilung von CpG Dinukleotiden und nicht Guanin-assoziierten Cytosinen konnten spezifische Primer für bisulfidbehandelte DNA etabliert werden (Herman *et al.* 1996). Inwieweit eine quantitative Aussage zur DNA-Methylierung der Proben möglich ist, wurde mittels bisulfidbehandelter, nativer und *in-vitro* methylierter Kontroll-DNA aus kultivierten Keratinozyten mit q-MS-PCR

untersucht (Abb. 3.8). Mischungen mit einem Anteil von 100 %, 10 % und 1 % *in-vitro* methylierter DNA zeigten für jedes Primerpaar der 5 Kandidatengene (siehe Abschnitt 3.4: *RUNX3*, *KATNAL1*, *ATL1*, *CAMK2N1*, *KRT86*,) jeweils einen ΔC_t von mindestens 3 zueinander.

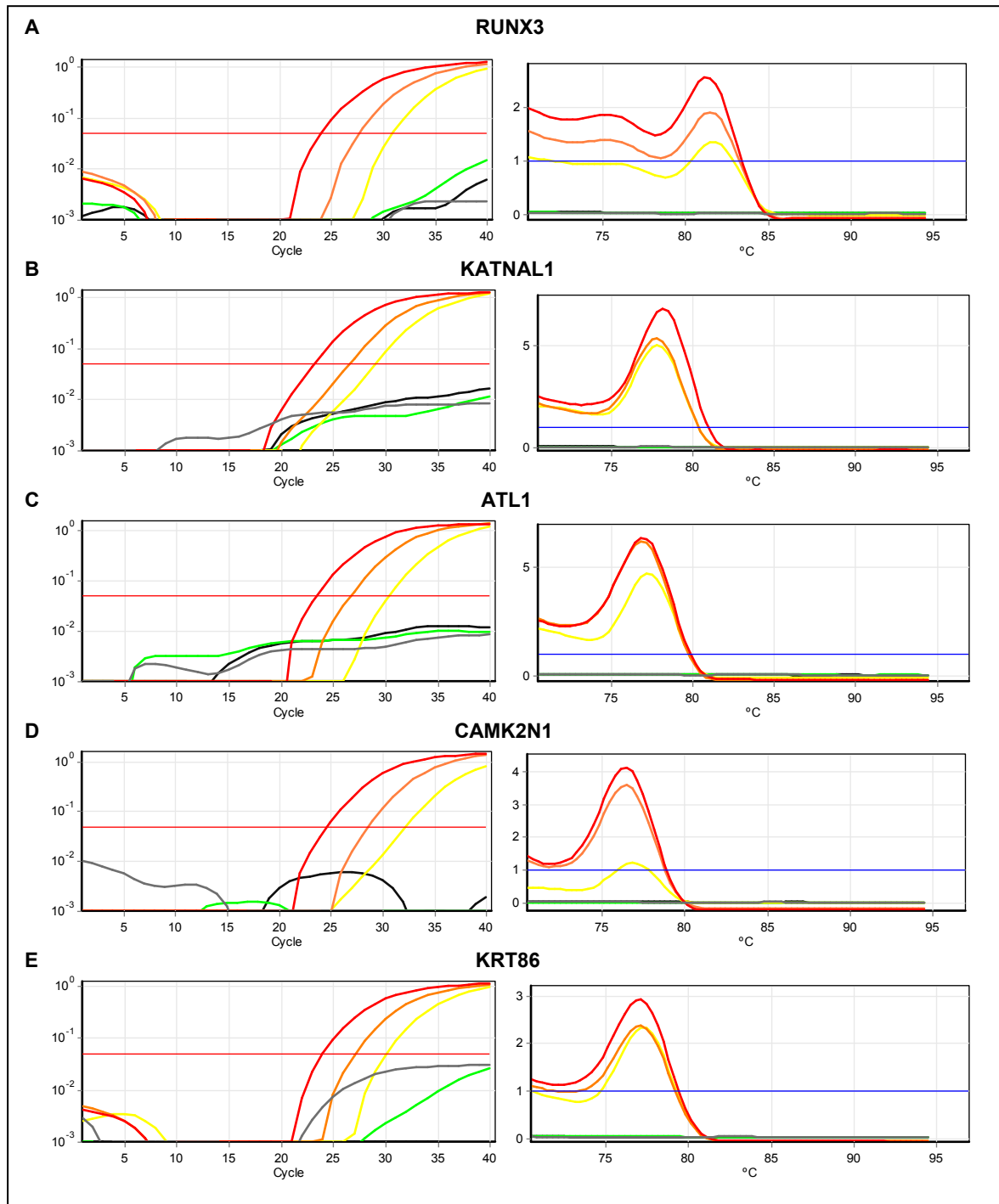


Abb. 3.8 Etablierung methylierungsspezifischer Primer
 q-MS-PCR (Amplifikation, links; Schmelzkurve, rechts) von 5 ng bisulfithandelter, anteilig nativer und *in-vitro* methylierter Keratinozyten-DNA (nativ, grün; 1 % methyliert, gelb; 10 % methyliert, orange; 100 % methyliert, rot; NTC, grau) mit den methylierungsspezifischen Primern für die 5 Kandidatengene (*RUNX3* F3R3, A; *KATNAL1* F1R1, B; *ATL1* F1R1, C; *CAMK2N1* F1R1, D; *KRT86* F2R1,E).

Da in jedem Fall eine Amplifikation der Kontrolle mit 1 % in-vitro methylierter DNA erfolgte, konnten folglich mindestens eine unter 100 im jeweiligen Bereich methylierten Zellen detektiert werden. In der Regel enthält jede Zelle durchschnittlich 5 pg DNA, was bei Einsatz von 5 ng je PCR-Reaktion etwa 1000 DNA-Kopien oder 500 Zellen entspricht. Somit ist die hier angewendete PCR so sensitiv, dass weniger als 5 Zellen mit Methylierung in der untersuchten Region nachzuweisen sind.

Abb. 3.8 zeigt weiterhin, dass die DNA der kultivierten Keratinozyten in den Primerregionen der fünf Kandidatengene unmethyliert war. Dies trifft ebenso auf alle 37 ausgewählten DMR zu, was durch Mitführung der Kontroll-DNA in allen PCR-Ansätzen bewiesen wurde.

3.2.3 Effizienz der quantitativen methylierungsspezifischen PCR

Die PCR-Effizienz der fünf Kandidatengene (aus Abschnitt 3.4) wurde anhand von 48 Gefriergeweben und 33 FFPE-Geweben, welche in der Validierung der Kandidatengene verwendet wurden, bestimmt. Durch lineare Regression ermittelte die Roter-Gene Q Software die Effizienz jeder einzelnen Amplifikation und berechnete den Mittelwert für alle ausgewählten amplifizierbaren Proben eines Primerpaares (Tab. 3.8).

Tab. 3.8 Mittlere q-MS-PCR Effizienzen der Kandidatengene mit Standardabweichung

Kandidatengen	Gefriergewebe	FFPE-Gewebe
RUNX3	1,74 ± 0,04	1,73 ± 0,07
KATNAL1	1,78 ± 0,01	1,80 ± 0,03
ATL1	1,81 ± 0,02	1,86 ± 0,06
CAMK2N1	1,82 ± 0,03	1,71 ± 0,05
KRT86	1,80 ± 0,04	1,79 ± 0,03
Mittelwert	1,79	1,78

Die mittleren PCR-Effizienzen der Gefriergewebe unterscheiden sich zu denen der FFPE-Gewebe kaum und liegen im Mittel bei 1,78. Jedoch war die Standardabweichung und somit die Schwankung zwischen den einzelnen Proben bei FFPE-Gewebe in den meisten Fällen höher.

3.3 Validierung der Microarrays und differentiell methylierten Regionen

3.3.1 Validierung mit quantitativer methylierungsspezifischer PCR

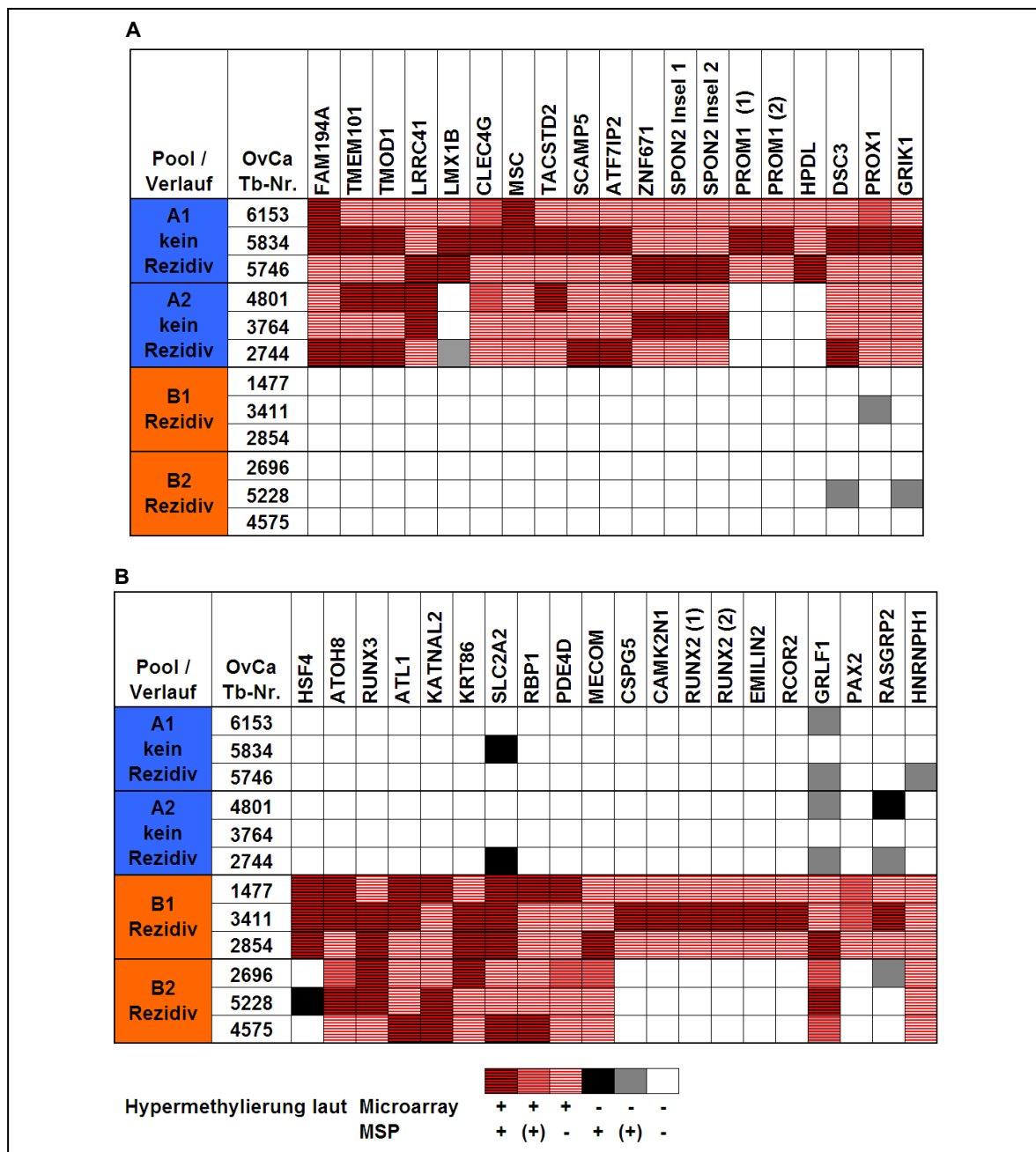


Abb. 3.9 Durch Microarrayanalysen detektierte differentiell methylierte CpG-Inseln / Genregionen und deren Validierung mit quantitativer methylierungsspezifischer PCR (q-MS-PCR) Achtzehn bei rezidivfreien Verlauf hypermethylierte ausgewählte Regionen (A), und 19 Regionen mit einer Hypermethylierung in den Gruppen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren (B). Die detektierte Methylierung mit CpG-Microarrays (rot punktiert) betrifft jeweils einen DNA-Pool (rezidivfreier Verlauf, blau; Verlauf mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren, orange). Eine Zuordnung der Methylierung zu den einzelnen Tumoren eines Pools ist nicht möglich. Mittels q-MS-PCR wurden die Arraydaten validiert und die Methylierung der einzelnen Tumore aufgeklärt.

Um die Ergebnisse der vier Microarrays zu validieren und Kandidatengene mit prognostischer Wertigkeit zu finden sind 37 DMR mittels q-MS-PCR validiert worden. Drei EOC bildeten bei der genomweiten Methylierungsanalyse jeweils einen Pool, sodass eine

patientenspezifische Auswertung nicht möglich war. Die Validierung diente deshalb gleichzeitig der Aufklärung der einzelnen Proben (Abb. 3.9). In 95 % (140 von 148) der Fälle wurde das Ergebnis der Microarrays bestätigt, heißt, die Anzahl der durch q-MS-PCR ermittelten hypermethylierten Proben in einem Pool überwog in dem jeweils als hypermethyliert detektierten Pool gegenüber dem nicht methylierten Pool. Außerdem bestätigte sich, dass im Vergleich von Pool A1 zu A2 und B1 zu B2 der Pool 1 jeweils mehr Methylierungsunterschiede (Hypermethylierung) zeigte. Ein Pool galt in den genomweiten Methylierungsanalysen dann als hyper- / hypomethyliert, wenn er in einem Microarray eine $|\text{Log}_2\text{Ratio}|$ von $> 1,5$ (3er Mittelwerte) aufwies. Vorangegangene Microarrayanalysen zeigten, dass solche Unterschiede valide sind (siehe Abschnitt 3.1.3). Ausnahmen bildeten die Genregionen *RASGRP2* und *HNRNPH1*. Letzteres war in den Pools B1 und B2 schwach hypermethyliert, was aber mit q-MS-PCR nicht bestätigt werden konnte. Im Gegenteil, der Tumor 5746 aus Pool A1 zeigte eine schwache Methylierung. Bei alle anderen Proben konnte keine Methylierung nachgewiesen werden. *RASGRP2* ergab ein ähnlich kontroverses Bild und hätte auf Arrayebene in Pool A2 eine deutliche Hypermethylierung zeigen müssen (Abb. 3.9). Geringe Differenzen, die das Endergebnis nicht beeinflussen sind bei den Genen *LMX1B*, *HSF4* und *SLC2A2* zu finden (Abb. 3.9).

Bei den genomweiten CpG-Insel Microarrayanalysen der cisplatinresistenten und parental sensitiven Hey Zellen, wurden die vier differentiell methylierte Regionen (*CAMK2N1*, *HPDL*, *LMX1B*, *RASGRP2*), die auch in den Analysen der Verlaufsgruppen (rezidivfrei vs. Rezidiv) differentielle Methylierung zeigten, validiert. In Abb. 3.18 (Abschnitt 3.6) sind die q-MS-PCR Ergebnisse zu sehen. *HPDL* und *CAMK2N1* erfuhren eine Methylierung im Vergleich zu vollständig unmethylierten Genen in sensitiven Zellen. Eine schwache Methylierung in sensitiven und starke Methylierung in resistenten Zellen wurde bei *LMX1B* nachgewiesen. Dies bestätigte jeweils die Ergebnisse aus den Microarrayanalysen. Einzig *RASGRP2* konnte, wie auch schon in den Microarrays oben, nicht validiert werden.

3.3.2 Aufklärung der CpG-Methylierung mittels Next-Generation Sequencing

Um die Methylierung der einzelnen CpG Dinukleotide der letztlich sechs Kandidatengene (Abschnitt 3.4.1) aufzuklären, wurden die entsprechenden differentiell methylierten DNA-Regionen der 12 für die Microarrayanalysen verwendeten Tumore tiefensequenziert (Next-Generation-Sequencing, Abb. 3.10).

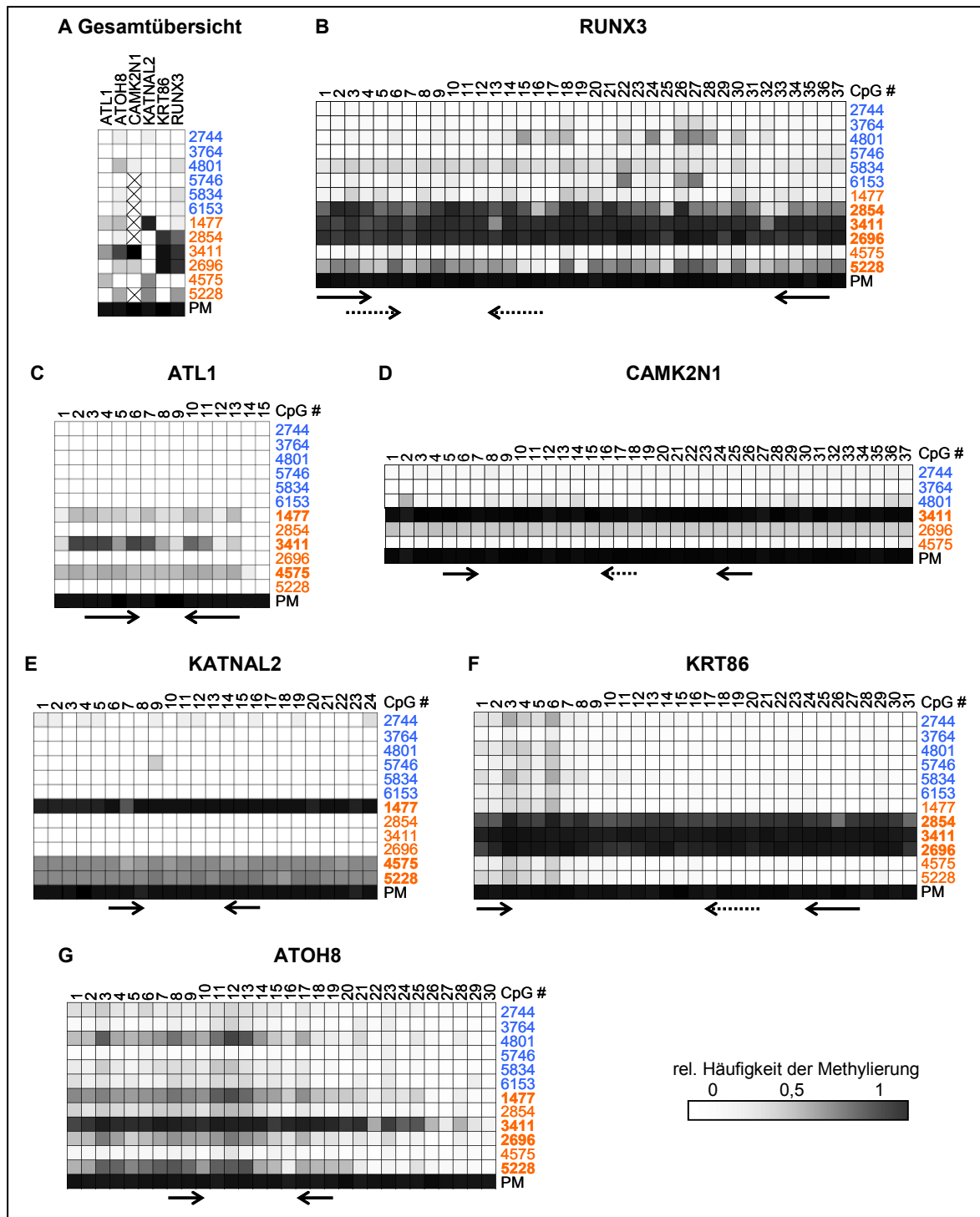


Abb. 3.10 Next-Generation Bisulfitsequenzierung von Kandidatengenen zur quantitativen Bestimmung der Methylierung in den differentiell methylierten Regionen
 A: Durchschnittliche relative Methylierung der Kandidatengene in den jeweiligen Tumoren (X, nicht durchgeführt).
 B-G: Relative Häufigkeit der Methylierung jedes CpG Dinukleotides in den sechs differentiell methylierten Kandidatengenen. Tumore aus der Verlaufsgruppe ohne Rezidiv, blau; Tumore aus der Verlaufsgruppe mit Rezidiv, orange. Pfeile beschreiben die Primerlokalisationen, welche für die Validierung der Microarray Ergebnisse verwendet wurden und eventuell abweichende Primer für die Methylierungsanalyse an Paraffingewebe. Mit q-MS-PCR detektierte methylierte Tumore sind fett gedruckt. PM: Positivkontrolle (in vitro methylierte Plazenta DNA).

Die durch Sequenzierung detektierte relative Methylierung der gesamten Kandidatenregion in den Tumoren (Abb. 3.10) bestätigte die Validierung der Microarrayergebnisse mittels q-MS-PCR in Abschnitt 3.3.1, Abb. 3.9 A. Somit ist das Ergebnis der genomweiten Microarrayanalyse mit zwei unabhängigen Methoden nachvollzogen worden.

Durch das Verfahren der Sequenzierung war es weiterhin möglich die Häufigkeit der Methylierung jedes CpG quantitativ auszuwerten, um die Primerbindestellen für methylierungsspezifische PCR auf ihre Spezifität für eine bestimmte Patientengruppe zu überprüfen und gegebenenfalls optimiert zu können (Abb. 3.10 B-G). Es wurde bestätigt, dass alle Tumore, die laut Sequenzierung eine deutliche Methylierung aufwiesen auch mit q-MS-PCR detektiert worden sind. Bei den Genen *RUNX3*, *ATL1*, *CAMK2N1*, *KATNAL2* und *KRT86* (Abb. 3.10 B-F) lässt sich kein besser geeigneter Bereich für die Primer finden, der die prognostischen Gruppen signifikanter unterscheiden würde. Die Primer sind so gewählt worden, dass gering methylierte Abschnitte der differentiell methylierten Regionen bei Tumoren von Patientinnen ohne Rezidiv nicht detektiert werden (Bsp. *RUNX3*, Tumor 4801, Abb. 3.10 B). Das wegen seiner hohen Sensitivität ausgewählte Kandidatengen *ATOH8* zeigte auch in der Sequenzierung eine zu geringe Spezifität für Patientinnen mit Rezidiv (Abb. 3.10 G) und wurde als Kandidatengen später ausgeschlossen.

Tab. 3.9 Anteil der in den Primerbindestellen vollständig methylierter Sequenzen [%]

Tumor	RUNX3		ATL1	CAMK2N1		KATNAL2	KRT86		ATOH8
	F1R2	F3R3	F1R1	F1R1	F1R2	F1R1	F1R1	F1R2	F1R1
2744	0,0	0,0	0,1	2,8	2,8	0,1	0,0	0,0	1,8
3764	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
4801	0,0	0,0	0,0	1,3	0,8	0,1	0,0	0,0	0,2
5746	0,1	0,1	0,2	n.a.	n.a.	0,3	0,0	0,1	0,0
5834	3,0	4,9	0,1	n.a.	n.a.	0,1	0,3	0,4	0,0
6153	0,0	0,0	0,0	n.a.	n.a.	0,2	0,0	0,0	0,1
1477	0,1	0,1	4,1	n.a.	n.a.	60,1	0,0	0,0	9,2
2854	3,3	8,4	0,6	n.a.	n.a.	0,4	23,5	29,7	1,2
3411	47,4	28,1	2,7	87,0	81,7	0,2	77,2	76,0	71,2
2696	49,6	54,5	0,2	19,3	19,3	0,2	59,3	51,0	5,6
4575	0,0	0,0	26,2	0,3	0,3	31,4	0,0	0,0	0,0
5228	2,3	0,2	0,2	n.a.	n.a.	41,4	0,2	0,2	14,4
PM	76,7	76,7	79,4	87,9	87,9	80,2	79,5	78,2	81,1

FxRx, Primerpaare; blau, rezidivfrei; orange, Rezidiv < 3 Jahre; grau markiert, mit q-MS-Primern detektierte Proben; PM, Positivkontrolle (*in vitro* methylierte Plazenta DNA); n.a., nicht analysiert.

Weiterhin wurde nicht nur die allgemeine Häufigkeit der Methylierung jedes einzelnen CpG Dinukleotides untersucht, sondern auch die Häufigkeit der DNA-Moleküle bei denen die für die Validierung verwendeten Primerbindestellen (MS-Primer) vollständig methyliert vorlagen (Tab. 3.9). Keine Divergenzen im Vergleich zu der vom DNA Molekül unabhängigen Auswertung und der q-MS-PCR waren bei den Genen *ATL1*, *KATNAL2*, *KRT86* und *ATOH8* zu finden. DNA-Gemische mit einem geringen Anteil von bis zu 1,2 % (*ATOH8*)

werden durch q-MS-PCR nicht detektiert, Proben mit höherem Anteil (bei *ATL1* bereits ab 2,7 %) jedoch zuverlässig.

Bei *RUNX3* gab es Unterschiede zwischen der Methylierungshäufigkeit einzelner CpG's und dem Anteil an DNA-Molekülen mit vollständig methylierten Primerbindestellen. Der Tumor 5834 hatte bei 3,0 % (Primerpaar F1R2) bzw. 4,9 % (Primerpaar F3R3) der Sequenzen vollständig methylierte Primerbindestellen, wurde aber im Gegensatz zu Tumor 5228 mit 2,3 % (Primerpaar F1R2) nicht mittels q-MS-PCR detektiert. Allerdings ist die relative Häufigkeit, unabhängig vom DNA-Molekül, bei Tumor 5228 wesentlich höher als bei Tumor 5834 (Vgl. Abb. 3.10 B und Tab. 3.9). Dies macht deutlich, dass die effektive Bindung von methylierungsspezifischen Primern nicht nur von vollständig methylierten Bindestellen abhängt, sondern vor allem von der allgemeinen Häufigkeit von methylierten CpG's in der Primerregion. Durch einzelne Mismatches in der Primerbindung können auch ursprünglich nicht vollständig methylierte Sequenzen amplifiziert werden. Entscheidend bei der q-MS-PCR ist außerdem die absolute Anzahl an methylierten Targetmolekülen, welche jedoch bei Sequenzierung mit targetspezifischer pre-PCR nicht bestimmbar ist.

Die 19,3 % der Gesamtmoleküle mit methylierten Primerbindestellen von *CAMK2N1* im Tumor 2696 wurden ebenso nicht detektiert. Dies lag aber möglicherweise an der nicht optimalen Sequenzierreaktion für *CAMK2N1*. Im Fall von Tumor 2696 konnten nur 83 von 98 Sequenzen ausgewertet werden (Rate=84,7 %), bei den weiteren Tumoren zumindest 165 (Tumor 3764) bis 1511 (Tumor 3411). Für alle anderen Gene konnten durchschnittlich 1500 je Reads je Tumor ausgewertet werden, was eine Rate von > 98 % entsprach.

3.4 Marker für die Prognose des Ovarialkarzinoms

Die Prüfung der prognostischen Wertigkeit von 24 differentiell DMR, die durch Microarrayanalysen detektiert und mittels q-MS-PCR validiert wurden, erfolgte an einem größeren Probenset mit 48 Patientinnen. So konnten fünf Markergene und deren Kombinationen mit prognostischem Wert durch q-MS-PCR Analysen an Gefrier- und FFPE-Gewebe identifiziert werden.

3.4.1 Prognostische Wertigkeit der differentiell methylierten Regionen

Von den 37 in Bezug auf die Microarrays validierten Regionen sind 20 ausgewählt worden, die in mehr als einer Arrayprobe, aber ausschließlich in einer Verlaufgruppe methyliert waren. Zusätzlich ausgewählt wurden *CAMK2N1* (möglicher prädiktiver Wert), *RASGRP2* und *HNRNPH1* (kontroverse Ergebnisse bei der Validierung) sowie *RUNX2*. Wegen nicht optimaler Primer ist die Genregion *RBP1* von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen worden.

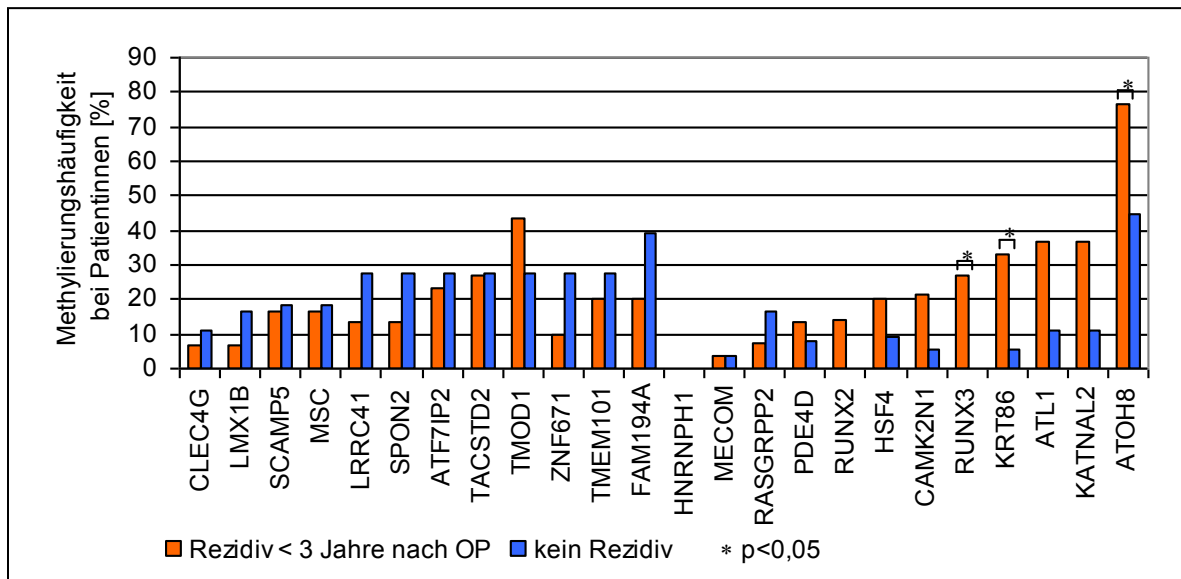


Abb. 3.11 Validierung der prognostischen Wertigkeit differentiell methylierter Region an 48 EOC

Mit q-MS-PCR analysierte differentiell methylierte Regionen (n=24) an 48 serösen EOC. In der linken Hälfte des Diagramms sind die Genregionen zu finden, welche bei den genomweiten Analysen eine Hypermethylierung bei gutem Krankheitsverlauf (n=12) und rechts bei schlechtem Verlauf (n=12) gezeigt haben. * p<0,05 (fisher's exact test).

Die 24 ausgewählten Gene bestanden je zur Hälfte aus Regionen, die bei den genomweiten Analysen eine Hypermethylierung in den Gruppen mit guten bzw. schlechten Krankheitsverlauf gezeigt hatten. Eine jeweils einmalige q-MS-PCR an 48 EOC ergab, dass auf Seite der Gruppe ohne Rezidiv kein Gen gefunden werden konnte, welches ausreichende statistische Parameter zur Unterscheidung von prognostischen Gruppen erfüllen würde (Abb. 3.11). Am stärksten von der Vorhersage der genomweiten Microarrayanalysen wichen die Gene *TMOD1* und *RASGRP2* ab. *HNRNPH1* war in keinem der 48 EOC methyliert.

Hypermethylierte Regionen bei Patientinnen mit Rezidiv konnten eine deutlich bessere Unterscheidung der prognostischen Gruppen liefern. Vor allem die Methylierung der Gene *RUNX3* (p=0,018), *KRT86* (p=0,035) und *ATOH8* (p=0,032) unterschied sich zwischen den Verlaufgruppen signifikant. Tendenziell (p<0,1) waren die Regionen *ATL1* und *KATNAL2* differentiell methyliert (Abb. 3.11).

Durch zweimalige Wiederholung der q-MS-PCR von sechs ausgewählten Genen an den 48 EOC wurden die Ergebnisse präzisiert (Abb. 3.12 A). Gene mit einem Signifikanzwert p>0,1 wurden von dieser weiteren Validierung wegen nicht hinreichender prognostischen Wertigkeit ausgeschlossen. Wegen des eventuellen prädiktiven Wertes, bekräftigt durch Methylierungsanalysen an Zellkulturen (Abschnitt 3.1.3), ist *CAMK2N1* (p=0,22) zusätzlich mitgeführt worden. Nach dreimaliger Analyse galt eine Genregion dann als methyliert, wenn mindestens zwei q-MS-PCR positiv (Methylierung > 1 %) waren. Die Reproduzierbarkeit der q-MS-PCR zur Validierung der Kandidatengene ist in Tab. 3.10 gezeigt. Für jedes Gen wurden 3 x 48 PCR Reaktionen in jeweils unabhängigen Ansätzen durchge-

führt. Dabei ergab sich eine Reproduzierbarkeit von 88,19 % (*ATOH8*) bis 98,61 % (*ATL1*, *KATNAL2*, *CAMK2N1*).

Tab. 3.10 Reproduzierbarkeit der korrekten q-MS-PCR Ergebnisse (Triplikate) entsprechend dem Patientenstatus (n=48)

Kandidatengen	RUNX3	ATL1	CAMK2N1	KATNAL2	ATOH8	KRT 86
Reproduzierbarkeit	95,14 %	98,61 %	98,61 %	98,61 %	88,19 %	93,06 %

Einzelne Proben ergaben nach Durchführung der Triplikate einen anderen Methylierungsstatus als mit der ersten q-MS-PCR erfasst. Dadurch änderte sich die statistische Signifikanz der Genregionen zur Unterscheidung der Verlaufgruppen. Der Methylierungsunterschied der Gene *KRT86* und *ATOH8*, welche auch die geringste Reproduzierbarkeit zeigten, war nicht mehr signifikant. Einen höheren, sehr signifikanten prognostischen Wert erlangte hingegen *RUNX3* ($p=0,008$) (Abb. 3.12 A; Tab. 3.11).

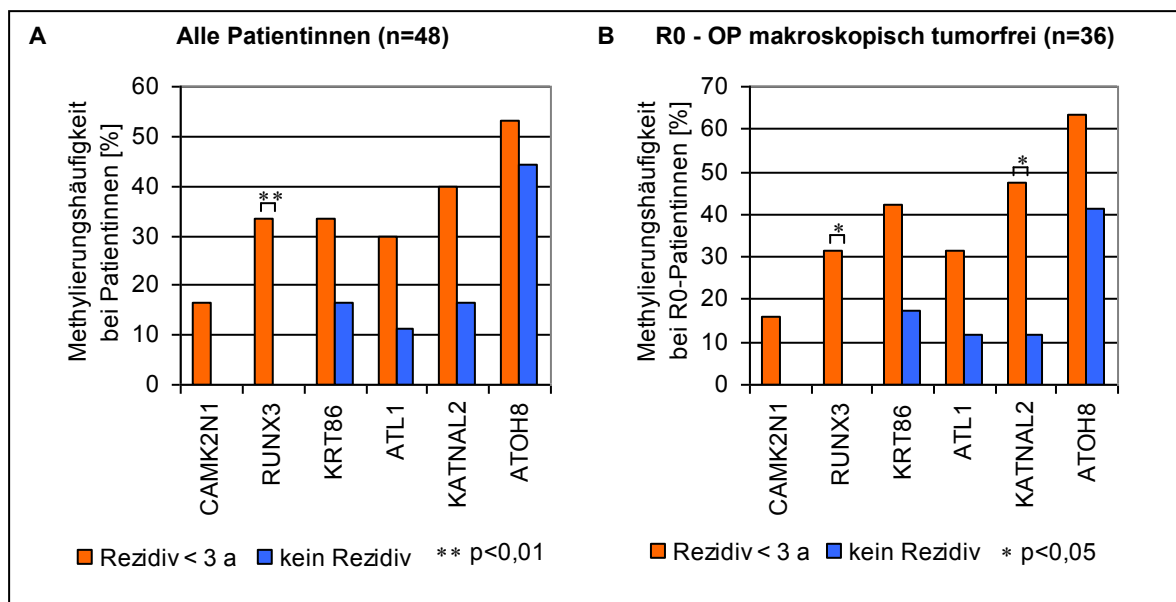


Abb. 3.12 Prognostische Wertigkeit der Kandidatengene

Mit q-MS-PCR (Triplikate) analysierte Kandidatengene an 48 serösen EOC (A). Betrachtung nur makroskopisch tumorfrei resektierter Patientinnen (n=36) (B). p-Wert, fisher's exact test.

Die höchste Sensitivität für die Erkennung von Patientinnen mit Entwicklung eines Rezidivs zeigte *ATOH8*, jedoch mit einer schlechten Spezifität von nur 55,6 %. Sehr spezifisch (100 %) hingegen waren *RUNX3* und *CAMK2N1* mit einer Sensitivität von 33,3 % bzw. 16,7 % (Tab. 3.11, Abb. 3.12 A). Der Resektionsstatus als derzeitiger in der Klinik angewendeter prognostischer Marker sagte Rezidive mit einer Sensitivität von 36,7 % und einer Spezifität von 94,4 % voraus. Das Markergen *RUNX3* besitzt im Vergleich zum Resektionsstatus ($p=0,008$ vs. $p=0,018$) einen ähnlichen prognostischen Wert (Tab. 3.11). Patientinnen mit makroskopischen Tumorresten (n=12) bekamen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv (11 von 12 bzw. > 90 %, Tab. 3.11).

Tab. 3.11 Statistische Analyse der Verlaufsmarker für die Detektion von Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren in der Gesamtgruppe von EOC (n=48)

Genregion / CpG Insel	C ^m pG	Rezidiv < 3 Jahre	kein Rezidiv	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	p-Wert
RUNX3	+	10	0	33,3	100,0	0,008**
	-	20	18			
KATNAL2	+	12	3	40,0	83,3	0,117
	-	18	15			
ATL1	+	9	2	30,0	88,9	0,171
	-	21	16			
CAMK2N1	+	5	0	16,7	100,0	0,142
	-	25	18			
KRT 86	+	10	3	33,3	83,3	0,317
	-	20	15			
ATOH8	+	16	8	53,3	55,6	0,766
	-	14	10			
Resektion	R1	11	1	36,7	94,4	0,018*
	R0	19	17			

p-Wert (fisher's exact test): *p<0,05; **p<0,01.

Diese wurden in einer zweiten statistischen Analyse ausgeschlossen, um das Ergebnis unabhängig vom Resektionsstatus zu gestalten. Dadurch erreichte *KATNAL2* eine Spezifität für von 88,2 % und eine Sensitivität von 47,4 %. Die Methylierung dieses Kandidatengens konnte somit, neben *RUNX3* (p=0,020 bei R0 Patientinnen), die Verlaufsgruppen signifikant (p=0,031) unterscheiden (Tab. 3.12). Bei den weiteren 4 Genen konnte keine Änderung im Signifikanzniveau beobachtet werden (Abb. 3.12, vgl. Tab. 3.11 und Tab. 3.12).

Tab. 3.12 Statistische Analyse der Verlaufsmarker für die Detektion von makroskopisch tumorfrei operierten (R0) Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren in 36 EOC

Genregion / CpG Insel	C ^m pG	Rezidiv < 3 Jahre	kein Rezidiv	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	p-Wert
RUNX3	+	6	0	31,6	100,0	0,020*
	-	13	17			
KATNAL2	+	9	2	47,4	88,2	0,031*
	-	10	15			
ATL1	+	6	2	31,6	88,2	0,236
	-	13	15			
CAMK2N1	+	3	0	15,8	100,0	0,231
	-	16	17			
KRT 86	+	8	3	42,1	82,4	0,156
	-	11	14			
ATOH8	+	12	7	63,2	58,8	0,316
	-	7	10			
Resektion	R1	0	0			
	R0	19	17			

p-Wert (fisher's exact test): *p<0,05.

Tab. 3.13 Statistische Analyse von Kombinationen der Verlaufsmarker für Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren in den gesamten und tumorfrei resektierten (R0) EOC

Genregion / CpG Insel	Alle Patientinnen (n=48)			R0 - Patientinnen (n=36)		
	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	p-Wert	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	p-Wert
RUNX3 / KATNAL2	60,0	83,3	0,006**	73,7	88,2	0,0002***
RUNX3 / ATL1	50,0	88,9	0,011*	52,6	88,2	0,014*
RUNX3 / CAMK2N1	40,0	100,0	0,002**	36,8	100,0	0,002**
RUNX3 / KRT86	46,7	83,3	0,060	47,4	82,4	0,083
RUNX3 / KATNAL2 / CAMK2N1	63,3	83,3	0,003**	68,4	88,2	0,0008***
RUNX3 / CAMK2N1 / KRT86	50,0	83,3	0,031*	47,4	82,4	0,083
RUNX3 / KATNAL2 / ATL1 / CAMK2N1 / KRT86	66,7	61,6	0,078	73,7	64,7	0,043*

p-Wert (fisher's exact test): *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Durch Kombination der spezifischsten und sensitivsten Kandidatengene (*RUNX3*, *ATL1*, *KATNAL2*, *CAMK2N1*) konnte die Sensitivität eines Markersets bis auf 66,7 % bzw. 73,7 % bei R0-Patientinnen gesteigert werden (Tab. 3.13). Mit dem Gene *ATOH8* konnte keine vorteilhafte Kombination gefunden werden. Vor allem bei Einschluss von *RUNX3* zeigten sich Markersets, die die Verlaufgruppen sehr signifikant unterscheiden konnten und eine zum Teil 100 %ige Spezifität aufwiesen (*RUNX3* + *CAMK2N1*) (Tab. 3.13). Trifft man mit dem Prognosemarker Resektionsstatus eine Vorauswahl und betrachtet nur die tumorfrei resektierten Patientinnen unterschieden sich die prognostischen Gruppen durch die Methylierung der Gene *RUNX3* in Verbindung mit *KATNAL2* höchst signifikant ($p<0,001$), sagten 73,7 % der Rezidive bei R0-Patientinnen voraus und detektierten nur zwei falsch positive Proben (Spezifität = 88,2 %) (Tab. 3.13). Weitere Markerkombinationen und deren statistische Daten sind tabellarisch Anhang (auf beiliegender CD) zu finden.

Da die Anzahl an geeigneten EOC ohne Rezidiv mit ausreichenden Verlaufsdaten (min. 3 Jahre nach OP) in der Tumorbank begrenzt war ($n=18$), mussten die Proben aus dem Detektionsset der Microarrayanalysen in die Validierung eingeschlossen werden. So konnte die Anzahl an Proben in der Gruppe ohne Rezidiv um 50 % ($n=12+6$) und in der Gruppe mit Rezidiv um 25 % ($n=24+6$) gesteigert werden. Schließt man die zur Detektion differentiell methylierter Regionen mittels Microarrayanalysen verwendeten Proben aus, bleibt die Spezifität bei *RUNX3* und *CAMK2N1* erhalten (100 %), bei *KRT86* steigt diese sogar um bis zu 8,5 % (R0 Patientinnen). Die Sensitivität nimmt in der Mehrzahl der Fälle leicht ab (bis zu -8,5 % bei *ATL1*). Betrachtet man den p-Wert zur Unterscheidung der Verlaufgruppen anhand der Methylierung mit dem Fisher's exact test, zeigte nur noch

RUNX3 einen Trend ($p=0,070$) nahe der Grenze zur Signifikanz. Beim Vergleich der statistischen Daten der Markerkombinationen (Vgl. Tab. 3.13 und Tab. 3.14) nahm die Sensitivität durch Ausschluss der 12 Proben zumeist ab. Die Kombination *RUNX3* / *CAMK2N1* / *KRT86* büßte jedoch kaum ihre Sensitivität ein. Die Spezifität der Markerkombinationen blieb weitestgehend erhalten. *RUNX3* / *CAMK2N1* waren zu 100 % spezifisch, mit *KRT86* zusammen und bei *RUNX3* / *KRT86* stieg die Spezifität sogar um 8,4 % an (Tab. 3.14). Wie bei Betrachtung der einzelnen Gene als Marker sank der p-Wert in den meisten Fällen (Vgl. Tab. 3.13 und Tab. 3.14). Kombinationen mit signifikantem Unterscheidungswert der Verlaufsgruppen (alle Resektionsstadien) wiesen *RUNX3* / *CAMK2N1* ($p=0,016$) und *RUNX3* / *CAMK2N1* / *KRT86* ($p=0,025$) auf (Tab. 3.14).

Alle statistischen Daten der einzelnen Kandidatengene und weiterer Kombinationen, in Abhängigkeit zum Resektionsstatus und dem verwendeten Probenset sind tabellarisch im Anhang (beiliegende CD) zu finden.

Tab. 3.14 Statistische Analyse von Kombinationen ohne Proben aus dem Detektionsset der Microarrayanalysen

Genregion / CpG Insel	Alle Patientinnen (n=36)			R0 - Patientinnen (n=24)		
	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	p-Wert	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	p-Wert
RUNX3 / KATNAL2	50,0	75,0	0,282	53,8	81,8	0,105
RUNX3 / ATL1	41,7	83,3	0,260	38,5	81,8	0,386
RUNX3 / CAMK2N1	37,5	100,0	0,016*	30,8	100,0	0,098 ^T
RUNX3 / KRT86	45,8	91,7	0,031*	46,2	90,9	0,078 ^T
RUNX3 / KATNAL2 / CAMK2N1	54,2	75,0	0,157	53,8	81,8	0,105
RUNX3 / CAMK2N1 / KRT86	50,0	91,7	0,025*	46,2	90,9	0,078 ^T
RUNX3 / KATNAL2 / ATL1 / CAMK2N1 / KRT86	58,3	58,3	0,483	61,5	63,6	0,414

p-Wert (fisher's exact test): * $p<0,05$; ^T $p<0,1$.

3.4.2 Methylierung in FFPE-Gewebe von Primärtumoren und Rezidiven

Inwiefern die Methylierung der Kandidatengene auf andere Regionen des Primärtumors und dessen Rezidive übertragbar ist, wurde an FFPE-Gewebe (Formalin-fixed, paraffin-embedded Tissue) untersucht. Von 11 der 30 Tumoren mit Rezidiv konnte im Archiv der Pathologie des Universitätsklinikum Jena analysierbares FFPE-Gewebe vom Primärtumor und zum Teil deren Rezidive bzw. Metastasen gefunden werden. Gewebeschnitte wurden angefertigt und mikrodisssektiert, um einen möglichst hohen Tumorzellanteil von mindestens 50 % zu erhalten. Nach Isolation der DNA und deren Bisulfitbehandlung ist die Qua-

lität der bisulfite-DNA mit einer q-MS-PCR und bisulfitspezifischen β -Actin Primern (Abschnitt 3.2.1) untersucht worden. Von allen elf Patientinnen konnte die DNA aus FFPE-Gewebe der Primärtumore verwendet werden. Bei den Rezidiven schieden 6 von 17 Geweben durch schlechte DNA Qualität aus.

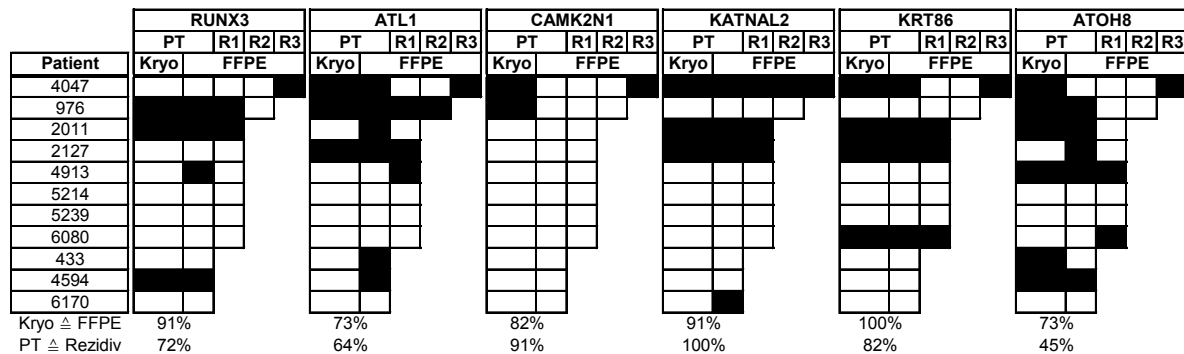


Abb. 3.13 Methylierung von Gefrier- und FFPE-Gewebe der Primärtumoren und Rezidive

Vergleich der Methylierung der Kandidatengene in Gefrier- (Kryo) und FFPE-Gewebe von Primärtumoren (PT) und FFPE Gewebe von Rezidiven (R1-R3). Von 11 Patientinnen (Nummer entspricht Tumornummer des Gefriergewebes) konnte FFPE-Gewebe analysiert werden. Die prozentuale Angabe Kryo \triangleq FFPE bzw. PT \triangleq Rezidiv beschreibt den Anteil übereinstimmender Ergebnisse zwischen Gefrier- und FFPE-Gewebe bzw. FFPE Primärtumor und Rezidiv. (schwarz, methyliert; weiß, nicht methyliert)

Die Auswertung der q-MS-PCR mit DNA der analysierten FFPE-Gewebe konnte nur qualitativ erfolgen, da durch die starken Schwankungen der DNA-Qualität und somit auch der β -Actin Werte eine quantitative Auswertung nicht sinnvoll war. Der Methylierungsstatus der Kandidatengene aus Gefriergeweben konnte in der Mehrheit der Fälle (73 % - 100 %) auch in den entsprechenden FFPE-Geweben detektiert werden (Abb. 3.13). Vor allem bei den Genen *RUNX3*, *KATNAL2*, und *KRT86* betrug die Übereinstimmung über 90 %. Zudem konnte bei *KATNAL2*, *KRT86* und *CAMK2N1* eine Kontinuität (Übereinstimmung > 80 %) der Methylierung während der Progression in den Rezidiven festgestellt werden (Abb. 3.13). Divergente Methylierung zwischen Gefrier- und FFPE-Gewebe der Primärtumoren sowie der Rezidive trat vor allem bei *ATL1* und *ATOH8* auf. Auffällig ist außerdem, dass neu auftretende Methylierungen in den Rezidiven im Vergleich zum Primärtumor sehr viel seltener (je 1x außer *KATNAL2*) auftraten, als der Verlust einer Methylierung während der Progression (Abb. 3.13).

3.5 Korrelation der DNA-Methylierung mit der Expression

Der Einfluss der Methylierung auf die Expression der Kandidatengene *RUNX3*, *KATNAL2*, *ATL1*, *CAMK2N1* und *ATOH8* ist durch reverse Transkription mit anschließender quantitativer realtime PCR (q-PCR) auf Transkriptionsebene und für *RUNX3* und *ATL1* zusätzlich auf Translationsebene mittels Immunhistochemie (IHC) untersucht worden. Durch die hohe Homologie der Sequenzen in der Keratinfamilie konnten für *KRT86* keine genspezifischen Primer entworfen werden. Somit wurde *KRT86* von den Expressionsanalysen ausgeschlossen. Die für IHC benötigten Antikörper gegen die Proteine der Kandidatengene waren nur für *RUNX3* und *ATL1* kommerziell verfügbar, was die Analyse der Translation mit Immunhistochemie auf diese beiden Gene beschränkte.

3.5.1 Expression auf Transkriptionsebene

Die RNA von 42 der 48 für die Methylierungsanalysen verwendeten EOC stand für Expressionsanalysen zur Verfügung (Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP, n=26; kein Rezidiv, n=16). Die Messung der Expression der Kandidatengene wurde durch reverse Transkription, gefolgt von einer q-PCR durchgeführt. Die gemessene Expression der Housekeepinggene *ACTB* und *HPRT* diente der Normalisierung. Allgemein war das mediane Expressionsniveau der Kandidatengene im Vergleich zum Mittel der Housekeepinggene gering und betrug nur 0,0003 (*ATL1*) bis 0,013 (*CAMK2N1*).

Hat ein Gen mehrere Transcription Start Sites (TSS) bzw. Promotoren, werden diese gegebenenfalls von unterschiedlichen CpG-Inseln beeinflusst. Die hypermethylierte Region (CpG-Insel) befindet sich bei *RUNX3* im Bereich des Promotors von Transkriptvariante 2 von zwei, bei *ATL1* im Bereich von Transkriptvariante 1 und 2 von drei. Die weiteren Varianten sollten unabhängig von der Hypermethylierung der untersuchten differentiell methylierten Regionen sein. Bei den Expressionsanalysen wurden alle Transkriptionsvarianten durch die Verwendung transkriptspezifischer Primer betrachtet. In den folgenden Abbildungen werden aber nur die durch Methylierung betroffenen Varianten gezeigt. Die weiteren Kandidatengene (*KATNAL2*, *CAMK2N1*, *KRT86* und *ATOH8*) besitzen jeweils nur einen Promotor.

Die Auswertung der Expression erfolgte zum einen bezüglich des Methylierungsstatus (Abb. 3.14) und zum anderen bezüglich des Krankheitsverlaufes (Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP / kein Rezidiv) (Abb. 3.15). In der Gruppe der methylierten Proben war die Expression des betroffenen Gens (bzw. Transkriptvariante) bei *RUNX3*, *ATL1* und *ATOH8* im Mittel geringer als in der Gruppe nicht methylierter Proben. Umgekehrt verhielt sich das Expressionsniveau bei *KATNAL2* und *CAMK2N1*, wobei bei letzterem die Anzahl methylierter Proben sehr gering war und daher eine Bewertung schwierig erscheint (Abb. 3.14).

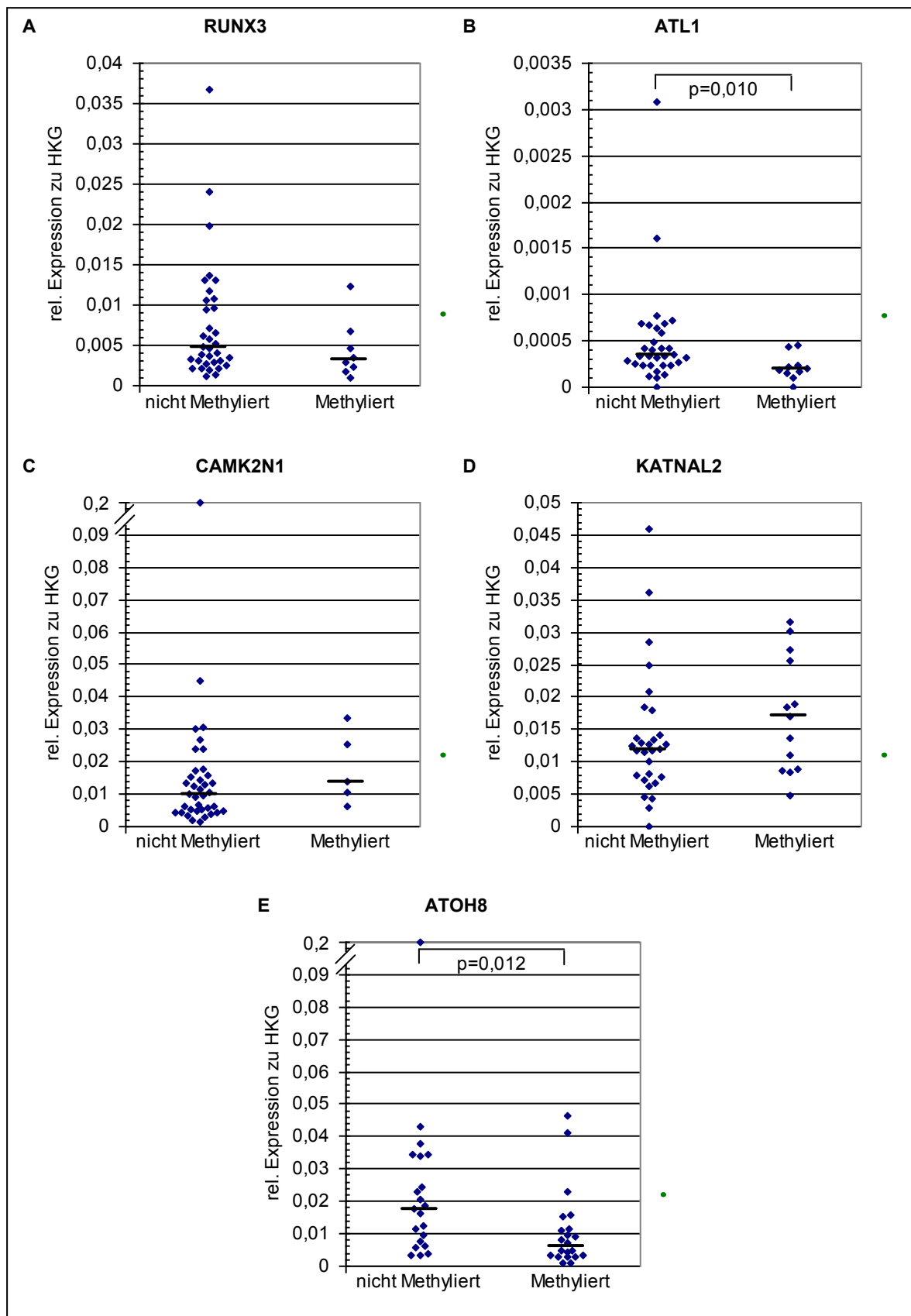


Abb. 3.14 Expression von Kandidatengenen bezüglich des Methylierungsstatus

Relative Expression zu *ACTB/HPRT* der Kandidatengene *RUNX3* (Transkriptvariante 2), *ATL1* (Transkriptvariante 1+2), *CAMK2N1*, *KATNAL2* und *ATOH8* bezüglich der Methylierung. Jeder Punkt entspricht einer Probe, der Median ist durch den schwarzen Balken dargestellt. Signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U Test) sind durch den p-Wert dargestellt.

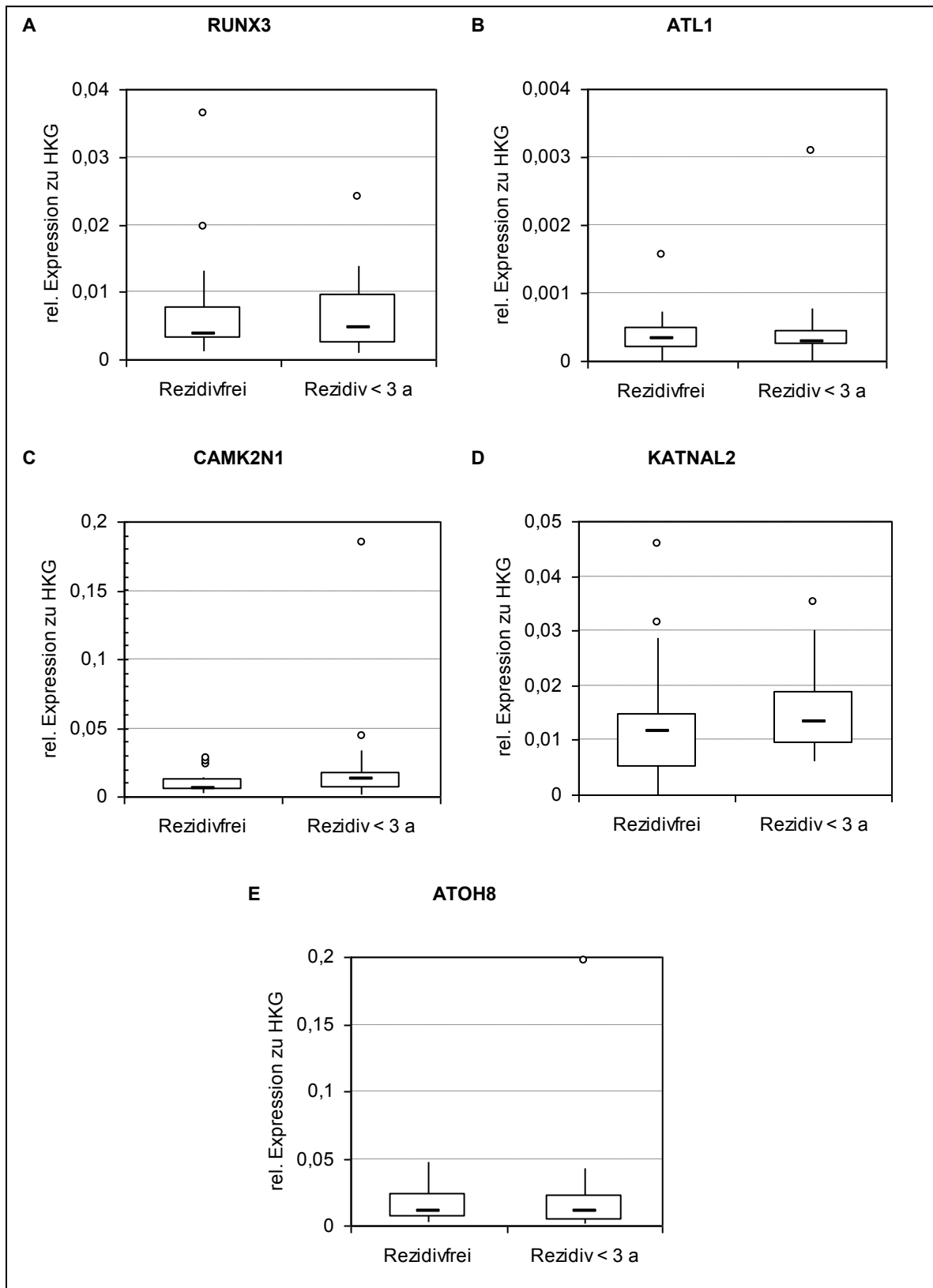


Abb. 3.15 Expression von Kandidatengen bezüglich des Krankheitsverlaufes

Relative Expression zu *ACTB/HPRT* der Kandidatengene *RUNX3* (Transkriptvariante 2), *ATL1* (Transkriptvariante 1+2), *CAMK2N1*, *KATNAL2* und *ATOH8* bezüglich des Krankheitsverlaufes nach primärer OP (Rezidiv innerhalb 3 Jahren / rezidivfreier Verlauf). Boxplots sind dargestellt mit Median (Balken), Interquartil (Box) und Minimum / Maximum (Spannweite).

Die statistische Auswertung (Mann-Whitney-U Test) in Tab. 3.15 zeigt, dass die Expressionsunterschiede zwischen den Methylierungsgruppen für die Gene *ATL1* und *ATOH8* signifikant waren ($p < 0,05$).

Tab. 3.15 Statistische Analyse der medianen Expression bezüglich der Methylierung und des Krankheitsverlaufs (rezidivfrei vs. Rezidiv < 3 Jahre)

Gen	p-Wert	
	Gruppen nach Methylierung	Gruppen nach Verlauf
RUNX3	0,210	1,000
ATL1	0,010*	0,907
CAMK2N1	0,207	0,140
KATNAL2	0,167	0,154
ATOH8	0,012*	0,717

p-Wert (Mann-Whitney-U Test): * $p < 0,05$.

Betrachtet man die Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf der Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP des Primärtumors bzw. ohne Rezidiv, so zeigte die mediane Expression der Gruppen kaum Unterschiede (Abb. 3.15) und eine Unterscheidung auf Grund der Expression ist nicht möglich bzw. nicht signifikant (Tab. 3.15).

Die Expression der Transkriptvarianten, die nicht mit hypermethylierten Regionen assoziiert waren, zeigten weder in den methylierungsabhängigen noch in den verlaufsabhängigen Gruppen signifikante Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

3.5.2 Expression auf Translationsebene

Zur Untersuchung der Expression auf Proteinebene konnten von 21 der 22 in Abschnitt 3.4.2 analysierten FFPE-Gewebe (Primärtumore und deren Rezidive) Paraffinschnitte auf Objektträgern zur immunhistologischen Färbung hergestellt werden. Da lediglich gegen RUNX3 und ATL1 primäre Antikörper kommerziell verfügbar waren, konnte keine Immunhistochemie für die weiteren Kandidatengenen (KATNAL2, CAMK2N1, KRT86 und ATOH8) durchgeführt werden. Neben dem Nachweis von RUNX3 und ATL1 ist die Hämatoxylin-Eosin Färbung zur Übersicht, eine immunhistochemische Färbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 zur Detektion proliferierender Tumorzellen sowie eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper für jede Probe durchgeführt worden. Für die Darstellung der Färbungen in Abb. 3.16 wurde die Probe mit der pathologischen Befundnummer 8485/09 als Beispiel gewählt. Alle fünf Bilder entsprachen demselben Tumorareal (Reihenschnitte) in 400-facher Vergrößerung.

In der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung waren die meist zu Inseln aggregierten Tumorzellen durch ihre großen strukturierten Zellkerne sehr gut zu erkennen (Abb. 3.16 A).

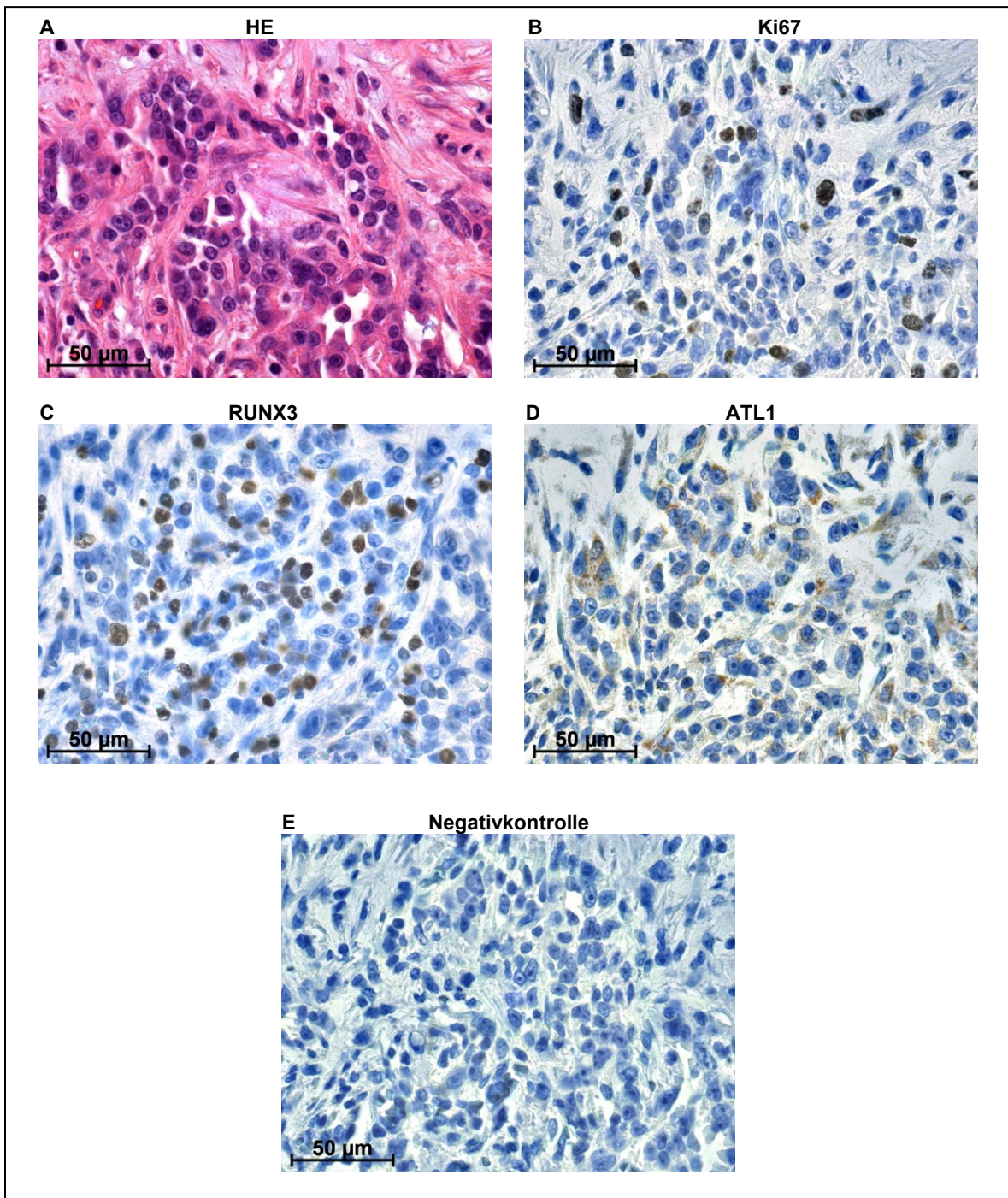


Abb. 3.16 Immunhistochemie zur Aufklärung der Expression von RUNX3 und ATL1 in Tumorzellen

(A) Hämatoxylin-Eosin Färbung und immunhistochemische Färbungen gegen (B) den Proliferationsmarker Ki67 und (C-D) die Kandidatengene RUNX3 und ATL1 am Beispiel des EOC mit der Befundnummer 8485/09. (E) Negativkontrolle (Färbung ohne prim. Antikörper). Alle fünf Bilder zeigen dasselbe Tumorareal mit einer 400-fachen Vergrößerung.

In allen Proben proliferierte nur ein geringer Teil der Tumorzellen, was mit dem Proliferationsmarker Ki67 dargestellt wurde (Abb. 3.16 B). Das Protein RUNX3 wurde in den Tumoren sehr unterschiedlich exprimiert, in der Mehrheit der Proben jedoch nicht oder nur schwach. Die Lokalisation von RUNX3 beschränkte sich auf die Zellkerne von einzelnen Tumoringeln, das Zytoplasma blieb immer negativ. Im Beispiel in Abb. 3.16 C wurde eine Intensität der Färbung von zwei (Skala 0-3) in 10 % aller Tumorzellen, bezogen auf den

Gesamtschnitt, gemessen. ATL1 zeigte in den Tumorzellen aller Proben eine schwache bis mäßige diffuse Färbung des Zytoplasmas, im Kern konnte keine Expression nachgewiesen werden. Über den Gesamtschnitt war die Färbung homogen verteilt. Eine schwache Färbung der Intensität eins (Skala 0-3) in 90 % der Tumorzellen ist in Abb. 3.16 D für ATL1 gezeigt. Eine Korrelation der Expression zwischen Ki67, RUNX3 oder ATL1 in Bezug auf Färbeintensität und Lokalisation im Tumorgewebe konnte nicht festgestellt werden. Durch das Mitführen einer Negativkontrolle, bei welcher die immunhistochemische Färbung ohne primären Antikörper stattfand, ergab bei keiner der Proben eine unspezifische Färbung durch das Detektionssystem.

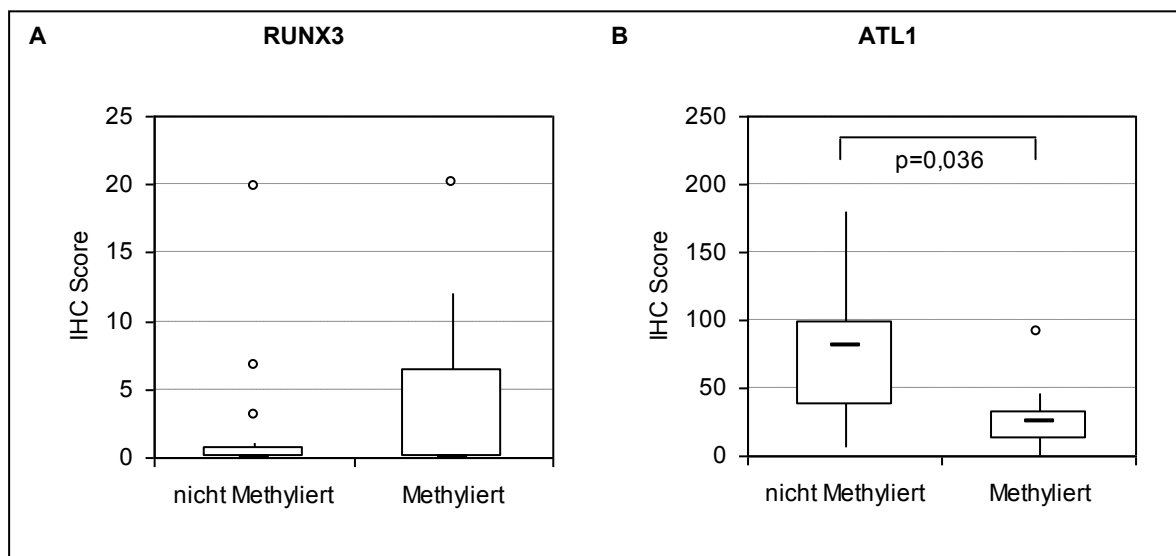


Abb. 3.17 Proteinexpression von RUNX3 und ATL1 bezüglich der Methylierung

Die Proteinexpression von (A) RUNX3 und (B) ATL1 bezüglich der Methylierung der DNA. Das angegebene Maß für die Expression ist der Histo-Score (\sum Zellanteil x Färbeintensität (0-3)). Boxplots sind dargestellt mit Median (Balken), Interquartil (Box), Minimum / Maximum (Spannweite) und Ausreißern. Der Signifikanz liegt der Mann-Withney-U Test zugrunde.

Um die Expression von RUNX3 und ATL1 semiquantitativ zu erfassen, wurde der Histo-Score (H-Score) (van Diest *et al.* 1996, Bosman *et al.* 1992) verwendet, bei dem die Summe aus den Produkten der jeweiligen Färbeintensitätsstufen (0 bis 3) mit dem Anteil positiver Zellen gebildet wird. Die damit gemessene Expression von RUNX3 korrelierte nicht mit der Methylierung der Transkriptvariante 2 von RUNX3 ($p=0,743$ Mann-Withney-U Test) (Abb. 3.17 A). Signifikant unterschieden sich die Expression hingegen bei ATL1 ($p=0,036$). In der Gruppen der nicht methylierten Proben wurde das Protein deutlich stärker exprimiert als in der Gruppe mit Methylierung im Promotor von Transkriptvariante 1 und 2 von ATL1 (Abb. 3.17. B).

3.6 DNA-Methylierung in Zelllinien und prädiktiver Wert von CAMK2N1

Zur Suche von Genen, die bei Behandlung mit Chemotherapeutika ihre Methylierung ändern und möglicherweise zur Resistenz gegen Cisplatin oder Paclitaxan beitragen, sind die Ovarialkarzinomzelllinien Hey (aus Xenografttumor), A2780 (aus Tumorgewebe) und SKOV3 (aus Ascites) untersucht worden, von denen jeweils gegen Chemotherapeutika sensitive und resistente Kulturen zur Verfügung standen. DNA aus resistenten und parental sensitiven Hey Zellen (Brautigam *et al.* 2009) wurden von der AG Prof. Meinhold-Heerlein am Universitätsklinikum Aachen erhalten. Weiterhin wurden in der eigenen Arbeitsgruppe SKOV3 und A2780 Zellen aufsteigend bis zu einer Konzentration von 12,8 µM mit Cisplatin kultiviert, was jeweils zu Resistenz führte.

Insgesamt 24 Gene, darunter alle 6 prognostischen Kandidatengene (siehe Abschnitt 3.4.1) und vier Gene (*HPDL*, *CAMK2N1*, *LMX1B*, *RASGRP2*), welche sowohl in den Verlaufgruppen sowie den sensitiven vs. resistenten Hey Zellen auf Microarrayebene Methylierungsunterschiede zeigten (siehe Abschnitt 3.1.3), wurden in die Analyse eingeschlossen (Abb. 3.18). Allgemein wurde ein sehr unterschiedliches Methylierungsmuster zwischen den parental sensitiven Zelllinien im Vergleich festgestellt (Abb. 3.18). In fünf Fällen konnte mittels q-MS-PCR ein geänderter Methylierungsstatus der resistenten Hey Zellen im Vergleich zu den sensitiven parental Kulturen festgestellt werden (Abb. 3.18). Eine starke Hypomethylierung (Demethylierung) der Gene *RUNX3* und *HNRNPH1* wurde bei paclitaxanresistenten Hey Zellen festgestellt. Sehr schwach methyliert (1,2 %) war *HPDL* in cisplatinresistenten Hey Zellen im Vergleich zu den Parentalen. Eine starke Hypermethylierung konnte nur bei dem Gen *CAMK2N1* gezeigt werden.

Zelllinie	Resistenz	SPON2	LRRC41	TACSTD2	HSF4	ATF7IP2	CLEC4G	MSC	FAM194A	SCAMP5	ZNF671	MECOM	KATNAL2	HNRNPH1	PDE4D	TMOD1	LMX1B	CAMK2N1	RUNX2	RUNX3	KRT86	ATL1	ATO8	RASGRP2	HPDL
Hey	sensitiv	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot
	Cisplatin	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot
	Paclitaxan	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot
SKOV3	sensitiv	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot
	Cisplatin	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot
A2780	sensitiv	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot
	Cisplatin	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot

Abb. 3.18 Methylierung in gegen Chemotherapeutika sensitiven und resistenten Zelllinien

Die für die prognostische Vorhersage untersuchten Gene bei EOC sind in Chemotherapeutika sensitiven und resistenten Zelllinien auf ihre Methylierung untersucht worden. Rot, methyliert; orange, schwach methyliert; grün, nicht methyliert; weiß, keine Daten; gelb umrandet, starke Änderung der Methylierung in Zusammenhang mit Chemotherapeutikum.

Hypermethylierte Regionen bei Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP (Abschnitt 3.4) sowie Gene, welche zusätzlich in den Arrayanalysen der Hey Zellen differentiell methyliert waren, sind außerdem an cisplatinresistenten und parental sensitiven SKOV3 und A2780 Zellen getestet worden. Dabei konnte *CAMK2N1*, neben Hey Zellen, erneut als hypermethyliert nach zu Resistenz führender Cisplatinbehandlung in SKOV3 Zellen detektiert werden (Abb. 3.18).

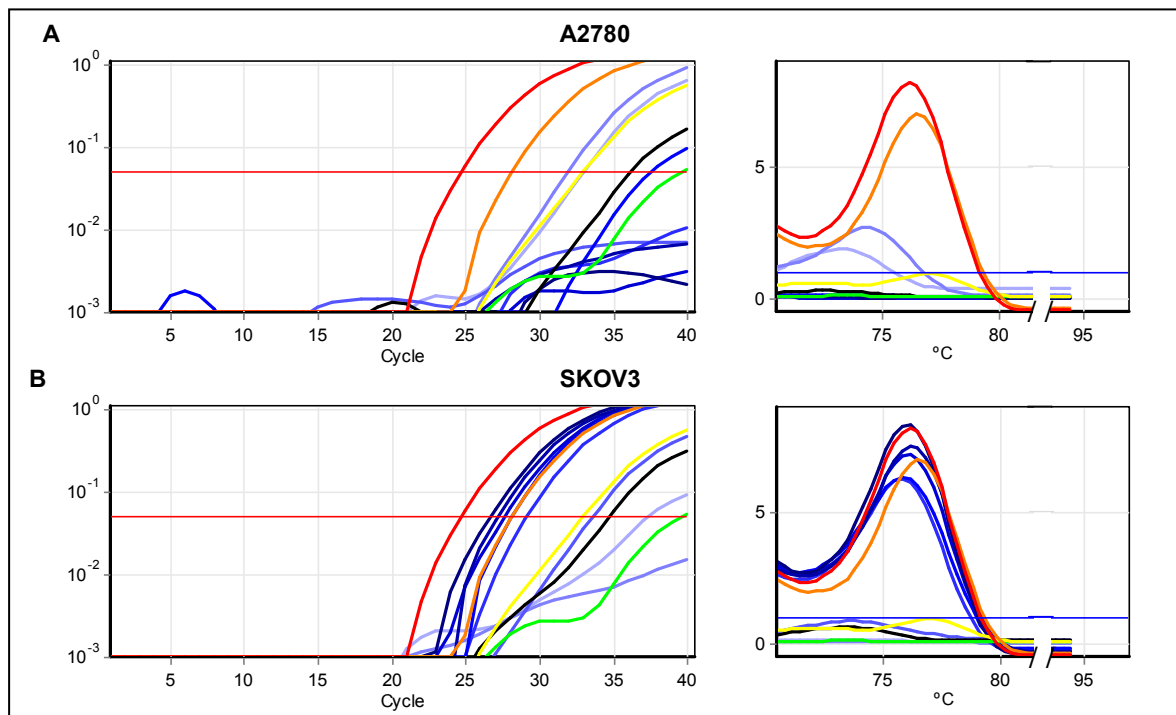


Abb. 3.19 Methylierung von *CAMK2N1* während der Behandlung mit Cisplatin in SKOV3 und A2780
Über mehrere Zyklen mit cisplatinhaltigem Medium von 0 bis 12,8 μM kultivierte parental sensitive (A) A2780 und (B) SKOV3 Zellen. Die mit q-MS-PCR (links, Amplifikation; rechts, Schmelzkurve) detektierte Methylierung steigt mit zunehmender Cisplatinkonzentration (Farbgradient hellblau \rightarrow dunkelblau) bei SKOV3 Zellen. A2780 Zellen bleiben unmethyliert. (rot, 100 %; orange, 10 %; gelb, 1 % methylierte bisulfidbehandelte Keratinozyten DNA; grün, bisulfidbehandelte Keratinozyten DNA; schwarz, NTC).

Die Entwicklung der Hypermethylierung von *CAMK2N1* während der Behandlung von A2780 und SKOV3 mit cisplatinhaltigem Medium über mehrere Zyklen mit je dreitägiger Behandlung und anschließender Erholungsphase wurde durch Untersuchung der DNA aus allen Stadien analysiert (Abb. 3.19, Tab. 3.16). Die Cisplatinkonzentration wurde hierbei nach einer definierten Zykluszahl verdoppelt, beginnend bei 0,1 μM bis hin zu 12,8 μM . Bei A2780 konnte keine Änderung der Methylierung von *CAMK2N1* durch Cisplatinbehandlung beobachtet werden (Abb. 3.19 A). Jedoch nimmt in SKOV3 die Methylierung kontinuierlich zu (Abb. 3.19 B). Bei der quantitativen Auswertung mit einer Standardkurve von Gemischen aus *in vitro* methylierter und nicht methylierter bisulfidbehandelter Keratinozyten DNA zeigte sich, dass ab einer Cisplatinkonzentration von 0,8 μM über 1 % und ab 1,6 μM über 10 % der Zellen methyliert sind. Vollständig methyliert ist die Zelllinie ab einer Cisplatinkonzentration von 12,8 μM (Tab. 3.16).

Tab. 3.16 Methylierung von *CAMK2N1* in SKOV3 während der Cisplatinbehandlung

Name	ACTB Ct	CAMK2N1 F1R1 1879/1880		
		Ct	delta Ct (zu ACTB)	Tm
SKOV3; Cisplatin sensitiv	25,06	36,00	10,94	-
SKOV3; 0,1 µM Cisplatin	25,43	-	-	-
SKOV3; 0,2 µM Cisplatin	24,87	37,13	12,26	-
SKOV3; 0,8 µM Cisplatin	24,01	28,38	4,37	75,8
SKOV3; 1,6 µM Cisplatin	24,44	27,39	2,95	76,0
SKOV3; 3,8 µM Cisplatin	25,35	26,87	1,52	76,0
SKOV3; 6,4 µM Cisplatin	24,79	26,49	1,70	76,2
SKOV3; 12,8 µM Cisplatin	24,83	25,94	1,11	76,0
Keratinocyten	23,51	37,78	14,27	< 1 %
1 % meth. Keratinocyten	23,44	31,99	8,55	< 10 %
10 % meth. Keratinocyten	23,50	27,36	3,86	> 10 %
100 % meth. Keratinocyten	22,90	24,00	1,10	≈ 100 %
NTC	-	33,75	33,75	-

Farbgradient grün → rot entspricht Methylierung [%] laut Kontrollen (Keratinocyten).

Um den Verlauf der *de novo* Methylierung genauer aufklären zu können, sind drei Behandlungsstadien (0 µM, 0,8 µM und 12,8 µM Cisplatin) der A2780 und SKOV3 Zellen im Bereich der CpG-Insel tiefensequenziert worden (Abb. 3.20). Aufgrund unzureichender Anzahl von auswertbaren Sequenzen („good Reads“) konnte die Sequenzierung von A2780 nicht ausgewertet werden. Die Sequenzierung der CpG-Insel von *CAMK2N1* in SKOV3 Zellen hat die Zunahme der Methylierung mit steigender Cisplatinkonzentration bestätigt.

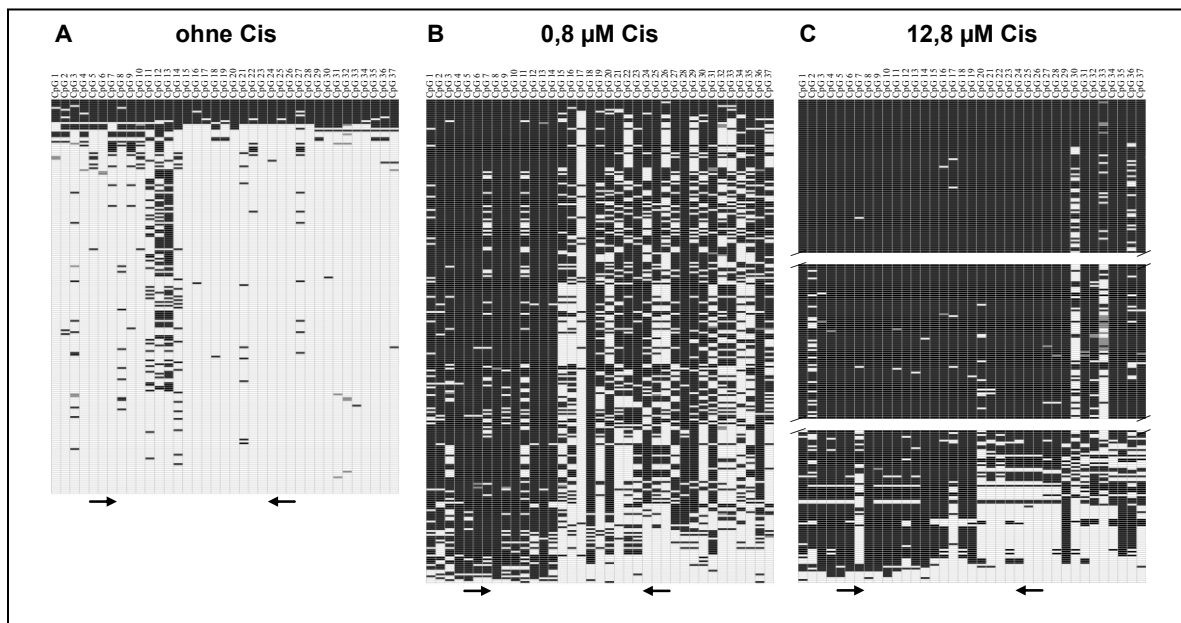


Abb. 3.20 NGS der methylierten Region von *CAMK2N1* in cisplatinbehandelten SKOV3 Zellen

Sequenzierungsergebnis jedes einzelnen CpG-Dinukleotides (Spalten) für ein DNA-Molekül (Zeilen) aus (A) sensitiven unbehandelten SKOV3 Zellen (B) mit 0,8 µM Cisplatin behandelten und (C) mit 12,8 µM Cisplatin behandelten SKOV3 Zellen. Für Sequenzierung C ist wegen großer Datenmenge die ersten, medianen und letzten 80 Reads dargestellt. Pfeile unter den Grafiken beschreiben die Primerbindestellen, welche für q-MS-PCR verwendet wurden (Hellgrau, nicht methyliert; schwarz, methyliert; dunkelgrau, unbekannt).

Der Anteil an methylierten Zellen wurde jedoch mit der q-MS-PCR für unbehandelte und mit 0,8 µM Cisplatin behandelte Zellkulturen unterschätzt. Trotz 5,3 % (unbehandelt) bzw. 17,6 % (0,8 µM Cisplatin) vollständig methylierter Primerbindestellen im Sequenzierungsansatz, wurde durch q-MS-PCR keine bzw. unter 1 %ige Methylierung detektiert (Vgl. Tab. 3.16 und Tab. 3.17). Allerdings konnten aus der Sequenzierung der nicht und mit 0,8 µM Cisplatin behandelten Kulturen nur 209 bzw. 256 Sequenzen (Reads) ausgewertet werden (Tab. 3.17), normal sind durchschnittlich 1500 good Reads. Die mit 12,8 µM Cisplatin behandelten Zellen, welche laut q-MS-PCR zu 100 % methyliert waren (Tab. 3.16), zeigten in der Sequenzierung nur 84,7 % vollständig methylierte Primerbindestellen (Tab. 3.17).

Tab. 3.17 Anteil der in den Primerbindestellen vollständig methylierter Sequenzen in SKOV3 Zellen

	good Reads	vollst. meth. Primerregionen [%]
SKOV3; Cisplatin sensitiv	209	5,3
SKOV3; 0,8 µM Cisplatin	256	17,6
SKOV3; 12,8 µM Cisplatin	1101	84,7
Plazenta, in vitro methyliert	1547	87,9

Inwieweit die Methylierung von *CAMK2N1* Einfluss auf die Expression des Gens hatte, wurde mit q-PCR untersucht. In *SKOV3* Zellen betrug die Expression weniger als 1/150 der Expression der Housekeepinggene *HPRT* und *ACTB*. Die aus niedrigen Expressionswerten resultierenden hohen Standardabweichungen ließen keine eindeutige Aussage zu einer Änderung der Expression durch Methylierung zu. Ein signifikanter Anstieg oder Rückgang konnte nicht erfasst werden. In *A2780* Zellen wurde *CAMK2N1* nicht exprimiert.

4 Diskussion

4.1 Methodik der Methylierungsanalysen

4.1.1 Patienten- und Probenkollektiv

Genomweite Methylierungsanalysen mit gepoolten Patientenproben sind in der Lage spezifische epigenetische Unterschiede zweier Gruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften, in diesem Fall das rezidivfreie Überleben (PFS), zu detektieren. Die Unabhängigkeit von weiteren Faktoren, die das PFS beeinflussen können, müssen dabei zwingend vermieden werden. Durch Verwendung von ausschließlich leitliniengerecht therapierten Patientinnen (tumorfremde Resektion (R0), Platin-Taxan basierte Chemotherapie) wurde die Qualität der Therapie als wichtigster Prognosefaktor ausgeschlossen. Dies spiegelt sich schließlich beim medianen Alter (gesamt: 55 Jahre, Arrayproben mit Rezidiv < 3 Jahre: 56 Jahre, Arrayproben, rezidivfrei: 56,5 Jahre) der verwendeten Patientinnen wider. Die Chemotherapie wird bei über 65-jährigen Patientinnen dreimal weniger angewendet als bei jüngeren Patientinnen, wodurch in diesen Analysen das mediane Alter geringer als das allgemeine mediane Erkrankungsalter (69 Jahre) ist (du Bois *et al.* 2005). Die Unabhängigkeit der Analyse vom histologischen Typ, Tumorstadium, Grading und Nodalstatus wurde ebenfalls gewährleistet. Einflüsse durch große Expressionsunterschiede möglicher molekularer prognostischer Faktoren (p16, p53, Ki67, BRCA1) (Kommos *et al.* 2007, Havrilesky *et al.* 2003, Schindlbeck *et al.* 2007, Radosa *et al.* 2011) konnten durch immunhistochemische Färbung ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren gab es bei keiner Patientin einen Hinweis auf erbliche Vorbelastung.

Da die Struktur der verwendeten Gefrier- und FFPE-Gewebe in den meisten Fällen von Stroma umgebene großflächige Tumoreale zeigte, konnte durch Mikrodissektion der Tumorzellanteil erheblich erhöht werden. Die Tumoreale waren jedoch immer von einzelnen Stroma- und Immunzellen infiltriert, sodass ein Einfluss dieser Zellen auf die Methylierungsanalysen nicht auszuschließen ist. Das Verhältnis von epigenetisch verschiedenen regulatorischen und allgemeinen T-Zellen in Karzinomgeweben ist zu Normalgeweben verschieden (Sehouli *et al.* 2011), und karzinomassoziierte Fibroblasten haben einen Einfluss auf die Progression der Tumoren (Kalluri und Zeisberg 2006), was möglicherweise auch epigenetisch gesteuert wird (Hu *et al.* 2005). Der Tumorzellanteil der analysierten Proben von durchschnittlich 75 % überwiegt jedoch deutlich den Anteilen weiterer Zelltypen und lässt somit eine ausreichend tumorspezifische Analyse zu.

Auf eine Analyse der Methylierung der Kandidatengene in Normalgeweben wurde verzichtet, da das Epithelgewebe der Ovarien oder Tuben, als Ursprungsgewebe der Tumore, nur zu ca. 1 % in Gewebeschnitten von gesunden Patientinnen enthalten ist. Der

bei Verwendung von Normalgewebe resultierende Vergleich von Tumor- zum Bindege- webe des Ovars ist nicht praktikabel. Weiter kam eine Mikrodissektion der Epithelzellen nicht in Frage, da der Aufwand ausreichend Epithel-DNA zu erhalten nicht gerechtfertigt war. Alternativ sind kultivierte Keratinozyten, welche zu 90 % in Epithelgewebe vorhanden sind, verwendet worden. Da die Detektion prognostisch relevanter Methylierungsmuster in Tumorgeweben im Vordergrund stand, wurde die Methylierung in Normalgewebe nicht als Ziel dieser Arbeit angesehen. Für die Etablierung der methylierungsspezifischen Primer ist eine Negativkontrolle jedoch notwendig, um die Spezifität für ausschließlich methylierte DNA zu gewährleisten. DNA aus Keratinozyten eignete sich hervorragend und alle ge- testeten Primerpaare zeigten kein Produkt bei Verwendung von bisulfit-DNA aus Kerati- nozyten.

Die Unterscheidung der prognostischen Gruppen in dieser Arbeit wurde bei 36 Monaten rezidivfreiem Überleben definiert. Dies ist sehr sinnvoll, da viele Studien zeigten, dass nach diesem Zeitpunkt die Wahrscheinlichkeit für weiteres progressionsfreies Überleben sehr hoch ist (McGuire *et al.* 1996, Piccart *et al.* 2000, Schwartz 2008, du Bois *et al.* 2010). Außerdem betrug das rezidivfreie Überleben in der Gruppe mit besserer Prognose mindestens 3,5 Jahre (letzte Patienteninformation) mit einem Unterschied zur längsten rezidivfreien Zeit bei schlechter Prognose von einem $\frac{3}{4}$ Jahr (278 Tage). Dieses relativ große Grenzintervall zwischen den prognostischen Gruppen lässt eine repräsentative Unterscheidung zu.

4.1.2 Anreicherung methylierter DNA und Microarray-Hybridisierung

Die spezifische Anreicherung von methylierter DNA erfolgte mittels MIRA. Im Vergleich zur Immunpräzipitation mit Methylcytosin-Antikörpern hat diese Methode den Vorteil, dass nicht methylierte CpG-Regionen vollständig entfernt werden und dadurch kaum ein Signal bei der Hybridisierung zeigen. Vor allem zur Markersuche kann dies ausgenutzt werden, um Regionen zu identifizieren, die in einer Kontrollgruppe komplett unmethyliert sind.

In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) wurden die für MIRA benötigten rekombinanten MBD Proteine in *E.Coli* nach Rauch *et al.* 2005 / 2009 hergestellt und erfolgreich ange- wendet. Durch Einführung eines kommerziellen Kits auf Basis des MIRA von Activ Motif (MethylCollector™ Ultra Kit) konnte die aufwendige Expression der Proteine eingespart werden. Der Vergleich beider Assays zeigte keine Unterschiede der Sensitivität und Spe- zifität der Anreicherung methylierter DNA. Bei Verwendung des high-salt Waschpuffers wurden beim kommerziellen Kit ausschließlich methylierte DNA-Fragmente isoliert, was mit quantitativer MIRA-PCR nachgewiesen wurde. Die dabei etwas niedrigen PCR-Effi- zienzen resultierten aus der Amplifikation von ultraschallbehandelter DNA. Viele andere Studien nutzen zur Fragmentierung der DNA den Restriktionsverdau mittels MseI-Endo-

nuklease um (1) AT-reiche Sequenzen stärker zu fragmentieren als GC-reiche Sequenzen und (2) DNA-Überhänge zu erhalten, an welche Linker zur Amplifikation der angereicherten methylierten DNA ligiert werden können. So reichen bereits wenige 100 ng gDNA für eine Analyse aus. Bei Anreicherung ohne Amplifikation werden in der Regel jedoch über 20 µg DNA benötigt (Rauch *et al.* 2007). In dieser Arbeit konnte durch Verwendung neuer leistungsfähiger Systeme zur Fluoreszenzmarkierung von DNA, wie dem „BioPrime Total Genomic Labeling System“, die Menge an Ausgangs-DNA auf 2 µg reduziert werden. Dadurch konnte die DNA mittels Ultraschallbehandlung fragmentiert werden und eine Abhängigkeit der Anreicherung von MseI-spezifischen Fragmentlängen, sowie eine möglicherweise ungleichmäßige Amplifikation über Linker vermieden werden.

Die vergleichende Hybridisierung der angereicherten DNA von Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren versus Patientinnen ohne Rezidiv wurde auf benutzerdefinierten (custom) Agilent 2x400K Microarrays durchgeführt. Üblicherweise bietet der Hersteller für genomweite CpG-Insel Microarrayanalysen einen 1x244K Array mit 27.800 CpG-Inseln an. Das Sondenset dieser Arrays wurde als Duplikat auf unsere verwendeten Microarrays aufgebracht. Dies hatte zum einen den Vorteil, dass das Referenzgenom dem aktuellen hg19 (Februar 2009) und nicht dem hg18 (März 2006) entsprach und zum anderen, dass eine enorme Kosteneinsparung durch das Vorhandensein von zwei statt einem Array pro Slide erzielt werden konnte. Die sehr guten (ausgenommen Array 2_1 – akzeptabel) qualitativen Ergebnisse der Microarrayanalysen, welche anhand eines Qualitätsreportes für jeden Array ausgewertet wurden, ist ein Indiz für die Eignung der Methylierungsanalysen mittels MIRA in Kombination mit CpG-Insel Microarray-Hybridisierung. Die etwas schlechtere Qualität von Array 2_1 war durch die bereits geringere Anreicherung methylierter DNA voraus zu sehen. Das Potential der hier verwendeten Methode zur Markerdetektion hatte sich ebenfalls bei der Suche nach diagnostischen Markern für das Zervixkarzinom gezeigt (Hansel *et al.* in-press).

Vergleichbare Studien anderer Arbeitsgruppen mit demselben methodischen Design zur Detektion von prognostischen Markern für das EOC wurden in der Literatur nicht gefunden. Ähnlich ist die Suche nach prognostischen Markern über Sequenzierung von MIRA-DNA (Huang *et al.* 2013). Auch dort wurde methylierte DNA verschiedener prognostischer Gruppen beim EOC mit MBD Proteinen angereichert, anschließend jedoch sequenziert. Die DMR stimmten mit denen dieser Arbeit zu 9,5 % (6/67) überein. Die Mehrheit der genomweiten Methylierungsstudien zur Prognose des EOC verwendeten die methylierungsspezifische Restriktion mit anschließender Amplifikation nicht geschnittener DNA und anschließender Microarrayhybridisierung oder das Infinium Methylation Assay (Wei *et al.* 2002, Wei *et al.* 2006, Dai *et al.* 2011, Bauerschlag *et al.* 2011). Beide Methoden sind mit dieser Arbeit nicht vergleichbar.

4.1.3 Validierung mit quantitativer methylierungsspezifischer PCR

Die quantitative Validierung der Microarrayergebnisse über q-MS-PCR ist eine schnelle Methode, um die DMR an größeren Probensets zu analysieren. Die voraussichtlich sensitivste und spezifischste Region einer DMR zur Unterscheidung der prognostischen Gruppen kann über die Signalstärken der einzelnen Sonden des Microarrays ausgewählt werden. Dies ist von großer Bedeutung, da die Microarrayanalyse auf der Detektion der durchschnittlichen Methylierung von jeweils ca. 475 bp (5 Sonden) beruht, die q-MS-PCR aber spezifisch für die Bindestellen der Primer (2 x ca. 22 bp) ist. Nur so konnten die Primer optimal ausgewählt werden, was letztendlich durch NGS der 6 Kandidatengene bestätigt wurde. Mit diesem Verfahren konnten für alle 37 ausgewählten DMR methylierungsspezifische Primer entworfen und erfolgreich etabliert werden, sodass eine semi-quantitative Auswertung der Proben möglich war. Die Sensitivität von < 1 % methylierten DNA-Molekülen entsprach bei Einsatz von 5 ng bisulfit-DNA und einem durchschnittlichen Tumorzellanteil der Gewebe von 57 % einer Nachweisgrenze von weniger als 2,5 in durchschnittlich 285 Tumorzellen. Diese Sensitivität ist in Primärtumorgewebe völlig ausreichend. Da bereits ca. 1 % der Zellen Einfluss auf das Progressionsverhalten des Tumors haben könnten, ist dieser Wert zugleich als Grenzwert für eine schwache Methylierung definiert worden. Ab 10 % wird von einer starken Methylierung ausgegangen. Die semiquantitative Aussagekraft jedes genspezifischen q-MS-PCR Assays ist durch einen delta Ct Wert von jeweils mindestens 3 zur nächsten Standardprobe (0 %, 1 %, 10 %, 100 % bisulfitbehandelte, *in-vitro* methylierte DNA) sichergestellt worden. Vor allem bei der q-MS-PCR der 6 Kandidatengenen konnte der theoretische delta Ct-Wert von 3,95 zwischen den Standards (bei durchschnittlicher PCR-Effizienz von 1,79) fast erreicht werden. Bei der Amplifikation von bisulfitbehandelter Plasmid-DNA sind Effizienzen von über 90 % möglich (Husseiny *et al.* 2012). In einer anderen Studie, mit bisulfit-DNA aus Abstrichen, schwankten die Effizienzen von 75 % bis 95 % bzw. 52 % bis 105 % (Snellenberg *et al.* 2012). Im Vergleich wurden in dieser Arbeit somit sehr gute q-MS-PCR Effizienzen von durchschnittlich 79 % \pm 4 % bzw. 78 % \pm 7 % bei Gefriergeweben und FFPE-Geweben erreicht. Die höhere Standardabweichung bei FFPE-Geweben begründet sich in der schlechteren gDNA und bisulfit-DNA Qualität. Da DNA während der Bisulfitbehandlung zusätzlich fragmentiert wird, wirkt sich die Qualität der Ausgangs DNA auf die Anzahl der amplifizierbaren Produkte aus (Ehrich *et al.* 2007). Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, da die Ct-Werte der q-MS-PCR mit ACTB-M Primern (Kontroll-PCR) mit dem Fragmentierungsgrad korrelierten. MS-Primer der Kandidatengene RUNX3, CAMK2N1 und KRT86 für Gefriergewebe wurden aus diesem Grund für FFPE-Gewebe verändert um die Produktgröße zu reduzieren. Erst damit war es möglich die Methylierung valide nachzuweisen, wenn auch nur qualitativ.

4.1.4 Next-Generation bisulfit-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde zur Validierung der MS-Primer und q-MS-PCR Ergebnisse sowie zur Aufklärung der Änderung des Methylierungsmusters bei cisplatinbehandelten Zelllinien genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass es zu den ausgewählten Primerbindestellen der DMR keine besseren Alternativen gab und somit die Signale der einzelnen Microarraysonden einen aussagekräftigen Wert für die regionale Methylierung darstellten. Die Sequenzierung von *RUNX3* zeigte, dass für eine Amplifikation mit q-MS-PCR die Primerbindestellen nicht zwingend zu 100 % methyliert gewesen sein müssen. Durch einzelne Mismatches abseits dem 3' Ende in der Primerbindung können auch ursprünglich nicht vollständig methylierte Sequenzen amplifiziert werden, was die q-MS-PCR nicht ganz von einer kompletten Methylierung der DMR abhängig macht. Entscheidend bei der q-MS-PCR ist außerdem die absolute Anzahl an methylierten Targetmolekülen, welche jedoch bei Sequenzierung mit targetspezifischer pre-PCR nicht bestimmbar ist.

Sicher wäre die genomweite NGbS die Methode der Wahl um den Methylierungsstatus jedes CpG in Abhängigkeit vom DNA-Molekül für eine große Anzahl an Patientinnen zu detektieren. Derzeit ist jedoch die NGS noch sehr kostenintensiv und benötigt intensive bioinformatische Analysen der Daten, wird aber in Zukunft den Stellenwert ähnlich der heutigen Microarrays einnehmen und die Validierung mittels PCR oder anderen Verfahren überflüssig machen (Shendure und Ji 2008).

Es wird vermutet, dass die Effizienz der targetspezifischen NGbS, wie fast alle Methoden zur DNA-Analyse teilweise sequenzabhängig ist. Dies zeigte sich bei der Auswertung der parentalen und cisplatinbehandelten SKOV3 Zellen. Je niedriger der Methylierungsgrad war, desto weniger auswertbare Sequenzen erbrachte die NGbS. Die AT-reiche bisulfit-DNA von unmethylierten Regionen wurde mit niedrigerer Effizienz sequenziert, sodass ursprünglich methylierte Sequenzen überrepräsentiert sind. Dies wird geschlossen, da die Analyse mittels q-MS-PCR von parentalen SKOV3 Zellen keinen Anhalt für eine Methylierung im *CAMK2N1* Gen zeigte, die Sequenzierung aber 5,3 % vollständig methylierte Primerregionen bei nur 209 Reads zeigte.

4.2 Identifizierung und Validierung differentiell methylierter Regionen

Genomweite Microarrayanalysen sind sehr aufwendig und kostenintensiv. Dennoch werden so viele Fälle wie mögliche benötigt, um bei der Suche nach gruppenspezifischen epigenetischen Veränderungen valide Ergebnisse zu erzeugen. In dieser Studie sind insgesamt 12 Patientinnen mit unterschiedlichem PFS (<> 3 Jahre) auf nur 4 Microarrays verglichen worden. Durch die Aufteilung der prognostischen Gruppen in jeweils 2 Pools (3 Proben je Pool) und die vergleichende Hybridisierung eines jeden Pools der Gruppen

gegeneinander (siehe Abb. 2.2 in Abschnitt 2.2.4), wurden falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse, beides hervorgerufen durch einzelne methylierte Proben unter mehreren negativen Proben einer Gruppe, ausgeschlossen. Um alle Hybridisierungen in die Detektion der DMR einfließen zu lassen, wurde die Summe der Log₂Ratios einer jeden Sonde der vier Microarrays gebildet. Eine Sonde deckt jeweils einen Sequenzbereich von ≈60 bp ab. Dieser Sequenzbereich ist zu klein um einflussreiche DNA-Methylierung nachzuweisen. Eine Möglichkeit wäre, die mittleren Signalstärken / Ratios einer CpG-Insel zu berechnen. Da sich diese von 200 bp bis zu mehreren Tausend Basenpaaren erstrecken, würden große, aber nur teilweise methylierte CGI nicht berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde zur Detektion die mittlere Methylierung von Abschnitten mit ≈285 bp (3 aufeinander folgende Sonden) verwendet. Die hohe Anzahl an differentiell methylierten Regionen (hypomethyliert: 5449; hypermethyliert: 899) mit mindestens vierfachem Methylierungsunterschied macht die sehr unterschiedliche Methylierung zwischen den verschiedenen Proben deutlich. Zur weiteren Eingrenzung der Anzahl an Kandidaten wurde in einem weiteren Auswahlsschritt die Größe der Regionen auf ≈475 bp bzw. 5 aufeinander folgende Sonden erhöht. Daraus ergaben sich 220 DMR, deren Validierung jedoch immer noch sehr aufwendig wäre. Weitere Kriterien wie Expressionsänderungen in denselben Tumoren, detektiert durch die AG von Prof. Meindl am Klinikum rechts der Isar in München (Volkman *et al.* 2013), Ausprägung der Hypermethylierung, Lokalisation der DMR in Promotor oder 1. Exon sowie Hypermethylierung in cisplatinresistenten Hey Zellen grenzten die Anzahl auf insgesamt 37 DMR ein. Letztendlich stammten fünf von sechs Kandidatengen (RUNX3, ATL1, KATNAL2, KRT86, ATOH8) aus der Gruppe der am stärksten hypermethylierten Regionen, unabhängig von Expression und CpG-Insel Lokalisation. Dies bestätigt die Aussagekraft der Signalstärken in den Microarrayanalysen. Im ersten Schritt der Validierung durch q-MS-PCR ist die Methylierung der einzelnen Tumore aufgeklärt worden, welche für die Microarrayanalysen zu Pools zusammengefasst waren. Von den 37 DMR entsprachen lediglich 2 Regionen nicht den Arrayergebnissen, 95 % konnten bestätigt werden. Möglicherweise können unterschiedliche Kopienzahlen der Regionen in den Tumoren die Anreicherung mittels MIRA beeinflusst haben und führten zu falsch-positiven Ergebnissen (Rauch *et al.* 2006). Für eine weitere Validierung von 24 Kandidatengen an einem größeren Probenet wurde berücksichtigt, dass die Detektion der DMR in gepoolten Proben von der Methylierung einzelner Proben stark beeinflusst werden kann. Aus diesem Grund wurden vorwiegend DMR weiterverfolgt, die in mindestens 2 Einzelproben der jeweiligen prognostischen Gruppe methyliert waren (q-MS-PCR Ergebnisse). Diese Kandidatengene wurden an 48 Patientinnen mit einmaliger q-MS-PCR überprüft. Die Analysen waren nun nicht mehr unabhängig von weiteren prognostischen Faktoren, wie dem histologischen Typ, Nodalstatus, Grading, Resektion oder

der Expression molekularer Faktoren. Dadurch ist ein möglichst reales Patientenkollektiv gewährleistet worden. Einzig das Tumorstadium beschränkte sich auf FIGO IIIB bis IV. Wie, aufgrund der großen Diskrepanz zwischen der Anzahl an analysierten Proben und der ausgewerteten Merkmale durch die Microarrayanalyse erwartet, konnten die meisten Kandidaten nicht am vergrößerten Probenstet validiert werden. Weshalb dies vor allem bei Genen mit Hypermethylierung in der Gruppe mit besserem PFS auftrat bleibt unklar. Dafür konnten sechs vielversprechende, zum Teil signifikant hypermethylierte Marker in der Gruppe mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren entdeckt werden, welche durch unabhängige Wiederholungen der q-MS-PCR bestätigt werden sollten. Vor allem schwache, an der Nachweisgrenze befindliche Methylierungen in den einzelnen Proben konnten somit valide detektiert werden. Die Analyse der Reproduzierbarkeit bestätigte den Verdacht, dass unterschiedliche q-MS-PCR Ergebnisse innerhalb der Triplikate nicht die stark oder unmethylierten Proben, sondern die schwach methylierten (1 % - 10 %) Proben betroffen hatte. Einzig bei *ATOH8* wurde eine Heterogenität auch bei stärker methylierten Proben festgestellt.

Insgesamt wurden während der Validierung aus 220 durch CpG-Island Microarrayanalysen detektierten differentiell methylierten Regionen 18 hypo- und 19 hypermethylierte Regionen mit q-MS-PCR untersucht. Sechs aussichtsreiche Kandidaten konnten weiter mittels NGS und an einem 48 Patientinnen umfassenden Probenstet durch q-MS-PCR validiert werden. Einzig das Kandidatengen *ATOH8* wurde wegen zu hohem Anteil an methylierten Proben in der Gruppe mit rezidivfreiem Krankheitsverlauf und schlechter Reproduzierbarkeit der q-MS-PCR nicht weiter als potentieller Marker verfolgt.

4.3 Marker im FFPE Gewebe

Um die Frage zu klären, ob das Methylierungsmuster der Gefriergewebe auch im entsprechenden FFPE-Gewebe nachweisbar, die Methylierung innerhalb der Tumoren heterogen ist und ob sie sich während der Progression ändert, wurde DNA aus 11 FFPE-Tumoren analysiert. Bedingt durch die schlechte Qualität der bisulfit-DNA, was bereits auf der Fragmentierung der gDNA beruhte, war eine Auswertung der q-MS-PCR dieser Proben nur qualitativ möglich. Dieser Umstand macht deutlich, dass für molekularbiologische Untersuchungen von Tumorgewebe die Art der Konservierung und Lagerung eine bedeutende Rolle spielt. Vor allem Expressionsanalysen an FFPE-Gewebe sind durch den raschen Abbau der RNA nur bedingt möglich (von Ahlfen *et al.* 2007), aber auch DNA-Analysen verlieren deutlich an Sensitivität (Dietrich *et al.* 2013). Trotz dessen konnte eine Übereinstimmung der Methylierung in Gefrier- und FFPE-Gewebe von 73 % - 100 % detektiert werden. Homogen ist die Methylierung vor allem bei *RUNX3*, *KATNAL2* und *KRT86* (> 91 %), im Gegensatz zu *ATL1* und *ATOH8*. In anderen Tumorentitäten wurde

Heterogenität der DNA-Methylierung und von Mutationen innerhalb eines Tumorgewebes und deren Auswirkungen bereits nachgewiesen (Baldus *et al.* 2010, Matsunoki *et al.* 2012). Es ist nicht auszuschließen, dass durch regionale epigenetische Variationen in den Tumorealen das Progressionsverhalten unterschiedlich beeinflusst wird. Bei Rezidiven könnte eine Änderung des Methylierungsmusters im Vergleich zum Primärtumor mit der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht werden (Balch *et al.* 2004). Jedoch hatte diesbezüglich keines der Kandidatengene einen prädiktiven Wert, da die Methylierung von *KATNAL2* und *KRT86* im Verlauf der Rezidive eine Konstanz aufwies (100 %; 88 %), oder im Fall von *RUNX3*, *ATL1* und *ATOH8* mit der Tendenz zur Hypomethylierung fluktuierte. Eine prädiktive Bewertung ist insoweit schwierig, da es sich neben Lokalrezidiven um Rezidive in Scheide, Darm und vor allem Lymphknoten handelte, deren Entwicklung abhängig von der Organumgebung sein kann (Chambers *et al.* 2002). Des Weiteren ist für alle Fragestellungen die Ausdehnung der Analyse auf weitere FFPE-Gewebe von Nöten.

4.4 Korrelation von DNA-Methylierung und Expression

Ein Grund für veränderte Expressionsmuster bei Krebszellen ist die DNA-Methylierung (Jones und Baylin 2007). Ob die prognostischen Marker dieser Arbeit Einfluss auf die Genexpression haben, wurde deshalb durch Expressionsanalysen auf Transkriptions- und Translationsebene analysiert. Durch hohe Sequenzanalogie innerhalb der Keratinfamilie konnten keine *KRT86*-transkriptspezifischen Primer entworfen werden, sodass für dieses Gen keine Expressionsanalysen erfolgen konnten. Für die immunhistochemische Detektion der Proteine waren kommerzielle Antikörper für *RUNX3* und *ATL1* verfügbar, sodass die IHC-Analysen auf diese beiden Proteine beschränkt blieben. Die verwendeten Antikörper sind vom Hersteller jeweils an FFPE-Gewebe getestet worden und die Lokalisation der Färbung in den Analysen dieser Arbeit bestätigte die Funktionsräume der beiden Proteine. *RUNX3*, ein Transkriptionsfaktor, wird ausschließlich im Zellkern gefärbt und *ATL1*, ein Transmembranprotein des Golgi-Apparates, weist eine Zytoplasmafärbung auf. Die Analysen der Genexpression ergaben nur bei *ATL1* ($p=0,01$) und *ATOH8* ($p=0,012$) eine Minderung in Korrelation mit der Methylierung. Bei *ATL1* war auch die Proteinexpression in der methylierten Gruppe signifikant geringer ($p=0,036$). Es liegt nahe, dass diese beiden Gene aktiv durch DNA-Methylierung reguliert werden könnten.

Die Expression mit der Methylierung zu vergleichen war bei *RUNX3* und *ATL1* systematisch schwierig, da beide Gene alternative Transkriptionsstartsites (TSS) aufweisen, welche nur teilweise mit CGI assoziiert sind. *RUNX3* besitzt zwei Transkriptvarianten (TV) für ein und dasselbe Protein, von denen nur TV2 mit einer CGI assoziiert ist. Deshalb wurde die mRNA Expression spezifisch für beide TV gemessen. Das CGI-unabhängige

Transkript war deutlich niedriger und gleichmäßiger exprimiert (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass die CGI unabhängige Variante nur einen geringen Einfluss auf die Proteinexpression und die immunhistochemische Färbung hat. Das *ATL1*-Gen codiert für zwei Proteine (Isoform a, b), welche über drei TV mit insgesamt 2 TSS synthetisiert werden. TV1 und TV2 sind CGI assoziiert, wovon die Isoform a (IFa) vollständig, die Isoform b (IFb) nur teilweise abhängig ist, da letztere auch durch die CGI unabhängige TV3 codiert wird. Die mRNA wurde mittels q-RT-PCR transkript- sowie isoformspezifisch gemessen. Die immunhistochemische Färbung wird aber immer von beiden Protein-Isoformen beeinflusst. Am stärksten exprimiert wurden TV3 im Vergleich zu TV1/2, sowie IFb im Vergleich zu IFa (Daten nicht gezeigt). Die Proteinexpression kann in diesem Fall nur unter Vorbehalt mit der Methylierung in Korrelation gesetzt werden. Schlussfolgernd konnte die Genexpression aller Kandidatengene spezifisch mit der Methylierung verglichen werden. Die Proteinexpression wird jedoch, vor allem bei *ATL1*, durch epigenetisch unabhängige Transkripte beeinflusst. Diese Komplexität der Regulationsmechanismen in Zusammenhang mit DNA-Methylierung betrifft auch andere tumorrelevante Gene (Illingworth und Bird 2009). Bei Genen deren Expression nachweislich direkt durch Methylierung beeinflusst wird, sind CGI im Promotor und vor allem dem ersten Exon verantwortlich (Brenet *et al.* 2011). Die untersuchten CGI der Gene *KATNAL2*, *CAMK2N1* und *ATOH8* sind hauptsächlich im ersten Exon lokalisiert, trotzdem konnte auch hier keine Korrelation der Expression mit der Methylierung festgestellt werden. Dies kann zum Teil an dem generell niedrigen Expressionsniveau liegen. Geht man von 1-10 (*HPRT*) und 10-100 (*ACTB*) Kopien je Zelle der Housekeepinggene aus (Steen *et al.* 1990, Lupberger *et al.* 2002), wurden für *CAMK2N1* und *ATOH8* eine Kopie, *KATNAL2* und *RUNX3* 0,25 bis eine Kopie und für *ATL1* nur 0,025 Kopien je Zelle gemessen. Selbst bei Berücksichtigung einer Expression ausschließlich in Tumorzellen deren Anteil ca. 50 % im Gesamtschnitt beträgt, ist die Expression aller Kandidatengene sehr gering. Anders als bei der Hypermethylierung von tumorrelevanten Genen, wo von unmethylierten CGI der Gene in Stromazellen (Epithel, Keratinozyten) ausgegangen wird, ist die gemessene Expression immer abhängig vom gesamten Gewebe. Des Weiteren muss eine fehlende Methylierung nicht unbedingt zu einer höheren Expression von Genen führen, da auch weitere Faktoren wie Histonmodifikationen und Transkriptionsfaktoren die Expression beeinflussen. Ein mögliches funktionelles Silencing der Gene kann deshalb abschließend nicht geklärt werden, ist aber für *ATL1* und *ATOH8* wahrscheinlich.

Um differentielle Methylierung mit direktem Einfluss auf die Expression zu detektieren, gibt es neben den hier beschriebenen Expressionsanalysen auch weitere Möglichkeiten. Meist werden Zelllinien mit DNMT-Inhibitoren (Azacytidine) behandelt und anschließend die Expressionsmuster verglichen (Soengas *et al.* 2001, Suzuki *et al.* 2002). Dieses recht

unspezifische Verfahren geht jedoch mit einer relativ hohen falsch-positiv Rate einher. Eine bessere Alternative ist zum Beispiel die gezielte Transkriptionsaktivierung über MBD gekoppelte Transkriptionsaktivierung (Sato *et al.* 2011).

Da das Ziel dieser Arbeit die Etablierung von epigenetischen Markern ist, wurden diese und weitere funktionelle Analysen nicht durchgeführt. Die Folgen von Überexpression und Repression der Kandidatengene durch viralen Gentransfer, siRNA und weitere Verfahren sowie die Beeinflussung der DNA-Methylierung durch DNMT-Inhibitoren soll zukünftig von der hiesigen Arbeitsgruppe in Zellkulturmodellen untersucht werden.

4.5 Wertigkeit der prognostischen Marker für das EOC

Die Validierung der 37 ausgewählten DMR durch q-MS-PCR an 48 EOC identifizierte fünf Kandidatengene (*RUNX3*, *KATNAL2*, *ATL1*, *CAMK2N1*, *KRT86*) mit hoher Spezifität (83,3 % - 100 %) für die Voraussage eines Rezidives innerhalb 3 Jahren.

Eine wichtige Rolle für die Wertigkeit von epigenetischen prognostischen Markern spielt die Funktion der Kandidatengene im Zusammenhang mit der Tumorgenese. Die Funktionen von Atlantin 1 (*ATL1*), eine GTPase in der Membran des Golgi-Apparates und Keratin 86, ein Typ II Keratin in Haaren und Nägeln, können in keine direkten Zusammenhänge mit Krebserkrankungen gebracht werden (Langbein und Schweizer 2005, Park *et al.* 2010). Die weiteren drei Kandidatengene (*RUNX3*, *KATNAL2* und *CAMK2N1*) wurden in der Vergangenheit bereits mit Karzinogenese in Verbindung gebracht. Interessanterweise konnten diese die prognostischen Gruppen am besten unterscheiden.

Der Runt-related transcription factor 3 (*RUNX3*) wird sehr kontrovers als Tumorsuppressor und Onkogen in diversen Tumorentitäten diskutiert (Normile 2011, Chuang und Ito 2010). Auch für das EOC gibt es widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Studien. In einer Studie zeigte *RUNX3* onkogene Eigenschaften, da Repression und Überexpression in OvCa-Zelllinien die Proliferation und Koloniebildung hemmten bzw. steigerten (Lee *et al.* 2011). Andererseits ist beim malignen OvCa *RUNX3* im Gegensatz zu Normalgewebe in 53,1 % der Tumoren methyliert und korreliert mit Abschaltung der Expression, was auf tumorsuppressive Eigenschaften des Gens schließen lässt (Zhang *et al.* 2009). Auch in dieser Arbeit waren eine Vielzahl (33,3 %) der Tumore methyliert. Letzteres bestätigt die theoretisch tumorsuppressive Eigenschaften von *RUNX3*, da es ein Target im TGF- β Signalweg ist und die physiologische Antwort auf antiproliferative und proapoptotische Signale durch Unterdrückung von *RUNX3* gestört sein kann (Hanai *et al.* 1999, Li *et al.* 2002). Dies bestätigen auch Studien an anderen Tumorentitäten, bei denen eine niedrige Expression von *RUNX3* mit DNA-Methylierung, Radiosensitivität und schlechter Prognose beim Ösophaguskarzinom (Sakakura *et al.* 2007) sowie Chemoresistenz bei Lungenkarzinom (Zheng *et al.* 2013) korreliert. Prognostischen Wert hat die *RUNX3*-Methylierung

außerdem beim Blasenkarzinom (Yan *et al.* 2012). In dieser Arbeit konnte die *RUNX3*-Methylierung Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 33,3 % detektieren und korrelierte hoch signifikant ($p=0,008$) mit dem Krankheitsverlauf, was die überwiegenden tumorsuppressiven Indizien deutlich bekräftigt. Eine weitere Analyse aller Methylierungsdaten in Hinsicht auf das PFS von $<$ vs. $>$ 12 Monaten zeigte außerdem, dass *RUNX3* als einziges Kandidatengen auch Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 12 Monaten signifikant von den weiteren unterscheiden kann (Sensitivität: 39 %, Spezifität: 90 %, $p=0,027$). Es liegt nahe, dass *RUNX3* einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose der von Methylierung betroffenen Patientinnen hat und einen wichtigen prognostischen Marker darstellt.

KATNAL2 (Katanin p60 subunit A-like 2) findet man vor allem im Zusammenhang mit SNPs in gutartigen Hirntumoren (Hosking *et al.* 2011) und es gibt Hinweise, dass genetischen Veränderungen autistische Störungen begünstigen (Neale *et al.* 2012). Da *KATNAL2* der p60 Untereinheit des Katanin (*KATNA1*) ähnlich ist, könnten gemeinsame Funktionen in Frage kommen. Katanin ist ein Mikrotubuli schneidendes Enzym und baut unter anderem den Spindelapparat während der Anaphase in der Mitose ab (McNally *et al.* 2000). In Prostatakrebs führt die Überexpression der Katanin p60 Untereinheit zur Inhibierung der Proliferation, aber erhöhter Migration (Ye *et al.* 2012). Die Methylierung des zu *KATNA1* ähnlichen *KATNAL2* Gens könnte, bei gleicher Funktion, ebenso in das Gleichgewicht der Mikrotubuli eingreifen und die Progression von Karzinomen beeinflussen. Chemotherapeutika auf der Basis von Taxanen wirken ähnlich, behindern den Abbau von Mikrotubuli und führen auf Grund des Ungleichgewichtes im Spindelapparat zur Apoptose (Ke *et al.* 2004). Beim Zervixkarzinom wird die Hypermethylierung von *KATNAL2* als Marker diskutiert (Lendvai *et al.* 2012). Sollte *KATNAL2* ähnliche Funktion wie sein Analoga haben, ist ein Einfluss auf die Tumourprogression höchst wahrscheinlich.

CAMK2N1 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II Inhibitor I) ist ein direkter Inhibitor von *CAMK2*, welcher zahlreiche physiologische Funktionen der Zelle reguliert. Eine Überexpression von *CAMK2N1*, inhibiert das Zellwachstums durch p27 vermittelten Zellarrest in der S-Phase. Die Suppression von *CAMK2N1* führt zur Verstärkten Degradation von p27 (Wang *et al.* 2008). Dadurch korreliert beim Kolonkarzinom die Expression negativ mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Zellwachstums *in vitro* und *in vivo* (Wang *et al.* 2008). Für das OvCa gibt es noch keine Publikationen in Verbindung mit *CAMK2N1*. Jedoch inhibiert *CAMK2N2*, neben *CAMK2N1* ein weiterer *CAMK2*-Inhibitor, ebenfalls das Wachstum von OvCa-Zellen *in vitro* und *in vivo* (Ma *et al.* 2009). Es liegt sehr nahe, dass eine Inhibierung von *CAMK2N1*, zum Beispiel durch Methylierung, die Progression des OvCa begünstigen kann.

Die drei Gene (*RUNX3*, *KATNAL2*, *CAMK2N1*) mit möglichen tumorsuppressiven Eigenschaften konnten die prognostischen Gruppen einzeln und in Kombination am besten unterscheiden, was die Relevanz für den Einfluss auf die Tumorprogression bekräftigt. Die konkreten Funktionen der Methylierung der Kandidatengene müssen in Zukunft durch weitere Analysen aufgeklärt werden.

Die höchsten Signifikanzen (R0 Patientinnen: $p < 0,001$) zur Unterscheidung der prognostischen Gruppen konnte mit Kombination der Kandidatengene erreicht werden. Außerdem wurde dabei die Sensitivität bei gleichbleibender Spezifität gesteigert. In der Fachliteratur ist keine Studie gefunden worden, welche höhere statistische Werte für eine Unterscheidung von prognostischen Gruppen des EOC in Bezug auf Methylierungsanalysen erreichten. Insgesamt fünf Kombinationen konnten die prognostischen Gruppen bei Einbeziehung aller 48 Patientinnen signifikant ($p < 0,05$), drei davon hoch signifikant ($p < 0,01$) unterscheiden.

Der größte Prognosefaktor des EOC ist derzeit der Resektionsstatus. Ein verbleibender Tumorrest von > 1 mm verkürzt das PFS enorm (Griffiths *et al.* 2002, du Bois *et al.* 2009). Aus diesem Grund wurde die Abhängigkeit der prognostische Wertigkeit der Marker vom Resektionsstatus betrachtet. Der Ausschluss der Patientinnen mit makroskopischem Tumorrest führte nicht zur Veränderung der Sensitivität und Spezifität der Marker. Somit ist die Wertigkeit der Marker unabhängig vom Resektionsstatus. Die identifizierten Marker sollten somit insbesondere für optimal resektierte Patientinnen, für die kein Prognosemarker etabliert ist weiter charakterisiert werden. Zudem konnte *RUNX3* und dessen Kombinationen mit anderen Markern die prognostischen Gruppen sogar besser unterscheiden als der Resektionsstatus ($p = 0,018$ vs. $p < 0,01$ und $p < 0,001$).

In dem 48 Patientinnen umfassenden Probenstet zur Validierung waren die Proben aus dem Detektionsstet mit einbezogen worden. Jedoch konnten auch nach Ausschluss der Proben des Detektionsstet ($n = 12$) immer noch drei Markerkombinationen Patientinnen mit Rezidiv innerhalb 3 Jahren nach OP von den rezidivfreien Patientinnen signifikant ($p < 0,05$) unterscheiden. Bei weiterer Betrachtung des progressionsfreien Überlebens (PFS) durch Kaplan-Meyer Analysen (Abb. 4.1) hatten Patientinnen des unabhängigen Probenstets mit einer Methylierung im *RUNX3* oder *CAMK2N1* Gen einen deutlichen Nachteil ($p = 0,005$). Auch dies war unabhängig von der Resektion, da R0-resektierte Patientinnen mit Methylierung ebenso kürzer lebten ($p = 0,014$) (Steinbach *et al.* unpublished manuscript). Dies bekräftigt weiter den prognostischen Wert der Hypermethylierung von *RUNX3* und *CAMK2N1*.

Welche einzelnen Marker letztendlich für eine klinische Anwendung in Frage kommen könnten kann hier abschließend nicht geklärt werden. Dazu bedarf es einer größeren Validierungsstudie mit mehreren hundert Patientinnen.

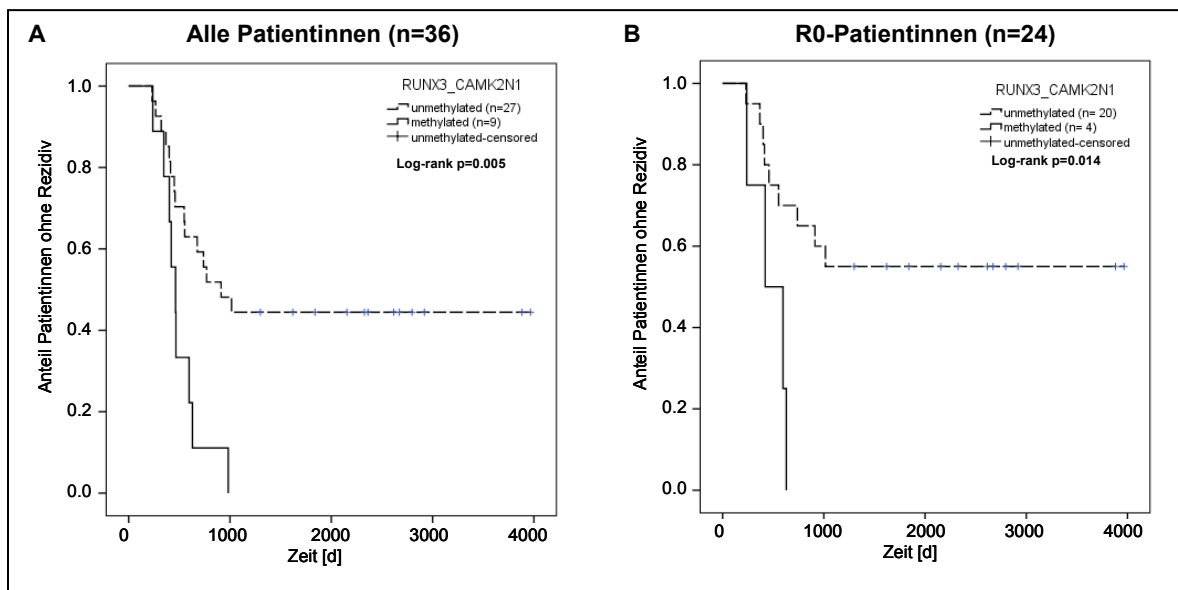


Abb. 4.1 Kaplan-Meier Analyse des PFS bei Patientinnen des unabhängigen Probensets bezüglich der Methylierung von RUNX3 / CAMK2N1 (Steinbach *et al.* unpublished manuscript)
A: Analyse für alle Patientinnen, B: makroskopisch tumorfrei operierte (R0) Patientinnen

4.6 Prädiktiver Wert von CAMK2N1

Eine Hypermethylierung von CAMK2N1 wurde durch q-MS-PCR und Microarrayanalysen in den klinischen Proben mit Rezidiv sowie in cisplatinresistenten Hey und SKOV3 Zellen festgestellt. Zellkulturanalysen von SKOV3 Zellen zeigten die sukzessive Hypermethylierung bei Behandlung mit steigender Cisplatinkonzentration (bis 12,8 μM Cisplatin) im Zellkulturmedium. Dies wurde durch q-MS-PCR sowie NGS nachgewiesen. Es wird daher vermutet, dass es einen möglichen funktionellen Zusammenhang der CAMK2N1-Methylierung mit der Cisplatinresistenz gibt. In den parentalen SKOV3 Zellen wurden einzelne methylierte Sequenzen im Promotorbereich von *CAMK2N1* gefunden. Wäre dies nicht so, müsste man von einer *de novo* Methylierung während der Resistenzentwicklung ausgehen. Da jedoch *CAMK2N1* in geringem Maße methyliert ist, kann weder eine *de novo* Methylierung noch eine Selektion von Zellen mit Methylierung ausgeschlossen werden. *In vivo* entwickeln Patientinnen mit EOC in den meisten Fällen erst mit der Chemotherapie eine Resistenz (Koberle *et al.* 2010). Auch hier ist noch völlig unbekannt, ob Tumorzellen durch *de novo* Methylierung eine Resistenz entwickeln oder die therapieinduzierte Selektion von prä-methylierten Tumorzellen ein Rezidiv oder Metastasen verursachen könnte.

Überexpression und Inhibierung von CAMK2N1 durch stabilen Gentransfer in Zellkulturen ist nötig und wird in der Arbeitsgruppe durchgeführt werden, um die Funktion von *CAMK2N1* und dessen Methylierung in Zusammenhang mit Progression und Resistenz aufzuklären. Erste Ergebnisse zeigten bereits eine methylierungsabhängige Inhibierung der Genexpression unter Cisplatinbehandlung.

4.7 Schlussfolgerungen

Potentielle epigenetische Marker für die Prognose und Prädiktion des EOC können mittels Anreicherung methylierter DNA und anschließenden CpG-Island Microarrayanalysen detektiert werden. Danach bedarf es einer Validierung an einem ausreichend großen Probenstet, wodurch Marker mit hoher Sensitivität und Spezifität für die Unterscheidung von prognostischen Gruppen etabliert werden. Eine wichtige Rolle bei der Detektion der Methylierung spielt das verwendete Gewebe und die daraus resultierende DNA Qualität. Im Fall der klinischen Anwendung sollte dieser Faktor jedoch durch Analyse von frischem postoperativem Gewebematerial ausgeschlossen werden können.

Nur die Kombination von mehreren Genen führte letztendlich zu einem anwendbaren Markersset, welches prognostische Gruppen hoch signifikant unterscheidet und ein Rezidiv mit hoher Spezifität voraussagen kann. Neben der prognostischen Wertigkeit kann auch die Resistenzentwicklung von Tumoren durch epigenetische Veränderungen bedingt sein. Gezeigt hat dies das Gen *CAMK2N1*, welches in Abhängigkeit von der Cisplatinresistenz hypermethyliert ist, was einen Einfluss auf die Genexpression hat. Die vorliegenden Daten beweisen, dass epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf von Ovarialkarzinompatientinnen stehen. Die Expression der einzelnen Gene hat jedoch keinen Einfluss auf die Wertigkeit eines Markers, kann aber bei Korrelation mit der Methylierung Aufschluss auf die mögliche Funktion eines Gens in der Tumorgenese geben.

Weitere Studien mit größeren Fallzahlen sind nötig, um die hier gefundenen Marker und deren Kombinationen eindeutig zu bewerten. Funktionelle Analysen aller Markergene sollten den Einfluss auf die Tumorgenese näher beleuchten.

Finden epigenetisch Marker zu gegebener Zeit Anwendung, welche zu individuellen Therapieansätzen führen, so könnte damit das progressionsfreie Überleben oder die Lebensqualität von Patientinnen mit Ovarialkarzinom gesteigert werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. 1999. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer*, 81 (2):214-218.
- Allen ND, Norris ML, Surani MA. 1990. Epigenetic control of transgene expression and imprinting by genotype-specific modifiers. *Cell*, 61 (5):853-861.
- Antequera F, Bird A. 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (24):11995-11999.
- Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, Jenuwein T, Xu G, Leonhardt H, Wolf V, Walter J. 2012. *In Vivo* Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. *PLoS Genet*, 8 (6):e1002750.
- Avner P, Heard E. 2001. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, 2 (1):59-67.
- Balch C, Huang TH, Brown R, Nephew KP. 2004. The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *Am J Obstet Gynecol*, 191 (5):1552-1572.
- Balch C, Matei DE, Huang TH, Nephew KP. 2010. Role of epigenomics in ovarian and endometrial cancers. *Epigenomics*, 2 (3):419-447.
- Balch C, Fang F, Matei DE, Huang TH, Nephew KP. 2009. Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer. *Endocrinology*, 150 (9):4003-4011.
- Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. 2010. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res*, 16 (3):790-799.
- Ballestar E, Wolffe AP. 2001. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem*, 268 (1):1-6.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116 (2):281-297.
- Barton CA, Hacker NF, Clark SJ, O'Brien PM. 2008. DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol Oncol*, 109 (1):129-139.
- Bast RC, Jr., Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. 1998. CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers*, 13 (4):179-187.
- Bauerschlag DO, Ammerpohl O, Brautigam K, Schem C, Lin Q, Weigel MT, Hilpert F, Arnold N, Maass N, Meinhold-Heerlein I, Wagner W. 2011. Progression-free survival in ovarian cancer is reflected in epigenetic DNA methylation profiles. *Oncology*, 80 (1-2):12-20.
- Beard C, Li E, Jaenisch R. 1995. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev*, 9 (19):2325-2334.

- Beral V, Million Women Study C, Bull D, Green J, Reeves G. 2007. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 369 (9574):1703-1710.
- Berletch JB, Liu C, Love WK, Andrews LG, Katiyar SK, Tollefsbol TO. 2008. Epigenetic and genetic mechanisms contribute to telomerase inhibition by EGCG. *J Cell Biochem*, 103 (2):509-519.
- Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, Fan JB. 2006. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res*, 16 (3):383-393.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16 (1):6-21.
- Bird A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447 (7143):396-398.
- Bird AP. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321 (6067):209-213.
- Bird AP, Southern EM. 1978. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J Mol Biol*, 118 (1):27-47.
- Bird AP, Wolffe AP. 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, 99 (5):451-454.
- Bois AD, Rochon J, Lamparter C, for the Ago Organkommission Ovar Pfisterer J. 2005. Pattern of care and impact of participation in clinical studies on the outcome in ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 15 (2):183-191.
- Bois Ad, Rochon J, Lamparter C, Pfisterer J. 2009. Die Qualität der Rezidivtherapie beim Ovarialkarzinom in Deutschland. *FRAUENARZT*, 50 (Nr. 11):952-959.
- Bosman FT, de Goeij AF, Rousch M. 1992. Quality control in immunocytochemistry: experiences with the oestrogen receptor assay. *J Clin Pathol*, 45 (2):120-124.
- Boyce J, Bird A. 1992. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J*, 11 (1):327-333.
- Brachova P, Thiel KW, Leslie KK. 2013. The Consequence of Oncomorphic TP53 Mutations in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*, 14 (9):19257-19275.
- Brautigam K, Bauerschlag DO, Weigel MT, Biernath-Wuppig J, Bauknecht T, Arnold N, Maass N, Meinhold-Heerlein I. 2009. Combination of enzastaurin and pemetrexed inhibits cell growth and induces apoptosis of chemoresistant ovarian cancer cells regulating extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Transl Oncol*, 2 (3):164-173.
- Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, Scandura JM. 2011. DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. *PLoS ONE*, 6 (1):e14524.
- Brinkman AB, Simmer F, Ma K, Kaan A, Zhu J, Stunnenberg HG. 2010. Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods*, 52 (3):232-236.

- Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, Boente M, Birrer MJ, Liang SX, Gynecologic Oncology G. 2011. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365 (26):2473-2483.
- Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, Reding DJ, Greenlee RT, Yokochi LA, Kessel B, Crawford ED, Church TR, Andriole GL, Weissfeld JL, Fouad MN, Chia D, O'Brien B, Ragard LR, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hartge P, Pinsky PF, Zhu CS, Izmirlian G, Kramer BS, Miller AB, Xu JL, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD, Team PP. 2011. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 305 (22):2295-2303.
- Cancer Genome Atlas Research N. 2011. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474 (7353):609-615.
- Carlson JW, Miron A, Jarboe EA, Parast MM, Hirsch MS, Lee Y, Muto MG, Kindelberger D, Crum CP. 2008. Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention. *J Clin Oncol*, 26 (25):4160-4165.
- Cedar H. 1988. DNA methylation and gene activity. *Cell*, 53 (1):3-4.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2 (8):563-572.
- Chang X, Monitto CL, Demokan S, Kim MS, Chang SS, Zhong X, Califano JA, Sidransky D. 2010. Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers. *Cancer Res*, 70 (7):2870-2879.
- Cho KR, Shih le M. 2009. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, 4:287-313.
- Chuang JC, Jones PA. 2007. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*, 61 (5 Pt 2):24R-29R.
- Chuang LS, Ito Y. 2010. RUNX3 is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors. *Oncogene*, 29 (18):2605-2615.
- Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. 2003. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques*, 35 (1):146-150.
- Collins Y, Dicioccio R, Keitz B, Lele S, Odunsi K. 2006. Methylation of death-associated protein kinase in ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*, 16 Suppl 1:195-199.
- Costello JF, Plass C. 2001. Methylation matters. *J Med Genet*, 38 (5):285-303.
- Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P, eds. 2007. *Cancer Incidence in Five Continents*, vol. 9. IARC Scientific Publications No 160 Lyon: IARC, 2007
- Dai W, Teodoridis JM, Zeller C, Graham J, Hersey J, Flanagan JM, Stronach E, Millan DW, Siddiqui N, Paul J, Brown R. 2011. Systematic CpG islands methylation profiling of genes in the wnt pathway in epithelial ovarian cancer identifies biomarkers of progression-free survival. *Clin Cancer Res*, 17 (12):4052-4062.

- Deaton AM, Bird A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25 (10):1010-1022.
- Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. 2009. Epigenetic control. *J Cell Physiol*, 219 (2):243-250.
- Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, Kristiansen G. 2013. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One*, 8 (10):e77771.
- du Bois A, Rochon J, Lamparter C, Pfisterer J. 2005. Ovarialkarzinom – Versorgungsstruktur und -qualität in Deutschland 2001–2004. *FRAUENARZT*, 46 (Nr. 7).
- du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. 2009. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115 (6):1234-1244.
- du Bois A, Herrstedt J, Hardy-Bessard AC, Muller HH, Harter P, Kristensen G, Joly F, Huober J, Avall-Lundqvist E, Weber B, Kurzeder C, Jelic S, Pujade-Lauraine E, Burges A, Pfisterer J, Gropp M, Staehle A, Wimberger P, Jackisch C, Sehouli J. 2010. Phase III trial of carboplatin plus paclitaxel with or without gemcitabine in first-line treatment of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 28 (27):4162-4169.
- Dubeau L. 2008. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol*, 9 (12):1191-1197.
- Duffy MJ, Napieralski R, Martens JW, Span PN, Spyrtos F, Sweep FC, Brunner N, Foekens JA, Schmitt M, Group EP. 2009. Methylated genes as new cancer biomarkers. *Eur J Cancer*, 45 (3):335-346.
- Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. 2004. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res*, 10 (6):1887-1893.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. 2000. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 28 (8):E32.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429 (6990):457-463.
- Ehrich M, Zoll S, Sur S, van den Boom D. 2007. A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. *Nucleic Acids Res*, 35 (5):e29.
- Esteller M. 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21 (35):5427-5440.
- Esteller M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet*, 16 Spec No 1:R50-59.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127 (12):2893-2917.

- Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, De Greve J, Lubinski J, Shanley S, Messiou C, A'Hern R, Tutt A, Ashworth A, Stone J, Carmichael J, Schellens JH, de Bono JS, Kaye SB. 2010. Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol*, 28 (15):2512-2519.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (5):1827-1831.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31 (15):1869-1883.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196 (2):261-282.
- Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD. 2002. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res*, 62 (14):3925-3928.
- Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham TH, Andreesen R, Mackensen A, Rehli M. 2006a. Rapid and sensitive detection of CpG-methylation using methyl-binding (MB)-PCR. *Nucleic Acids Res*, 34 (11):e82.
- Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham TH, Schilling E, Klug M, Andreesen R, Rehli M. 2006b. Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia. *Cancer Res*, 66 (12):6118-6128.
- Gifford G, Paul J, Vasey PA, Kaye SB, Brown R. 2004. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, 10 (13):4420-4426.
- Gitan RS, Shi H, Chen CM, Yan PS, Huang TH. 2002. Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res*, 12 (1):158-164.
- Gladieff L, Ferrero A, De Rauglaudre G, Brown C, Vasey P, Reinthaller A, Pujade-Lauraine E, Reed N, Lorusso D, Siena S, Helland H, Elit L, Mahner S. 2012. Carboplatin and pegylated liposomal doxorubicin versus carboplatin and paclitaxel in partially platinum-sensitive ovarian cancer patients: results from a subset analysis of the CALYPSO phase III trial. *Ann Oncol*, 23 (5):1185-1189.
- Gloss BS, Samimi G. 2012. Epigenetic biomarkers in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*.
- Gonzalgo ML, Liang G, Spruck CH, 3rd, Zingg JM, Rideout WM, 3rd, Jones PA. 1997. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res*, 57 (4):594-599.
- Gordon AN, Tonda M, Sun S, Rackoff W, Doxil Study I. 2004. Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 95 (1):1-8.

- Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S. 2000. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet*, 26 (1):16-17.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. 2001. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, 51 (1):15-36.
- Griffiths CT, Parker LM, Lee S, Finkler NJ. 2002. The effect of residual mass size on response to chemotherapy after surgical cytoreduction for advanced ovarian cancer: long-term results. *Int J Gynecol Cancer*, 12 (4):323-331.
- Hafner N, Diebolder H, Jansen L, Hoppe I, Durst M, Runnebaum IB. 2011. Hypermethylated DAPK in serum DNA of women with uterine leiomyoma is a biomarker not restricted to cancer. *Gynecol Oncol*, 121 (1):224-229.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1):57-70.
- Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, Imamura T, Ishidou Y, Fukuchi M, Shi MJ, Stavnezer J, Kawabata M, Miyazono K, Ito Y. 1999. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J Biol Chem*, 274 (44):31577-31582.
- Hansel A, Steinbach D, Greinke C, Schmitz M, Eiselt J, Scheungraber C, Hoyer H, Runnebaum IB, Dürst M. in-press. A promising DNA methylation signature for the triage of high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *PLOS one*, accepted for publication.
- Havrilesky L, Darcy k M, Hamdan H, Priore RL, Leon J, Bell J, Berchuck A, Gynecologic Oncology Group S. 2003. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 21 (20):3814-3825.
- Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S, Beller U. 2006. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 95 Suppl 1:S161-192.
- Heisler LE, Torti D, Boutros PC, Watson J, Chan C, Winegarden N, Takahashi M, Yau P, Huang TH, Farnham PJ, Jurisica I, Woodgett JR, Bremner R, Penn LZ, Der SD. 2005. CpG Island microarray probe sequences derived from a physical library are representative of CpG Islands annotated on the human genome. *Nucleic Acids Res*, 33 (9):2952-2961.
- Herman JG. 1999. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol*, 9 (5):359-367.
- Herman JG, Baylin SB. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349 (21):2042-2054.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (18):9821-9826.
- Hodges E, Smith AD, Kendall J, Xuan Z, Ravi K, Rooks M, Zhang MQ, Ye K, Bhattacharjee A, Brizuela L, McCombie WR, Wigler M, Hannon GJ, Hicks JB. 2009. High definition profiling of mammalian DNA methylation by array capture and single molecule bisulfite sequencing. *Genome Res*, 19 (9):1593-1605.

- Holliday R. 1979. A new theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*, 40 (4):513-522.
- Horsthemke B. 2010. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 154C (3):321-328.
- Hosking FJ, Feldman D, Bruchim R, Olver B, Lloyd A, Vijayakrishnan J, Flint-Richter P, Broderick P, Houlston RS, Sadetzki S. 2011. Search for inherited susceptibility to radiation-associated meningioma by genomewide SNP linkage disequilibrium mapping. *Br J Cancer*, 104 (6):1049-1054.
- Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V, Polyak K. 2005. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*, 37 (8):899-905.
- Huang RL, Gu F, Kirma NB, Ruan J, Chen CL, Wang HC, Liao YP, Chang CC, Yu MH, Pilrose JM, Thompson IM, Huang HC, Huang TH, Lai HC, Nephew KP. 2013. Comprehensive methylome analysis of ovarian tumors reveals hedgehog signaling pathway regulators as prognostic DNA methylation biomarkers. *Epigenetics*, 8 (6):624-634.
- Huang TH, Perry MR, Laux DE. 1999. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet*, 8 (3):459-470.
- Husseiny MI, Kuroda A, Kaye AN, Nair I, Kandeel F, Ferreri K. 2012. Development of a Quantitative Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction Method for Monitoring Beta Cell Death in Type 1 Diabetes. *PLoS ONE*, 7 (10):e47942.
- Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, Herman JG, Dulaimi E, Edelson MI, Bergman C, Ehya H, Eisenberg BL, Cairns P. 2004. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res*, 64 (18):6476-6481.
- Illingworth RS, Bird AP. 2009. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett*, 583 (11):1713-1720.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 61 (4):1659-1665.
- Jelovac D, Armstrong DK. 2011. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin*, 61 (3):183-203.
- Jin SG, Kadam S, Pfeifer GP. 2010. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res*, 38 (11):e125.
- Jones PA, Laird PW. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 21 (2):163-167.
- Jones PA, Baylin SB. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128 (4):683-692.
- Jowaed A, Schmitt I, Kaut O, Wullner U. 2010. Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *J Neurosci*, 30 (18):6355-6359.
- Kalluri R, Zeisberg M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6 (5):392-401.

- Kauff ND, Domchek SM, Friebel TM, Robson ME, Lee J, Garber JE, Isaacs C, Evans DG, Lynch H, Eeles RA, Neuhausen SL, Daly MB, Matloff E, Blum JL, Sabbatini P, Barakat RR, Hudis C, Norton L, Offit K, Rebbeck TR. 2008. Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study. *J Clin Oncol*, 26 (8):1331-1337.
- Ke S, Wen X, Wu QP, Wallace S, Charnsangavej C, Stachowiak AM, Stephens CL, Abbruzzese JL, Podoloff DA, Li C. 2004. Imaging taxane-induced tumor apoptosis using PEGylated, ¹¹¹In-labeled annexin V. *J Nucl Med*, 45 (1):108-115.
- Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, Rand E, Hecht M, Segal E, Pikarski E, Young RA, Niveleau A, Cedar H, Simon I. 2006. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet*, 38 (2):149-153.
- King MC, Marks JH, Mandell JB, New York Breast Cancer Study G. 2003. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302 (5645):643-646.
- Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. 2010. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*, 1806 (2):172-182.
- Kommos S, du Bois A, Ridder R, Trunk MJ, Schmidt D, Pfisterer J, Kommos F, Ago O. 2007. Independent prognostic significance of cell cycle regulator proteins p16(INK4a) and pRb in advanced-stage ovarian carcinoma including optimally debulked patients: a translational research subprotocol of a randomised study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. *Br J Cancer*, 96 (2):306-313.
- Konstantinopoulos PA, Cannistra SA, Fountzilas H, Culhane A, Pillay K, Rueda B, Cramer D, Seiden M, Birrer M, Coukos G, Zhang L, Quackenbush J, Spentzos D. 2011. Integrated analysis of multiple microarray datasets identifies a reproducible survival predictor in ovarian cancer. *PLoS One*, 6 (3):e18202.
- Korshunova Y, Maloney RK, Lakey N, Citek RW, Bacher B, Budiman A, Ordway JM, McCombie WR, Leon J, Jeddloh JA, McPherson JD. 2008. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. *Genome Res*, 18 (1):19-29.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128 (4):693-705.
- Laird PW. 2010. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*, 11 (3):191-203.
- Landen CN, Jr., Birrer MJ, Sood AK. 2008. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 26 (6):995-1005.
- Langbein L, Schweizer J. 2005. Keratins of the human hair follicle. *Int Rev Cytol*, 243:1-78.
- Lee CWL, Chuang LSH, Kimura S, Lai SK, Ong CW, Yan B, Salto-Tellez M, Choolani M, Ito Y. 2011. RUNX3 functions as an oncogene in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 122 (2):410-417.

- Leitlinienprogramm-Onkologie, Krebsgesellschaft D, Krebshilfe D, AWMF. 2013. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Kurzversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL.
- Lendvai A, Johannes F, Grimm C, Eijnsink JJ, Wardenaar R, Volders HH, Klip HG, Hollema H, Jansen RC, Schuurung E, Wisman GB, van der Zee AG. 2012. Genome-wide methylation profiling identifies hypermethylated biomarkers in high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Epigenetics*, 7 (11):1268-1278.
- Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itoharu S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. 2002. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*, 109 (1):113-124.
- Lieu PT, Jozsi P, Gilles P, Peterson T. 2005. Development of a DNA-labeling system for array-based comparative genomic hybridization. *J Biomol Tech*, 16 (2):104-111.
- Liggett TE, Melnikov A, Yi Q, Replogle C, Hu W, Rotmensch J, Kamat A, Sood AK, Levenson V. 2011. Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecol Oncol*, 120 (1):113-120.
- Lister R, Ecker JR. 2009. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res*, 19 (6):959-966.
- Lo YM, Wong IH, Zhang J, Tein MS, Ng MH, Hjelm NM. 1999. Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 59 (16):3899-3903.
- Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, Esteller M. 2006. A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res*, 66 (17):8342-8346.
- Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, le Coutre P, Schmidt CA. 2002. Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes*, 16 (1):25-30.
- Ma S, Yang Y, Wang C, Hui N, Gu L, Zhong H, Cai Z, Wang Q, Zhang Q, Li N, Cao X. 2009. Endogenous human CaMKII inhibitory protein suppresses tumor growth by inducing cell cycle arrest and apoptosis through down-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/HDM2 pathway. *J Biol Chem*, 284 (37):24773-24782.
- Main C, Bojke L, Griffin S, Norman G, Barbieri M, Mather L, Stark D, Palmer S, Riemsma R. 2006. Topotecan, pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride and paclitaxel for second-line or subsequent treatment of advanced ovarian cancer: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, 10 (9):1-132 iii-iv.
- Makarla PB, Saboorian MH, Ashfaq R, Toyooka KO, Toyooka S, Minna JD, Gazdar AF, Schorge JO. 2005. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms. *Clin Cancer Res*, 11 (15):5365-5369.
- Manfredi JJ, Horwitz SB. 1984. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther*, 25 (1):83-125.

- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437 (7057):376-380.
- Matsunoki A, Kawakami K, Kotake M, Kaneko M, Kitamura H, Ooi A, Watanabe G, Minamoto T. 2012. LINE-1 methylation shows little intra-patient heterogeneity in primary and synchronous metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, 12:574.
- McDonald LE, Paterson CA, Kay GF. 1998. Bisulfite genomic sequencing-derived methylation profile of the *xist* gene throughout early mouse development. *Genomics*, 54 (3):379-386.
- McGarvey KM, Greene E, Fahrner JA, Jenuwein T, Baylin SB. 2007. DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. *Cancer Res*, 67 (11):5097-5102.
- McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. 1996. Cyclophosphamide and Cisplatin Compared with Paclitaxel and Cisplatin in Patients with Stage III and Stage IV Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 334 (1):1-6.
- McLaughlin JR, Rosen B, Moody J, Pal T, Fan I, Shaw PA, Risch HA, Sellers TA, Sun P, Narod SA. 2013. Long-term ovarian cancer survival associated with mutation in BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst*, 105 (2):141-148.
- McNally KP, Bazirgan OA, McNally FJ. 2000. Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin. *J Cell Sci*, 113 (Pt 9):1623-1633.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454 (7205):766-770.
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 1995. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*, 1 (7):686-692.
- Michaelson-Cohen R, Keshet I, Straussman R, Hecht M, Cedar H, Beller U. 2011. Genome-wide de novo methylation in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 21 (2):269-279.
- Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, Jia P, Assadzadeh A, Flanagan J, Schumacher A, Wang SC, Petronis A. 2008. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet*, 82 (3):696-711.
- Mogensen O. 1992. Prognostic value of CA 125 in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 44 (3):207-212.

- Montavon C, Gloss BS, Warton K, Barton CA, Statham AL, Scurry JP, Tabor B, Nguyen TV, Qu W, Samimi G, Hacker NF, Sutherland RL, Clark SJ, O'Brien PM. 2012. Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 124 (3):582-588.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393 (6683):386-389.
- Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V, Polak P, Yoon S, Maguire J, Crawford EL, Campbell NG, Geller ET, Valladares O, Schafer C, Liu H, Zhao T, Cai G, Lihm J, Dannenfelser R, Jabado O, Peralta Z, Nagaswamy U, Muzny D, Reid JG, Newsham I, Wu Y, Lewis L, Han Y, Voight BF, Lim E, Rossin E, Kirby A, Flannick J, Fromer M, Shakir K, Fennell T, Garimella K, Banks E, Poplin R, Gabriel S, DePristo M, Wimbish JR, Boone BE, Levy SE, Betancur C, Sunyaev S, Boerwinkle E, Buxbaum JD, Cook EH, Jr., Devlin B, Gibbs RA, Roeder K, Schellenberg GD, Sutcliffe JS, Daly MJ. 2012. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, 485 (7397):242-245.
- Ness RB, Grisso JA, Klapper J, Schlesselman JJ, Silberzweig S, Vergona R, Morgan M, Wheeler JE. 2000. Risk of ovarian cancer in relation to estrogen and progestin dose and use characteristics of oral contraceptives. SHARE Study Group. *Steroid Hormones and Reproductions*. *Am J Epidemiol*, 152 (3):233-241.
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. 1999. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, 23 (1):58-61.
- Normile D. 2011. Cancer research. Dispute over tumor suppressor gene Runx3 boils over. *Science*, 334 (6055):442-443.
- Oda M, Glass JL, Thompson RF, Mo Y, Olivier EN, Figueroa ME, Selzer RR, Richmond TA, Zhang X, Dannenberg L, Green RD, Melnick A, Hatchwell E, Bouhassira EE, Verma A, Suzuki M, Grealley JM. 2009. High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. *Nucleic Acids Res*, 37 (12):3829-3839.
- Ohgane J, Yagi S, Shiota K. 2008. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta*, 29 Suppl A:S29-35.
- Pal A, Srivastava T, Sharma MK, Mehndiratta M, Das P, Sinha S, Chattopadhyay P. 2010. Aberrant methylation and associated transcriptional mobilization of Alu elements contributes to genomic instability in hypoxia. *J Cell Mol Med*, 14 (11):2646-2654.
- Pal T, Permut-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, LaPolla J, Hoffman M, Martino MA, Wakeley K, Wilbanks G, Nicosia S, Cantor A, Sutphen R. 2005. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*, 104 (12):2807-2816.
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. 2000. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res*, 60 (21):5954-5958.

- Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C. 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest*, 120 (4):1097-1110.
- Pattamadilok J, Huapai N, Rattanatanyong P, Vasurattana A, Triratanachat S, Tresukosol D, Mutirangura A. 2008. LINE-1 hypomethylation level as a potential prognostic factor for epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 18 (4):711-717.
- Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, Gorham J, Smalley W, Washington MK, Schultenover S, Gautam S, Markowitz SD, Grady WM. 2005. Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res*, 11 (3):1203-1209.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Pfisterer J, Plante M, Vergote I, du Bois A, Hirte H, Lacave AJ, Wagner U, Stahle A, Stuart G, Kimmig R, Olbricht S, Le T, Emerich J, Kuhn W, Bentley J, Jackisch C, Luck HJ, Rochon J, Zimmermann AH, Eisenhauer E, Ago O, Ncic CTG, Eortc GCG. 2006. Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *J Clin Oncol*, 24 (29):4699-4707.
- Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E, Stuart G, Kaye S, Vergote I, Blom R, Grimshaw R, Atkinson RJ, Swenerton KD, Trope C, Nardi M, Kaern J, Tumolo S, Timmers P, Roy J-A, Lhoas F, Lindvall B, Bacon M, Birt A, Andersen JE, Zee B, Paul J, Baron B, Pecorelli S. 2000. Randomized Intergroup Trial of Cisplatin–Paclitaxel Versus Cisplatin–Cyclophosphamide in Women With Advanced Epithelial Ovarian Cancer: Three-Year Results. *Journal of the National Cancer Institute*, 92 (9):699-708.
- Radosa MP, Hafner N, Camara O, Diebolder H, Mothes A, Winzer H, Jansen L, Durst M, Runnebaum IB. 2011. Loss of BRCA1 protein expression as indicator of the BRCAness phenotype is associated with favorable overall survival after complete resection of sporadic ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 21 (8):1399-1406.
- Rathi A, Virmani AK, Schorge JO, Elias KJ, Maruyama R, Minna JD, Mok SC, Girard L, Fishman DA, Gazdar AF. 2002. Methylation profiles of sporadic ovarian tumors and nonmalignant ovaries from high-risk women. *Clin Cancer Res*, 8 (11):3324-3331.
- Rauch T, Pfeifer GP. 2005. Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. *Lab Invest*, 85 (9):1172-1180.
- Rauch T, Li H, Wu X, Pfeifer GP. 2006. MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. *Cancer Res*, 66 (16):7939-7947.
- Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. 2007. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (13):5527-5532.
- Rauch TA, Pfeifer GP. 2009. The MIRA Method for DNA Methylation Analysis DNA Methylation. In: Tost J, Hrsg.: Humana Press, 65-75.

- Reed ML, Leff SE. 1994. Maternal imprinting of human SNRPN, a gene deleted in Prader-Willi syndrome. *Nat Genet*, 6 (2):163-167.
- Reik W, Dean W, Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293 (5532):1089-1093.
- RKI, GEKID. 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012
- Robinson MD, Storzaker C, Statham AL, Coolen MW, Song JZ, Nair SS, Strbenac D, Speed TP, Clark SJ. 2010. Evaluation of affinity-based genome-wide DNA methylation data: effects of CpG density, amplification bias, and copy number variation. *Genome Res*, 20 (12):1719-1729.
- Roche-Diagnostics-Corporation. 2009. Genome Sequencer FLX System, Amplicon Fusion Primer Design Guidelines for GS FLX Titanium Series Lib-A Chemistry. Roche Technical Bulletin, TCB No. 013-2009 (August 2009).
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*, 37 (6):e45.
- Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. 1991. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet*, 48 (5):880-888.
- Sakakura C, Miyagawa K, Fukuda KI, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Ida H, Yazumi S, Yamagishi H, Okanoue T, Chiba T, Ito K, Hagiwara A, Ito Y. 2007. Frequent silencing of RUNX3 in esophageal squamous cell carcinomas is associated with radioresistance and poor prognosis. *Oncogene*, 26 (40):5927-5938.
- Sato Y, Horii A, Fukushige S. 2011. Microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation (MeTA-array) identifies hypermethylated genes containing the stringent criteria of CpG islands at high frequency. *Epigenetics*, 6 (6):752-759.
- Schilling E, Rehli M. 2007. Global, comparative analysis of tissue-specific promoter CpG methylation. *Genomics*, 90 (3):314-323.
- Schindlbeck C, Hantschmann P, Zerzer M, Jahns B, Rjosk D, Janni W, Rack B, Sommer H, Friese K. 2007. Prognostic impact of KI67, p53, human epithelial growth factor receptor 2, topoisomerase IIalpha, epidermal growth factor receptor, and nm23 expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow. *Int J Gynecol Cancer*, 17 (5):1047-1055.
- Schwartz PE. 2008. Cytoreductive surgery in the management of ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)*, 22 (9):1025-1033; discussion 1033-1028, 1041, 1045.
- Sehouli J, Loddenkemper C, Cornu T, Schwachula T, Hoffmuller U, Grutzkau A, Lohneis P, Dickhaus T, Grone J, Kruschewski M, Mustea A, Turbachova I, Baron U, Olek S. 2011. Epigenetic quantification of tumor-infiltrating T-lymphocytes. *Epigenetics*, 6 (2):236-246.

- Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, Ronnett BM. 2004. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol*, 23 (1):41-44.
- Sellar GC, Watt KP, Rabiasz GJ, Stronach EA, Li L, Miller EP, Massie CE, Miller J, Contreras-Moreira B, Scott D, Brown I, Williams AR, Bates PA, Smyth JF, Gabra H. 2003. OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nat Genet*, 34 (3):337-343.
- Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. 2012. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev*, 64 (3):706-721.
- Shendure J, Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 26 (10):1135-1145.
- Siddik ZH. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22 (47):7265-7279.
- Singal R, Ginder GD. 1999. DNA methylation. *Blood*, 93 (12):4059-4070.
- Snellenberg S, Strooper LM, Hesselink A, Meijer C, Snijders P, Heideman D, Steenbergen R. 2012. Development of a multiplex methylation-specific PCR as candidate triage test for women with an HPV-positive cervical scrape. *BMC Cancer*, 12 (1):551.
- Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409 (6817):207-211.
- Steen AM, Luthman H, Hellgren D, Lambert B. 1990. Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells. *Exp Cell Res*, 186 (2):236-244.
- Steinbach D, Häfner N, Jansen L, Dürst M, Runnebaum IB. unpublished manuscript. Identification of prognostic epigenetic markers for epithelial ovarian cancer.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403 (6765):41-45.
- Strathdee G, MacKean MJ, Illand M, Brown R. 1999. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 18 (14):2335-2341.
- Suter CM, Martin DI, Ward RL. 2004. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet*, 36 (5):497-501.
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB. 2002. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet*, 31 (2):141-149.
- Svahn MF, Faber MT, Christensen J, Norrild B, Kjaer SK. 2013. Prevalence of human papillomavirus in epithelial ovarian cancer tissue. A meta-analysis of observational studies. *Acta Obstet Gynecol Scand*.

- Takai D, Jones PA. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (6):3740-3745.
- Tam KF, Liu VW, Liu SS, Tsang PC, Cheung AN, Yip AM, Ngan HY. 2007. Methylation profile in benign, borderline and malignant ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133 (5):331-341.
- Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, Ardern-Jones A, Norman A, Kaye SB, Gore ME. 2008. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol*, 26 (34):5530-5536.
- Tavassoli FA, Devilee P, eds. 2003. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003
- Taylor KH, Kramer RS, Davis JW, Guo J, Duff DJ, Xu D, Caldwell CW, Shi H. 2007. Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res*, 67 (18):8511-8518.
- Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S, Research E-AcEOf, Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian N. 2003. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst*, 95 (2):113-125.
- Turker MS. 2002. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene*, 21 (35):5388-5393.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40 (15):e115.
- van Diest PJ, Weger DR, Lindholm J. 1996. Reproducibility of subjective immunoscore of steroid receptors in breast cancer. *Anal Quant Cytol Histol*, 18 (5):351-354.
- Volkman J, Reuning U, Rudelius M, Hafner N, Schuster T, Becker VRA, Weimer J, Hilpert F, Kiechle M, Durst M, Arnold N, Schmalfeldt B, Meindl A, Ramser J. 2013. High expression of crystallin alphaB represents an independent molecular marker for unfavourable ovarian cancer patient outcome and impairs TRAIL- and cisplatin-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Int J Cancer*, 132 (12):2820-2832.
- Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, Calonne E, Volkmar U, Igoillo-Esteve M, Naamane N, Del Guerra S, Masini M, Bugliani M, Marchetti P, Cnop M, Eizirik DL, Fuks F. 2012. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J*, 31 (6):1405-1426.
- von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. 2007. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One*, 2 (12):e1261.
- Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. 2001. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg*, 234 (1):10-20.

- Wang C, Li N, Liu X, Zheng Y, Cao X. 2008. A novel endogenous human CaMKII inhibitory protein suppresses tumor growth by inducing cell cycle arrest via p27 stabilization. *J Biol Chem*, 283 (17):11565-11574.
- Wang ZC, Birkbak NJ, Culhane AC, Drapkin R, Fatima A, Tian R, Schwede M, Alsop K, Daniels KE, Piao H, Liu J, Etemadmoghadam D, Miron A, Salvesen HB, Mitchell G, DeFazio A, Quackenbush J, Berkowitz RS, Iglehart JD, Bowtell DD, Australian Ovarian Cancer Study G, Matulonis UA. 2012. Profiles of genomic instability in high-grade serous ovarian cancer predict treatment outcome. *Clin Cancer Res*, 18 (20):5806-5815.
- Watt F, Molloy PL. 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*, 2 (9):1136-1143.
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D. 2005. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*, 37 (8):853-862.
- Wei SH, Chen CM, Strathdee G, Harnsomburana J, Shyu CR, Rahmatpanah F, Shi H, Ng SW, Yan PS, Nephew KP, Brown R, Huang TH. 2002. Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. *Clin Cancer Res*, 8 (7):2246-2252.
- Wei SH, Balch C, Paik HH, Kim YS, Baldwin RL, Liyanarachchi S, Li L, Wang Z, Wan JC, Davuluri RV, Karlan BY, Gifford G, Brown R, Kim S, Huang TH, Nephew KP. 2006. Prognostic DNA methylation biomarkers in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 12 (9):2788-2794.
- Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Muller HM, Fiegl H, Goebel G, Marth C, Muller-Holzner E, Zeimet AG, Laird PW, Ehrlich M. 2004. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res*, 64 (13):4472-4480.
- Widschwendter M, Apostolidou S, Jones AA, Fourkala EO, Arora R, Pearce CL, Frasco MA, Ayhan A, Zikan M, Cibula D, Iyibozkurt CA, Yavuz E, Hauser-Kronberger C, Dubeau L, Menon U, Jacobs IJ. 2009. HOXA methylation in normal endometrium from premenopausal women is associated with the presence of ovarian cancer: a proof of principle study. *Int J Cancer*, 125 (9):2214-2218.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL. 2007. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1775 (1):138-162.
- Wisman GB, Nijhuis ER, Hoque MO, Reesink-Peters N, Koning AJ, Volders HH, Buikema HJ, Boezen HM, Hollema H, Schuurin E, Sidransky D, van der Zee AG. 2006. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. *Int J Cancer*, 119 (8):1908-1914.
- Xiong Z, Laird PW. 1997. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*, 25 (12):2532-2534.
- Yan C, Kim YW, Ha YS, Kim IY, Kim YJ, Yun SJ, Moon SK, Bae SC, Kim WJ. 2012. RUNX3 methylation as a predictor for disease progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *J Surg Oncol*, 105 (4):425-430.

- Ye X, Lee YC, Choueiri M, Chu K, Huang CF, Tsai WW, Kobayashi R, Logothetis CJ, Yu-Lee LY, Lin SH. 2012. Aberrant expression of katanin p60 in prostate cancer bone metastasis. *Prostate*, 72 (3):291-300.
- Yu W, Jin C, Lou X, Han X, Li L, He Y, Zhang H, Ma K, Zhu J, Cheng L, Lin B. 2011. Global analysis of DNA methylation by Methyl-Capture sequencing reveals epigenetic control of cisplatin resistance in ovarian cancer cell. *PLoS One*, 6 (12):e29450.
- Yuan E, Haghghi F, White S, Costa R, McMinn J, Chun K, Minden M, Tycko B. 2006. A single nucleotide polymorphism chip-based method for combined genetic and epigenetic profiling: validation in decitabine therapy and tumor/normal comparisons. *Cancer Res*, 66 (7):3443-3451.
- Zeller C, Dai W, Steele NL, Siddiq A, Walley AJ, Wilhelm-Benartzi CS, Rizzo S, van der Zee A, Plumb JA, Brown R. 2012. Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. *Oncogene*, 31 (42):4567-4576.
- Zhang Q, Hu G, Yang Q, Dong R, Xie X, Ma D, Shen K, Kong B. 2013. A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA. *Gynecologic Oncology*, 130 (1):132-139.
- Zhang S, Wei L, Zhang A, Zhang L, Yu H. 2009. RUNX3 gene methylation in epithelial ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines. *OMICS*, 13 (4):307-311.
- Zheng Y, Wang R, Song HZ, Pan BZ, Zhang YW, Chen LB. 2013. Epigenetic downregulation of RUNX3 by DNA methylation induces docetaxel chemoresistance in human lung adenocarcinoma cells by activation of the AKT pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 45 (11):2369-2378.
- Ziller MJ, Müller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, Boyle P, Epstein CB, Bernstein BE, Lengauer T, Gnirke A, Meissner A. 2011. Genomic Distribution and Inter-Sample Variation of Non-CpG Methylation across Human Cell Types. *PLoS Genet*, 7 (12):e1002389.
- Ziolkowska-Seta I, Madry R, Kraszewska E, Szymanska T, Timorek A, Rembiszewska A, Kupryjanczyk J. 2009. TP53, BCL-2 and BAX analysis in 199 ovarian cancer patients treated with taxane-platinum regimens. *Gynecol Oncol*, 112 (1):179-184.
- Zuo T, Tycko B, Liu TM, Lin JJ, Huang TH. 2009. Methods in DNA methylation profiling. *Epigenomics*, 1 (2):331-345.

6 Anhang

Der

Anhang für den wissenschaftlichen Teil dieser Dissertation befindet sich auf der beiliegenden CD mit folgenden Dateien:

- Ausführliches Protokoll zur Microarray-Datenanalyse
Datei: Datenanalyse_Microarray.pdf

- Abb. 6.1 bis Abb. 6.4. zum Qualitätsreport der Microarrays 1_2, 2_1, 2_2 und 4_1
Datei: Abbildungen_Qualitätsreport.pdf

- Tab. 6.4: Statistische Daten der prognostischen Marker
Datei: Statistische_Daten_Marker.pdf

Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit liegt sie nun vor Ihnen: meine Dissertation. Damit ist es an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in diesem akademischen Lebensabschnitt begleitet und unterstützt haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinem Betreuer Dr. rer. nat. Norman Häfner verpflichtet, in dessen Forschungsprojekt ich in hervorragender Zusammenarbeit mitwirken und promovieren durfte. Er hat mich in jeder Lage unterstützt und durch fachliche Diskussionen inspiriert und auf den richtigen Weg gebracht.

Nicht weniger zu danken gilt es meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst. Ohne seine sehr gute akademische Betreuung und die wertvollen Ratschläge bei der Erörterung meiner Ergebnisse wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Professoren/-innen, welche sich bereit erklärt haben diese Dissertation zu begutachten.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der praktischen Arbeit, das harmonische und aufgeweckte Arbeitsklima sowie die schönen Unternehmungen auch außerhalb des Labors danke ich allen Kollegen des Funktionsbereiches „Gynäkologische Molekularbiologie“.

Die Durchführung von laserbasierter Mikrodisektion und genomweiten Microarrayanalysen war nur durch die technische Unterstützung der Core Unit Chip Applikation am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikum Jena möglich. Dafür bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Ferdinand von Eggeling.

Für das Verständnis meiner gestressten Blicke und die Verbreitung von guter Laune während dem Verfassen dieser Dissertation bedanke ich mich bei meiner geliebten Lebensgefährtin Anja Schubert und den Kindern Vincent und Adrian.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und die Promotion nicht möglich gewesen wären. Sie und meine Schwester haben mit Stolz auf diesen Tag gewartet, nun haltet ihr meine Dissertation in den Händen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. rer. nat. Norman Häfner

Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Zwickau, 19.12.2013

Unterschrift