

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der Universität
Tübingen
Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik

Die Rolle der differentiellen Methylierung und Expression
von *ATP11A* und *ATP11B* bei der Entstehung von
Platinresistenz bei high-grade-serösen
Ovarialkarzinomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Nording, geb. Stüble, Anne Kristin

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. - A. Taran
Tag der Disputation: 15.07.2019

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Tumore des Eierstocks.....	1
1.1.1. Histopathologische Unterscheidung der Neoplasien des Eierstocks	1
1.1.2. Klassifizierung der Ovarialtumore mittels FIGO und TNM	4
1.1.3. Tumorgenese von serösen Ovarialkarzinomen	6
1.1.4. Risikofaktoren von high-grade serösen Ovarialkarzinome	8
1.1.5. Diagnostik, Therapie und Verlauf von Ovarialtumoren	9
1.2. Platinhaltige Chemotherapie.....	10
1.2.1. Wirkungsweise platinhaltiger Chemotherapie.....	10
1.2.2. Resistenzentwicklung auf platinhaltige Chemotherapie bei Ovarialtumoren.....	12
1.2.3. Rolle von <i>ATP11B/A</i> bei Resistenzentwicklung von Ovarialtumoren auf platinhaltige Chemotherapie.....	14
1.3. Epigenetik bei Ovarialtumoren und ihr Einfluss auf Resistenzentwicklung	15
1.4. Projektbeschreibung	18
2. Material und Methoden	21
2.1. Tumorgewebe.....	21
2.1.1. Zusammenstellung der Kohortengruppen.....	21
2.1.2. Kriterien für die Erweiterung der Kohorten Gruppen.....	22
2.2. Zelllinien.....	23
2.3. Generierung von DNA & cDNA von Tumorproben	24
2.3.1. Anfertigung von Kryoschnitten	24

2.3.2.	Hämatoxillin & Eosin Färbung der Referenzschnitte	25
2.3.3.	DNA/RNA Isolation	26
2.3.4.	DNA/RNA-Quantifizierung	27
2.3.5.	RNA-Qualitätskontrolle	28
2.3.6.	cDNA Synthese.....	29
2.4.	Methylierungsanalyse.....	30
2.4.1.	Bisulfitkonvertierung.....	31
2.4.2.	Primer Design für Amplifizierung und Sequenzierung der DNA ..	32
2.4.3.	Polymerase Kettenreaktion für die <i>cg21570597</i> -Site auf Chromosom 13.....	35
2.4.4.	Agarosegele zur Erfolgskontrolle der Amplifizierung	36
2.4.5.	Erstellung des Run-Assays und Volumina Berechnungen für die PyroMark Sequenzierung.....	37
2.4.6.	Probenvorbereitung zur PyroMark Sequenzierung.....	39
2.4.7.	PyroMark Sequenzierung mittels PyroMark Q96 ID	43
2.4.8.	Qualitätskontrollen der PyroMark Sequenzierung	45
2.4.9.	Auswertung der PyroMark Sequenzierung	47
2.5.	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion	48
2.5.1.	Primerdesign für qRT-PCR.....	49
2.5.2.	Durchführung der qRT-PCR	50
2.5.3.	Effizienzbestimmung mit Hilfe von Standardkurven.....	53
2.5.4.	Berechnung der relativen Expression von Genen	54
2.6.	Statistik	55
3.	ERGEBNISSE	56
3.1.	Entitäten und Klassifizierung der Tumorproben.....	56

3.1.1. Signatur und Eigenschaften der einzelnen Tumoren bei platinresistenten und sensitiven Tumorproben.....	56
3.2. Histologische Validierung und Qualitätskontrollen der Tumor RNA und DNA.....	59
3.2.1. Kyroschnitte und HE-Färbungen aus stickstoffkonservierten Tumorproben.....	59
3.2.2. Quantität- und Qualitätskontrollen von isolierter Tumor DNA & mRNA mittels Agilent Bioanalyzer 2100 und NanoDrop [®] Spektrophotometer.....	62
3.3. Bisulfitkonvertierung und Polymerase Kettenreaktion mit biotinylierten Primern zur Vorbereitung des Pyrosequencing.....	66
3.3.1. Genamplifizierung der Tumorproben und dessen Erfolgskontrolle mittels Agarosegelen.....	66
3.4. Methylierungsanalysen der 46 Ovarialkarzinome mittels Pyrosequencing.....	69
3.4.1. Qualitätsüberprüfung des Assays.....	69
3.4.2. Methylierungslevel von platinresistenten versus platinsensitiven Ovarialkarzinomen.....	73
3.5. Expressionsanalysen von <i>ATP11A</i> & <i>ATP11B</i> in Zelllinien unterschiedlicher Cisplatinresistenz sowie in 46 Ovarialkarzinomen....	79
3.5.1. Expression von <i>ATP11A</i> und <i>ATP11B</i> in Zelllinien unterschiedlicher Cisplatinresistenz.....	79
3.5.2. Expression von <i>ATP11A</i> und <i>ATP11B</i> in platinresistenten versus platinsensitiven Tumoren.....	82
4. Diskussion.....	90
4.1. Design und Ziele der Arbeit im aktuellen Kontext der Resistenzforschung von Ovarialkarzinomen.....	90

4.2. Expressionsanalysen von P-Typ ATPasen <i>ATP11A</i> und <i>ATP11B92</i>	
4.3. Methylierungslevel von <i>ATP11A</i> im 450k-Array versus PyroMark-Sequenziermethode	95
4.3.1. Qualitätsprüfung des humanen 450k Methylierungsarray von Illumina sowie der PyroMark Sequenziermethode	95
4.3.2. SNP für die <i>cg21570597</i> -Stelle: eine mögliche Diskrimination zwischen platinresistenten und sensitiven Patienten	99
4.3.3. Bewertung der Methylierungsergebnisse.....	100
5. Zusammenfassung.....	102
6. Literatur.....	102
7. Abbildungen.....	114
8. Tabellen.....	116
9. Erklärung zum Eigenanteil	117
10. Danksagung	118
11. Lebenslauf.....	119

Abkürzungen

%	Prozent
Abb.	Abbildung
ACD	acid-citrate-dextrose
ADP	Adenosin-Diphosphat
APS	Adenosin-Phosphosulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar
bps.	beispielsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cp-Wert	Crossing point
d	Tag
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
et al.	Et altera, und Kollegen
GSH	γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycin
g	gravitation force, Gravitationskraft oder Gramm
GP	Glykoprotein
HGSOC	high-grade-seröses Ovarialkarzinom
H&E	Hämatoxylin und Eosin
Hb	Haemoglobin
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
LDI	Laserdoppler-Imager

min	Minute
n.s.	nicht signifikant
PBS	phosphate-buffered saline solution, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SF	Standardfehler
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World Health Organisation
μ	Mikro

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1. Tumore des Eierstocks

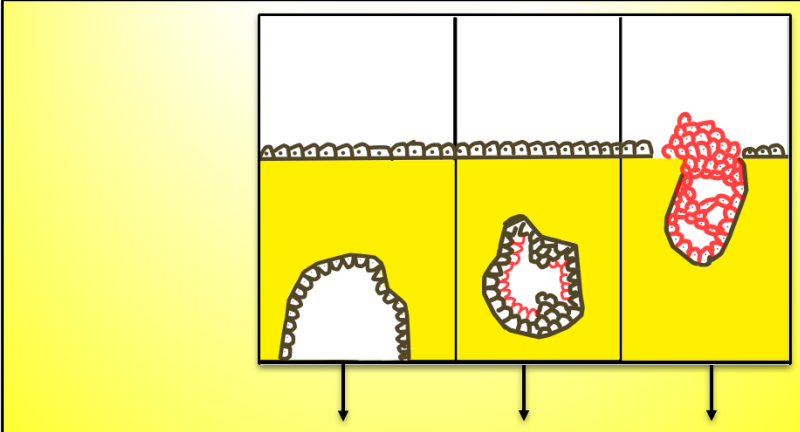
Unter den Neuerkrankungen an Tumoren steht Eierstockkrebs bei Frauen an 8.Stelle in Deutschland (Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2017). 2014 erkrankten in Deutschland 7250 Frauen, und 5354 Frauen starben an der Erkrankung. In Deutschland liegt derzeit das Lebenszeitrisko für Eierstockkrebs bei etwa einer auf 71 Frauen mit sinkender Tendenz. Obwohl Eierstockkrebs nur an achter Stelle der Neuerkrankungen steht, stellt er in der entwickelten Welt die fünfthäufigste Todesursache unter Krebserkrankungen bei Frauen dar. Unter den gynäkologischen Krebserkrankungen ist er der tödlichste (Siegel et al. 2015; Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2017). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate war 2014 in Deutschland mit 41% angegeben. Das mittlere Erkrankungsalter wird in Deutschland auf 70 Jahre datiert. Aufgrund der anfänglichen Symptomarmut der Patientinnen werden Ovarialtumore meist erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert. 2014 erhielten 60% der Patientinnen ihre Erstdiagnose in einem T3-Stadium. Dies verschlechtert die Prognose deutlich. Hinzu kommt, dass sich die Therapie oft schwierig gestaltet. Innerhalb von 18 Monaten erleiden die meisten Patientinnen, welche bei Erstdiagnose ein fortgeschrittenes Stadium aufwiesen, ein Rezidiv (Jayson et al. 2014). Eine sich oftmals entwickelnde Resistenz auf die Chemotherapie limitiert zusätzlich die Behandlungsmöglichkeiten.

1.1.1.Histopathologische Unterscheidung der Neoplasien des Eierstocks

Neoplasien des Eierstocks können von unterschiedlichsten Gewebearten ausgehen. Unabhängig jedoch von dem Ursprungsgewebe werden Neoplasien zunächst in unterschiedliche Dignitätsgrade eingeteilt. Mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen kann festgehalten werden, ob es sich um eine benigne, borderline oder maligne Neoplasie handelt. Benigne Neoplasien sind Gewebevermehrungen, welche lokal begrenzt wachsen und nicht die Basalmembran des jeweiligen Gewebes

1. Einleitung

überschreiten. Borderline Neoplasien sind Gewebewucherungen von niedrigem malignem Potential. Klinisch und morphologisch liegen sie zwischen eindeutig benignen und klar malignen Tumoren. Manche Zellen zeigen Zellatypien. Merkmale einer Zellatypie können Polymorphien der Zellen und Zellkerne sein, unterschiedliche Größe der Zellkerne (Anisonukleose), des Weiteren Kernhyperchromasien oder eine Vergrößerung der Nukleolen. Andere Merkmale sind eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns oder vermehrte Basophilie des Zytoplasmas. Normalerweise zeigen borderline Neoplasien keine Invasion in Nachbargewebe und überschreiten so die Basalmembran nicht. Bei borderline Tumoren des Ovars sind jedoch aufgrund der Anatomie des Ovars peritoneale Implantate möglich. Maligne Tumoren zeigen viele Zellatypien und dringen auch in benachbarte Strukturen ein. Somit können sie lokal destruierend und invasiv wachsen mit dem Potential zur Metastasenbildung (lymphogen und hämatogen). **Abbildung 1.1** zeigt die Dignitätsgrade von serösen Neoplasien des Ovars.



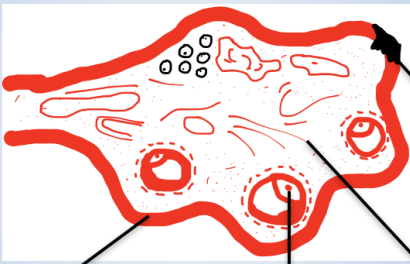
Dignitätsgrad	gutartig	borderline	maligne
Häufigkeit	60%	15%	25%
Histopathologischer Befund	Ohne Atypien	Mit Atypien, ohne Invasion	Mit Atypien und Invasion
Beispiele	- Seröses Zystadenom - Seröses Adenofibrom	- Seröser borderline Tumor	Seröses Adenokarzinom

Abbildung 1.1: Dignitätsgrade von serösen Neoplasien des Ovars. In Anlehnung an die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren (2017)

1. Einleitung

Neoplasien des Eierstocks werden durch die WHO (World Health Organisation) aufgrund ihres Ursprunggewebes histologisch unterschieden (Travis et al. 2004). **Abbildung 1.2** zeigt einen Überblick über die unterschiedlichen Gewebearten und die daraus entstehenden unterschiedlichen Tumorarten. Die größte Gruppe bilden Tumore, welche aus Epithelgewebe entstehen (64-70% aller Eierstocktumore). Zu ihnen zählen seröse, endometrioid, muzinöse, klarzellige und undifferenzierbare Tumore sowie Brennertumore.

Andere Tumore entstehen aus den Keimzellen (15-20% aller Eierstocktumore). Zu ihnen zählen das Teratom, das Dysgerminom der Dottersacktumor sowie das Chorionkarzinom. Auch können aus dem Keimstrangstroma Tumore entstehen (5-10% aller Eierstocktumoren). Hierzu zählen das Fibrom, der Granulosazelltumor, der Sertoli-Leydigzelltumor sowie der Steroidzelltumor. Die letzte Gruppe bilden die Metastasen (5% aller Eierstocktumore), welche jeglichem anderen Gewebe entspringen können. Am häufigsten handelt es sich bei Metastasen am Ovar um sogenannte Abtropfmetastasen aus dem Peritonealbereich (Magen, Pankreas, Leber) oder der Mamma.



Ursprung	Epithel	Keimzelle	Keimstrangstroma	Metastasen
Häufigkeit	64-70%	15-20%	5-10%	5%
Typen	<ul style="list-style-type: none"> - Seröse Tumoren - Muzinöse Tumoren - Endometrioid Tumoren - klarzellige Tumoren - Brenner Tumoren - unklassifizierbare Tumoren 	<ul style="list-style-type: none"> - Teratom - Dysgerminom - Dottersacktumor - Chorionkarzinom 	<ul style="list-style-type: none"> -Fibrom -Granulosazelltumor -Sertoli-Lydigzelltumor -Steroidzelltumor 	<ul style="list-style-type: none"> zB. -Magen-Ca -Colon-Ca -Mamma-Ca -Pancreas-Ca

Abbildung 1.2: Tumore des Ovars. In Anlehnung an die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren (2017)

1. Einleitung

Weiterhin wird jeder Tumor dahingehend histopathologisch untersucht, wie sehr er sich vom normalen Eierstockgewebe unterscheidet. Hierbei wird ein sogenanntes Grading nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer) vorgenommen. Dabei werden drei Grade der Entdifferenzierung unterschieden. Ein Grad-1 (low-grade) Tumorgewebe ist dem normalen Ursprungsgewebe ähnlich und gilt als weniger aggressiv. Grad-3 (high-grade) Tumorgewebe ist hingegen schlecht differenziert und wächst meist sehr aggressiv. Grad-2 Tumorgewebe liegt dazwischen. In den letzten Jahren wurde zunehmend klarer, dass gerade der Unterscheidung zwischen low-grade und high-grade serösen Ovarialkarzinomen eine wichtige Bedeutung zukommt (mehr siehe **Kapitel 1.1.3.**).

1.1.2. Klassifizierung der Ovarialtumore mittels FIGO und TNM

Um die Therapie, den Verlauf und die Prognose einer Patientin, welche an einem Ovarialkarzinom erkrankt ist, planen und einschätzen zu können, reicht nicht allein die histopathologische Unterscheidung und das Grading. Eine wichtige Rolle spielt auch der intraoperative Ausdehnungsbefund, sowie die mikroskopische Ausdehnung, welche durch den Pathologen festgestellt wird. Für eine einheitliche Dokumentation wird der intraoperative Befund mittels der FIGO-Klassifikation (International Federation of Gynecology and Obstetrics) beschrieben, die TNM-Klassifikation nach UICC wird von den Pathologen verwendet.

Neue Erkenntnisse in der Therapie, der Histomorphologie sowie der Genese fließen in die stetig überarbeiteten Klassifikationen ein. So werden nun Karzinome von Ovar, Tube und Peritoneum gemeinsam klassifiziert, da sie die gleiche Histomorphologie zeigen ((Prat & FIGO Committee on Gynecologic Oncology 2015) & (Gospodarowicz et al. 2004) **Tabelle 1.1** zeigt die aktuelle TNM bzw. FIGO-Klassifikation.

1. Einleitung

Tabelle 1.1: TNM- und FIGO-Klassifikation von Ovarialtumoren

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
T1a	IA	Auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt.
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
T1c1	IC1	Iatrogene Kapsel-(Serosa-)ruptur
T1c2	IC2	Präoperative Kapsel-(Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	Maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIA1i	Metastasen < 10 mm
N1b	IIA1ii	Metastasen > 10 mm
T3a jedes N	IIIA2	Mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens <2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastase
T3c jedes N	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen.
M1a	IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

1. Einleitung

1.1.3. Tumorgenese von serösen Ovarialkarzinomen

2004 veröffentlichten Shih und Kurman ein duales Tumorgenese Konzept von Ovarialtumoren. Sie unterscheiden Typ-1 Ovarialtumoren (ca. 25% aller Tumore) von Typ-2 Ovarialtumoren (ca. 75% aller Tumore) (Shih & Kurman 2004). Die Einteilung beruht auf der Feststellung, dass sich die Typen in der Tumorbilogie unterscheiden. So entstehen Typ-1 Tumore beispielsweise meist auf dem Boden von Vorläuferläsionen und wachsen selten über das Organ hinaus. Zu ihnen zählen low-grade seröse Karzinome, endometrioides Karzinome, seromuzinöse Karzinome, muzinöse Karzinome, klarzellige Karzinome sowie maligne Brennertumore. Die Typ II-Tumore hingegen sind für 90% der Mortalität bei Ovarialkarzinomen verantwortlich und sind somit sehr viel aggressiver. Zu ihnen zählen high-grade seröse Karzinome, alle gemischten Karzinome mit Ausnahme des seromuzinösen Typs und alle Karzinosarkome.

Dass es sich bei low-grade (Typ-1) und high-grade serösen Karzinomen (Typ-2) in der Tat um zwei verschiedene Tumorentitäten handelt und nicht etwa, wie zunächst angenommen, um ein morphologisches Spektrum, darauf weisen viele klinische und molekularpathologische Studien hin. Auch spiegelt sich dies in der aktuellen WHO-Klassifikation von 2014 wider, wo seröse Ovarialkarzinome nur noch in high-grade und low-grade seröse Karzinome eingeteilt werden (Travis et al. 2004).

So zeigen beispielsweise die meisten high-grade serösen Ovarialkarzinome eine Mutation im p53-Gen (Singer et al. 2005) und weisen eine erhöhte chromosomale Instabilität auf (Staebler & Diebold 2007). Low-grade seröse Ovarialkarzinome zeigen Mutationen im BRAF- und KRAS-Pathway (Singer et al. 2003). **Abbildung 1.3** veranschaulicht die Unterschiede zwischen low-grade und high-grade Tumoren.

1. Einleitung

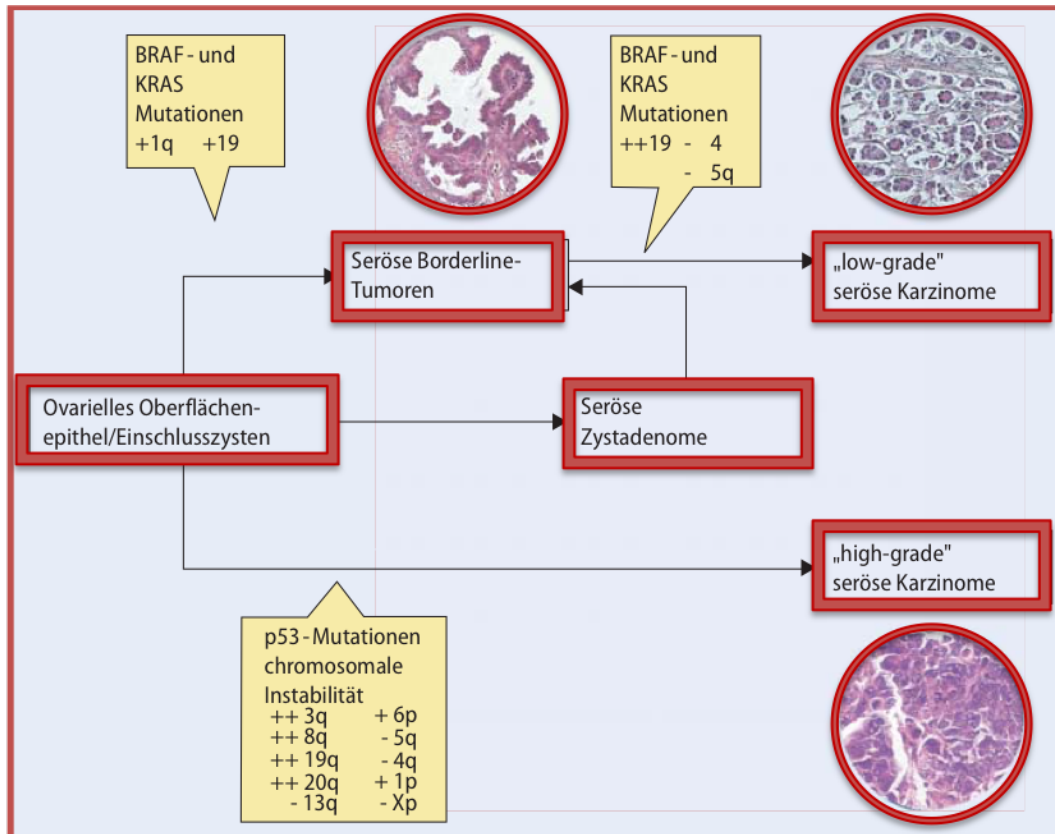


Abbildung 1.3: genetische Variation zwischen high- und low-grade Ovarialkarzinomen

modifiziert nach Staebler, A. und Diebold J., Pathologie 2007,28:180; high-grade seröse Karzinome zeigen oftmals eine p53-Mutation und eine erhöhte chromosomale Instabilität. Low-grade seröse Karzinome entstehen oftmals über seröse Borderline-Tumore, sie weisen oftmals BRAF- und KRAS Mutationen auf.

Die Entstehung von Ovarialkarzinomen ist nicht restlos geklärt. Lange Zeit war eine gängige Theorie, dass während der Ovulation Inklusionszysten des Mesothels entstehen, aufgrund derer sich dann die Tumorarten entwickeln (McCluggage 2008). Eine andere Theorie geht davon aus, dass sich Zylinderepithel in der Embryonalentwicklung bildet und infolge von Müller'scher Potenz eine unterschiedliche Differenzierung stattfindet (Feeley & Wells 2001).

Mit dem dualen Tumorgenese Konzept von Shih und Kurman wurde jedoch in den letzten Jahren postuliert, dass sich Typ-1-Tumore und Typ-2-Tumore nicht nur in ihrer Histologie, sondern auch in der Genese grundsätzlich unterscheiden.

Da sich diese Arbeit ausschließlich mit high-grade serösen Karzinomen beschäftigt, möchte ich auf diese Unterform der Ovarialkarzinome genauer eingehen:

Neue Erkenntnisse zur Tumorgenese high-grade seröser Karzinome ergaben sich, als man Frauen, welche eine Mutation im BRCA Gen aufweisen, und die somit ein erhöhtes Risiko für Mammakarzinome aber auch andere Tumore wie beispielsweise

1. Einleitung

Ovarialkarzinome haben, eingehend untersuchte. Bei BRCA+ Frauen, bei denen ein seröses pelvines Karzinom diagnostiziert wurde und welche zuvor prophylaktisch Salpingo-Oophorektomiert wurden, zeigte sich oftmals nach genauer histologischer Aufarbeitung im Salpingo-Oophorektomieresektat ein tubales intraepitheliales Karzinom (Kindelberger et al., 2007). In nachfolgenden Untersuchungen zeigten jedoch auch BRCA negative Frauen in vielen Fällen von serösen Pelvinen- bzw. Ovarialkarzinomen ein tubales intraepitheliales Karzinom. In Zusammenschau von weiterführender Forschung wird nun postuliert, dass alle high-grade serösen Karzinome (pelvin, tubal und ovariell) im Fimbrientrichter der Tube entstehen (Drapkin et al., 2007). Zunächst führt oxidativer Stress (eventuell durch Ovulation) im sekretorischen Epithel der Tube zu DNA-Schäden, Zellzyklusarrest und häufig zu p-53-Mutationen. Im nächsten Schritt wird durch einen unbekanntem Prozess der Zellzyklusarrest aufgehoben. Durch Exfoliation werden Tumorzellen früh pelvin verstreut, gelangen zum Ovar oder wachsen direkt invasiv in die Submucosa der Fimbrien ein. Dieses neue Tumorgenese Konzept von high-grade-serösen Ovarialkarzinomen spiegelt sich auch in den aktuellen FIGO und TNM Stadien wider, welche nun Ovarial-, Tuben- und Pelvinkarzinome gemeinsam klassifizieren (siehe **Kapitel 1.1.2.**).

1.1.4. Risikofaktoren von high-grade serösen Ovarialkarzinomen

Orale Kontrazeption (OC): bereits eine 1-bis 4-jährige Anwendung senkt das relative Risiko an Eierstockkrebs zu erkranken (Beral et al. 2008) . Insgesamt fand sich unter Frauen, welche jemals ein OC angewendet haben, eine Risikoreduktion von 40% (Wagner, Harter, Hilpert, Mahner, Reuß, du Bois, et al. 2013).

Menarche- und Menopausenalter: ein evidenzbasierter Zusammenhang zwischen Menarche- bzw. Menopausenalter und der Entstehung von Tumoren wurde bisher nicht festgestellt (Anon 2014).

Sterilisation: Eine Tubenligatur senkt nach Angaben von Cibula und Dusek das Risiko für ein Ovarialkarzinom um 34% (Cibula et al. 2011).

Hormontherapie in der Peri- und Postmenopause: die Datenlage ist nicht eindeutig geklärt; in der bisher größten prospektiven Studie zeigt sich ein erhöhtes Risiko für Ovarialkarzinom unter einer Hormontherapie wie auch Östrogen-Therapie (Mørch 2009).

Infertilität, Parität und Laktation: während Infertilität mit einem erhöhten

1. Einleitung

Ovarialkarzinomrisiko einhergeht (Cetin et al. 2008), verhält sich Parität und Laktation zum Risiko für Ovarialkarzinome invers (Cibula et al. 2011).

1.1.5. Diagnostik, Therapie und Verlauf von Ovarialtumoren

Spezifische Symptome für ein Ovarialkarzinom gibt es nicht. Dies ist unter anderem der Grund, warum Ovarialkarzinome oftmals erst in einem späten Stadium diagnostiziert werden. Jedoch sollten laut S3 Leitlinie weitergehende Untersuchungen eingeleitet werden, wenn insbesondere bei Frauen über 50 folgende Symptome kombiniert auftreten: Völlegefühl, Blähungen, unklare abdominelle Schmerzen oder Beschwerden, Zunahme der Miktionsfrequenz sowie Bauchumfangsvermehrung. Bei Verdacht auf ein tumoröses Geschehen im Bereich der Ovarien sollte zunächst eine gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung erfolgen, sowie eine Transvaginalsonographie. Eine Computertomographie (CT), eine Magnetresonanztomographie (MRT) und die Positronenemissionstomographie (PET) können bei besonderer Fragestellung hinzugezogen werden. Jedoch haben Studien gezeigt, dass bei fortgeschrittenen Befunden aufgrund des CT-Bildes nicht auf die Operabilität geschlossen werden kann. Aktuell wird auch ein Screening mittels Ultraschalldiagnostik oder CA-125 Tumormarkern nicht von der S3-Leitlinie empfohlen.

Bei dringendem Verdacht auf ein Ovarialkarzinom wird das operative Staging durch einen Gynäkoonkologen empfohlen. Hierbei sollte eine Laparotomie durchgeführt werden. Nach Inspektion und Palpation der gesamten Abdominalhöhle sollen eine Peritonealzytologie und Biopsien aus allen auffälligen und unauffälligen Regionen entnommen werden. Es folgt die Adnexektomie bds. sowie die Hysterektomie und mind. infrakolisch die Omentektomie. Im Anschluss wird bds. die pelvinen und paraaortale Lymphonodektomie durchgeführt.

Im Anschluss sollte eine adjuvante Chemotherapie mit 6 Zyklen platinhaltiger Chemotherapie erfolgen. Aktuell wird standardmäßig Carboplatin bei frühen Ovarialkarzinomen, bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen in Kombination mit Paclitaxel verabreicht.

Es gibt derzeit keine Evidenz, dass eine neoadjuvante Chemotherapie, eine Second-look-Operation, oder eine HIPEC-Therapie signifikante Vorteile für den Therapieerfolg

1. Einleitung

bringen.

Die Gabe von Bevacizumab oder Multikinase-Inhibitoren des VEGF wie Pazopanib oder Nintedanib zeigen in limitierten Subgruppen positive Effekte, bzgl. des progressionsfreien Überlebens, des Gesamtüberlebens und der Lebensqualität.

Eine tumoradaptierte Nachsorge sollte durchgeführt werden.

Aktuell liegt das 5-Jahresüberleben weltweit bei 20%, in Deutschland bei etwa 35%. Maßgeblich wegweisend für den Verlauf der Erkrankung ist der Residualtumor nach Operation. Dennoch werden extrem unterschiedliche Verläufe dokumentiert, was darauf schließen lässt, dass es noch weitere Prognosefaktoren gibt, welche Gegenstand aktueller Forschung sind.

1.2. Platinhaltige Chemotherapie

1845 synthetisierte Michel Pyrone zum ersten Mal Cisplatin (Alderden et al. 2006). Ein halbes Jahrhundert später gewann 1913 Alfred Werner den Nobelpreis für anorganische Chemie auf Grund seiner Arbeiten über die Bindungsverhältnisse der Atome im Molekül. Für seine Forschung verwendete er unter anderem Cisplatin (Mellor 1943). 1965 machte Rosenberg die bahnbrechend Entdeckung, dass Cisplatin ein Zytostatikum ist (Rosenberg et al. 1965). Seitdem war und ist platinhaltige Chemotherapie Gegenstand der medizinischen Forschung und ist als Therapie der Wahl bei Urothelkarzinomen, Lungenkarzinomen und Ovarialkarzinomen nicht mehr wegzudenken.

1.2.1. Wirkungsweise platinhaltiger Chemotherapie

Platinhaltige Chemotherapie gehört zur großen Gruppe der Alkylantien. In der Zytostatikatherapie werden Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin eingesetzt. Dabei sind sie im Nebenwirkungsspektrum neben den allgemeinen Nebenwirkungen besonders emetogen, nephrotoxisch, ototoxisch sowie neurotoxisch (Aktories et al. 2009). Platinhaltige Chemotherapie wird dem Patienten intravenös verabreicht. Gelangt das Zytostatikum zur Tumorzelle wird sie über passive Diffusion (Gately & Howell 1993), oder aber über Cu-Kanäle (Ishida et al. 2002) in die Zelle transportiert. Damit bsp. Cisplatin mit der DNA wechselwirken kann, muss das neutrale Molekül im Cytoplasma durch eine Reihe spontaner Aqualierungsreaktionen aktiviert werden.

1. Einleitung

Hierbei werden die cis-Chlor-Liganden nacheinander durch Wassermoleküle ersetzt (Kelland 2000).

Das aktivierte Cisplatin gelangt in den Nukleus wo es an Guanin-N7-Basen mittels den 2 Amingruppen bindet und somit Inter- und Intrastrang Quervernetzungen bildet (Eastman 1987). Diese Quervernetzungen lösen eine Reihe von Signalkaskaden aus, welche die Apoptose der Tumorzelle induzieren (Siddik 2003). **Abbildung 1.4** zeigt eine schematische Darstellung der Wirkung von Cisplatin in der Tumorzelle. **Abbildung 1.5** skizziert verschiedene Signalkaskaden, welche durch die Intra- und Interstrang Querverbindungen aktiviert werden.

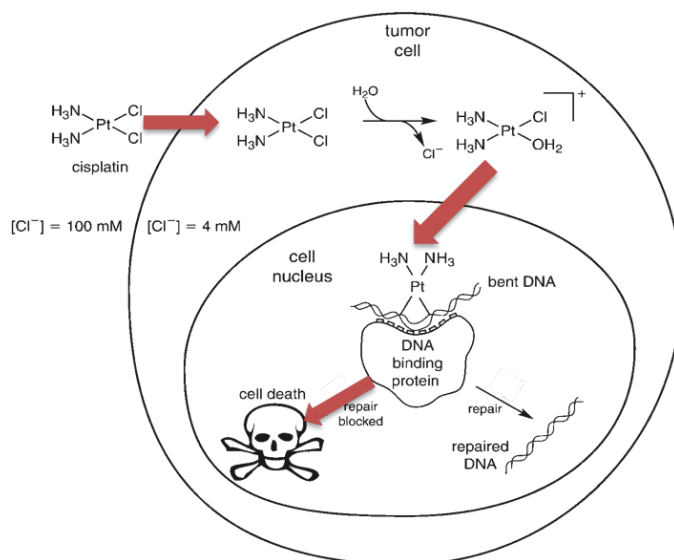


Abbildung 1.4: Wirkung von Cisplatin in Tumorzellen

modifiziert nach Rebecca A. Alderden, The University of Sydney, N.S.W. 2006, Australia; Cisplatin gelangt durch passive und aktiven Transport in die Tumorzelle, im Cytoplasma wird Cisplatin durch den Austausch der cis-Chlor-Liganden mit Wasser aktiviert. Im Nukleus bindet Cisplatin an die DNA und bildet Intra- und Interstrang Querverbindungen. Diese induzieren die Apoptose der Zelle.

1. Einleitung

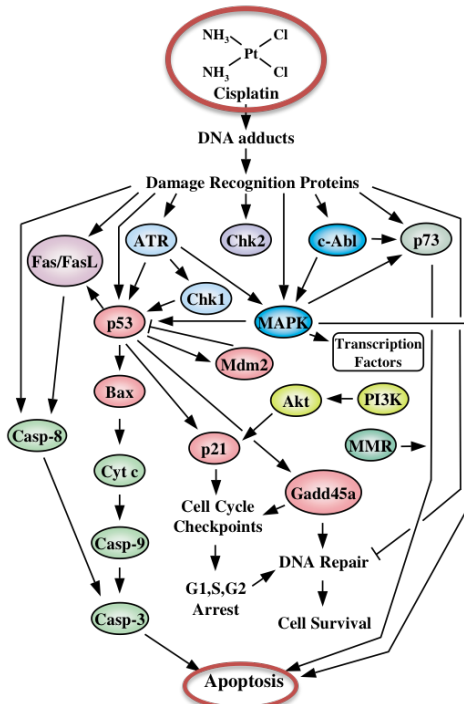


Abbildung 1.5: Signalkaskade ausgelöst durch Cisplatin,

modifiziert nach Siddik, 2003, Die Inter- und Intrastrangquerverbindungen lösen eine Reihe von Signalkaskaden aus, welche zur Apoptose der Zelle führen. Eine zentrale Rolle nimmt dabei p53 ein, welches durch ATR, MAPK und weitere Proteine aktiviert wird und über Fas/FasL sowie Bax die Apoptose induziert.

1.2.2. Resistenzentwicklung auf platinhaltige Chemotherapie bei Ovarialtumoren

Platinresistenz eines Patienten wird im Rahmen dieser Arbeit folgendermaßen definiert: Ein Rezidiv, welches innerhalb eines halben Jahres nach Beendigung der Chemotherapie auftritt (Wagner, Harter, Hilpert, Mahner, Reuß, Du Bois, et al. 2013). Die Beurteilung einer Therapieresponse wurde anhand der RECIST Leitlinien (Eisenhauer et al. 2009) vorgenommen. Diese stellt genaue Kriterien auf, mit welchen Methoden ein Tumorprogress festgestellt werden darf. Des Weiteren legt sie fest, wann von einer kompletten Response, einer partiellen Response, einem Progress oder einer ‚stable disease‘ gesprochen werden kann. Bei Nachkontrollen von Patientinnen mit soliden Tumoren nutzt die Universitäts-Frauenklinik die RECIST Leitlinien zur Diagnostik eines Rezidivs und ggf. weiterer Therapieentscheidungen. Jedoch sollte eine Behandlung erst erfolgen, wenn das Rezidiv klinisch symptomatisch wird. Eine frühzeitige Therapie, beispielsweise auf Basis eines Ca-125-Anstieges führt zu einer Verschlechterung der Lebensqualität, nicht jedoch zu einem Überlebensvorteil. In der Rezidivdiagnostik haben sich die CT, die PET bzw. PET/CT und die MRT etabliert (Wagner, Harter, Hilpert, Mahner, Reuß, du Bois, et al. 2013).

1. Einleitung

Dass es sich bei der Resistenz auf platinhaltige Chemotherapie um ein großes Problem handelt, publizierte Ozols schon im Jahre 1991. Er führte das damalige 5-Jahresüberleben von 15-20% bei Ovarialtumoren auf die hohe Rate der Resistenzbildung zurück (Ozols 1991). Die Feststellung, dass Cisplatin und Carboplatin kreuzresistent zueinander sind (Gore et al. 1989), lässt darauf schließen, dass den Resistenzen gleiche Signalkaskaden unterliegen (Siddik 2003). Auch wird angenommen, dass es eine intrinsische- und eine erworbene Resistenz, wie auch bei anderen Zytostatika, auf platinhaltige Chemotherapie gibt. Es wird postuliert, dass es sich bei der Resistenzentwicklung um ein multifaktorielles Geschehen handelt (Siddik 2003). Es scheint ein Zusammenspiel von verringertem Influx von Cisplatin, vermehrtem Efflux, vermehrter DNA-Reparatur, erhöhter Expression von GSH, epigenetischen Veränderungen und vielen weiteren Mechanismen in der Tumorzelle zu sein, welche die Resistenz auslösen (Cornelison et al. 2017). Shen et. al geben in einem 2012 erschienen Artikel zu bedenken, dass es noch nicht geklärt werden konnte, ob es sich wirklich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, oder der dominierende Auslöser noch nicht gefunden wurde (Shen et al. 2012).

Abbildung 1.6 zeigt eine Übersicht über die publizierten Vorgänge welche im Verdacht stehen, die Resistenzen auf platinhaltige Chemotherapie bei high-grade-serösen Ovarialkarzinomen auszulösen.

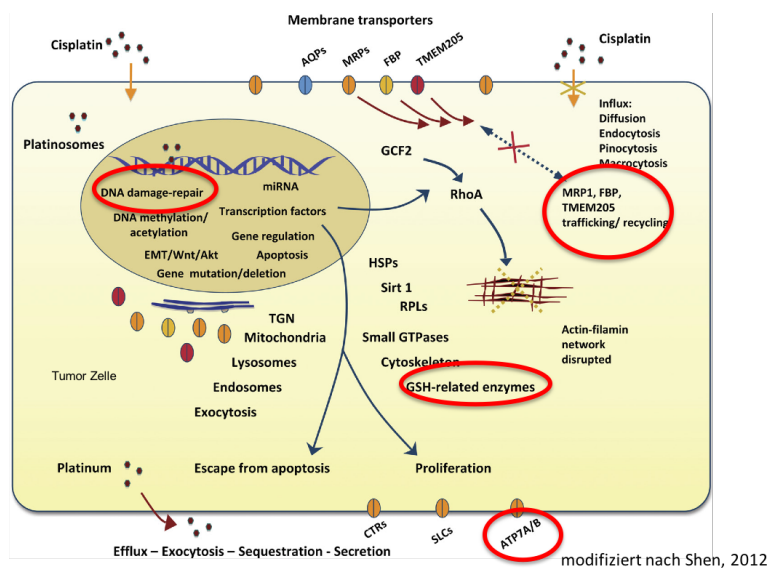


Abbildung 1.6: Resistenzentwicklung auf Cisplatin in Tumorzellen

modifiziert nach Shen, 2012; Die Resistenz auf Cisplatin in Tumorzellen ist ein multifaktorielles Geschehen. Verringerter Influx vermehrter Efflux, vermehrte DNA-Reparatur und viele andere Mechanismen wie bsp. Epigenetik spielen dabei eine Rolle.

1. Einleitung

Bei der gezielten Therapie zur Aufhebung einer Platinresistenz lag in den vergangenen Jahren ein Schwerpunkt auf Effluxtransportern wie ATP7A/B (Komatsu et al. 2000) sowie das Multidrug-Resistance- Protein 1 (*MDRP1*) aus der Familie der ABCB-Proteine. Bei der Blockade von diesem zeigte die Kombinationstherapie von Taxane und Cisplatin positive Effekte (Binkhathlan & Lavasanifar 2013). Auch Versuche small interfering RNA (siRNA) gegen RNA von *MDRP1* einzusetzen, zeigen vielversprechende Ergebnisse (Gvozdeva et al. 2014). Es wird auch diskutiert, *MDRP1* als prognostischen Marker zu etablieren (Sedláková et al. 2015).

Die biologischen Mechanismen der Chemoresistenz zu verstehen, ist von äußerster Wichtigkeit, um die Behandlung und die Therapie-Ergebnisse zu verbessern (Jazaeri 2005).

1.2.3. Rolle von *ATP11B/A* bei Resistenzentwicklung von Ovarialtumoren auf platinhaltige Chemotherapie

ATP11B sowie *ATP11A* gehören zur Klasse der P-Typ ATP-asen. Man nimmt an, dass diese Proteine beim Transport von Phospholipiden durch die Zellmembran eine Rolle spielen (Tang et al. 1996). 2013 veröffentlichten Moreno-Smith und Kollegen eine Forschungsarbeit im Journal of Clinical Investigation (JCI), in der sie die Rolle von *ATP11B* bei der Entstehung von Resistenz auf platinhaltige Chemotherapie bei Ovarialtumoren untersuchten. Sie publizierten, dass höhere Expression von *ATP11B* mit höheren Tumorstadien in Ovarialtumoren korreliert, sowie mit höheren Resistenzleveln auf Cisplatin in Ovarialtumorzelllinien. Durch *ATP11B* gene silencing konnte die Sensitivität auf platinhaltige Chemotherapie in Ovarialtumorzelllinien wieder signifikant erhöht werden, nicht jedoch die Sensitivität auf Topotecan und Paclitaxel. Das Expressionslevel von dem nahe verwandten und viel beforschten *ATP7B* wurde durch *ATP11B* gene silencing nicht beeinflusst und umgekehrt. Im Mausmodell reduzierte die kombinierte Therapie von siRNA gegen *ATP11B* und Cisplatin das Tumorwachstum von Cisplatin-sensitiven (73%) aber auch resistenten (83%) Mäusen. Das Tumorwachstum blieb bei alleiniger Therapie von Cisplatin bei resistenten Mauslinien unbeeinflusst.

Um den Wirkmechanismus von *ATP11B* besser zu verstehen, führten Moreno-Smith und Kollegen weitere Versuche mittels Immunfluoreszenz durch. In der Zusammenschau ihrer Ergebnisse postulieren sie, dass *ATP11B* zusammen mit den

1. Einleitung

SNARE-Proteinen *vesicular-associated-membrane Protein 4 (VAMP-4)* und *Syntaxin-6 (STX6)*) eine wichtige Funktion zukommt beim sekretorisch vesikulären Transport von Platin vom Golgi-Apparat zur Zellmembran. Somit scheint *ATP11B* eine wichtige Rolle beim Efflux von platinhaltiger Chemotherapie in platinresistenten Ovarialkarzinomen zu spielen. **Abbildung 1.7** veranschaulicht die von Moreno-Smith postulierten Wirkungsmechanismen von *ATP11B* in platinresistenten Tumorzellen.

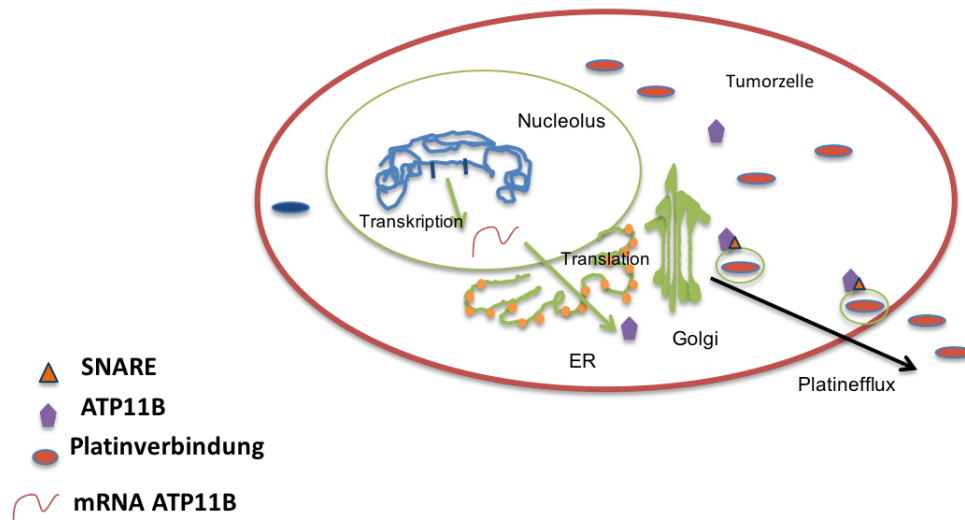


Abbildung 1.7: Wirkungsweise von *ATP11B* in Platinresistenten Tumorzellen

ATP11B wird transkribiert sowie translatiert und bindet zusammen mit verschiedenen SNARE-Proteinen am Golgi-Apparat an einen mit Platingefüllten Vesikel. Durch Exozytose wird Platin aus der Zelle befördert.

Auch *ATP11A* wurde in den letzten Jahren im Zusammenhang mit Vesikeltransport beforscht. So vermuten Mark und Kollegen, dass *ATP11A* eine Rolle in Makrophagen spielt bei der Bindung von Proteinen (z.B. Clathrin) an die Plasmamembran, was schlussendlich zur Vesikelbildung führt (van der Mark et al. 2017).

1.3. Epigenetik bei Ovarialtumoren und ihr Einfluss auf Resistenzentwicklung

Epigenetik beschreibt Mechanismen, welche zu einer Modifizierung der DNA führen, jedoch nicht auf einer Basen-Sequenzänderung beruhen. Diese Modifikationen treten auf verschiedenen Ebenen auf und sind potentiell reversibel, sie finden entwicklungsabhängig statt und können von der Umwelt beeinflusst sein (Jaenisch &

1. Einleitung

Bird 2003). Die Epigenetik ist im 21. Jahrhundert eine der zentralen Themen der Genetik. So können Bereiche der Stammzellforschung und Embryologie komplett neu gedacht werden (Spivakov & Fisher 2007). Erkrankungen, welche auf genetischem Imprinting beruhen, wie beispielsweise das Angelman-Syndrom, können erklärt werden (Lalande & Calciano 2007), und auch in der Krebsforschung spielt die Epigenetik eine immer größere Rolle (Taberlay & Jones 2011). Zu epigenetischen Veränderungen zählen die Veränderung des Chromatins (Histon-Modifikation), sowie RNAi-vermittelte Mechanismen. Die am meisten beforschte und wohl auch häufigste epigenetische Veränderung ist jedoch die Methylierung von Cytosinen. Die Methylierung findet meistens an sogenannten CpG-Inseln statt, das bedeutet an einem Cytosin, auf welches ein Guanin folgt (Taberlay & Jones 2011).

Auch bei Ovarialtumoren gibt es zahlreiche Forschungen, welche epigenetische Veränderungen in den Fokus rücken. Die Einteilung in Typ-1- sowie Typ-2-Tumore erweist sich auch unter dem Aspekt der Epigenetik als sinnvoll, denn man hat festgestellt, dass sich die Methylierungsmuster zwischen high-grade serösen Ovarialkarzinomen (HGSOC) zu anderen sehr unterscheiden. HGSOC zeigen eher Hypomethylierung, endometroide sowie klarzellige Ovarialkarzinome eher Hypermethylierung (Seeber & Van Diest 2012).

Zahlreiche Forschungsgruppen konnten zeigen, dass Hypermethylierung oftmals mit gene silencing korreliert. So wurde eine Vielzahl von Genen publiziert, welche im Verdacht stehen, aufgrund von Methylierung geringer exprimiert zu werden und somit zur Tumorgenese beizutragen. Auch spielt DNA-Hypermethylierung eine große Rolle bei der Entstehung von Chemoresistenz, indem Gene inaktiviert werden, welche für die Zytotoxizität verantwortlich sind (Chang et al. 2010). *RASSF1A*, *LOT1* und *hMLH1* um nur einige wenige betroffene Gene zu nennen (Balch et al. 2004). Hypomethylierung im Gegensatz zu Hypermethylierung bewirkt eine vermehrte Expression von Genen. Dabei handelt es sich oftmals um Protoonkogene. Bei der Chemoresistenzentwicklung werden Gene demethyliert und somit vermehrt exprimiert, welche beispielsweise für den Efflux von Platin eine Rolle spielen. Eine vermehrte Demethylierung im *MDR-1*-Gen sowie *FANCF* zeigen z.B. eine signifikante Zunahme von Chemoresistenz (Baker & El-Osta 2003). Liao und Kollegen publizierten 2014, dass Hypomethylation in bestimmten Genen mit schlechter Prognose von Ovarialkarzinompatientinnen einhergehen (Liao et al. 2014).

1. Einleitung

Mittels des hochdichten Methylierungsarray von der Firma Illumina mit 450.000 CpG-Sites identifizierten Flanagan und Kollegen 9 Methylierungsstellen aus Blut von Patientinnen, welche zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs signifikant zwischen Patienten mit kurzem und langem Überleben diskriminierten (Flanagan et al. 2017).

Erste Ansätze die Chemosensitivität auf Platin mittels DNA-Methylierungs-Inhibitoren wieder herzustellen zeigen erste Erfolge. So demonstrierten Plumb et al., dass durch Demethylierung in der Promotorregion des *hMLH*-Gens, mittels 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) Behandlung, die Chemoresistenz von resistenten Ovarialzelllinien sowie von chemoresistenten Mäusen signifikant erniedrigt und die *hMLH*-Expression wieder erhöht wurde (Plumb et al. 2000).

1. Einleitung

1.4. Projektbeschreibung

Wie in **Kapitel 1.2.2** und **1.3** beschrieben, sind die genauen Mechanismen der Resistenzentwicklung bei Ovarialtumoren nicht restlos geklärt. Ziel dieser Arbeit war es diese Mechanismen weiter zu beforschen. In Zusammenarbeit der Universitätsfrauenklinik Tübingen (Herr Prof. Dr. Wallwiener und Frau Prof. Dr. Sarah Brucker) sowie dem Institut für Pathologie (Frau Prof. Dr. Stäbler) wurden durch unsere Arbeitsgruppe zahlreiche Patientenproben molekulargenetisch untersucht. Insbesondere wurden mit jeweils 12 Cisplatin-resistenten und sensitiven Patientenproben intensive Analysen durchgeführt. U.a. wurden gesamtgenomische Expressionsanalysen auf Basis von Microarrays und RNAseq erhoben. Auch wurden miRNA- und genomische Methylierungs-Profile erstellt, sowie hochdichte Copy-Number Analysen. Es wurden viele Gene detektiert, welche bereits in der Literatur als diskriminierende Gene zwischen resistenten und sensitiven beschrieben wurden. Der Datensatz konnte Ende 2012 mittels des dichtesten humanen Methylierungsarray mit mehr als 450.000 CpG-Inseln (450k-Array) erweitert werden. Hierbei fand sich eine neue Methylierungsposition (*cg21570597*-Site) die zu 100% zwischen resistenten und sensitiven Ovarialkarzinom-Proben diskriminiert. Bei genauerer Analyse der Methylierungsposition zeigte sich, dass sie in einem Intron Bereich des *ATP11A*-Gens liegt. Wie in **Kapitel 1.2.3.** beschrieben wird in der aktuellen Forschung angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von 4-Typ-ATP-asen (insbesondere *ATP11B*) und der Resistenzentwicklung von Ovarialtumoren besteht. **Abbildung 1.8** zeigt die Ergebnisse des 450k-Array für die oben beschriebene Methylierungsposition. Hierbei ist zu sehen, dass hohe Methylierungslevel bei sensitiven und niedrige bei resistenten Patientenproben auftreten. Wie in **Kapitel 1.3.** beschrieben zeigen high-grade-seröse Tumore oftmals bei Resistenzentwicklung Hypomethylierung. Hypomethylierung steht im Zusammenhang mit vermehrter Expression der Gene.

Betrachtet man *ATP11A* als ein potentiell efflux-Protein für Platin, lassen diese Ergebnisse die Hypothese zu, dass Hypomethylierung im *ATP11A*-Gen eine vermehrte Expression von eben diesem Protein bewirkt und dies eine Rolle bei der Resistenzentwicklung von Ovarialkarzinomen auf platinhaltige Chemotherapie spielt.

1. Einleitung

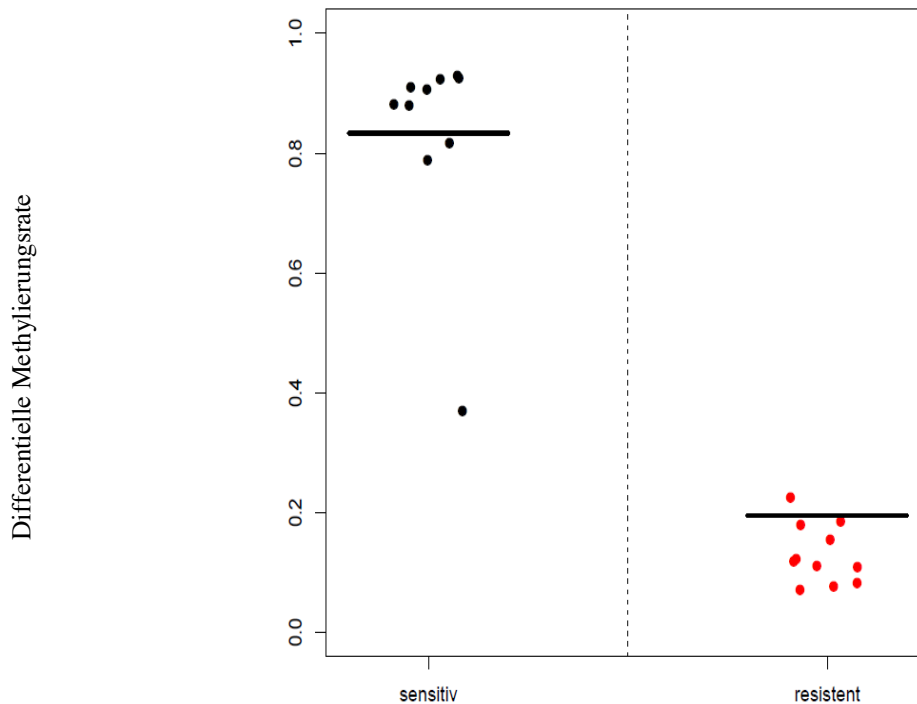


Abbildung 1.8: Methylierungslevel an der cg21570597-Site im Intron des ATP11A-Gens auf Platin resistente und sensitive Ovarialkarzinome.

Der 450k-Array findet eine 100% Diskriminierung zwischen Platin sensitiven und resistenten Ovarialkarzinomen. Sensitive Proben weisen hohe Methylierungslevel auf resistente Proben niedrige Methylierungslevel.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die bisherigen Ergebnisse mittels eines erweiterten Probensatzes und weiterer Methoden zu validieren und funktionell zu untersuchen. Zunächst wurde die Kohortengruppe um weitere high-grade seröse Ovarialkarzinomproben auf insgesamt 48 Proben erweitert. Anhand von Kryogewebe wurden zunächst Schnitte angefertigt, welche histopathologisch durch Frau Prof. Dr. Stähler auf Tumorgehalt untersucht wurden. Aus den jeweiligen Schnitten wurde daraufhin DNA und RNA isoliert und mit geeigneten Verfahren auf Quantität und Qualität untersucht. Die DNA-Proben wurden anschließend bisulphit-behandelt und die relevante Sequenz später mittels eines PyroMARK Q24 Sequenzierungsgeräts charakterisiert. Dies stellt eine alternative Methylierungsanalyse zum 450k-Array dar.

Zusätzlich wurden von allen Proben und auch von zahlreichen Cisplatin-resistenten Zelllinien (deren RNA uns von Herrn Prof. Aulitzky aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart zur Verfügung gestellt wurden) Expressionsanalysen von *ATP11A* und *ATP11B* durchgeführt. Hierfür wurde aus der RNA cDNA hergestellt und diese mittels qRT-PCR auf einer Lightcycler 480 II Maschine untersucht. Die Gene

1. Einleitung

wurden mit 3 Houskeeping Genen normalisiert und dann statistisch zwischen resistenten und sensitiven Proben verglichen.

Abbildung 1.9 zeigt die einzelnen Arbeitsschritte im Flussdiagramm.

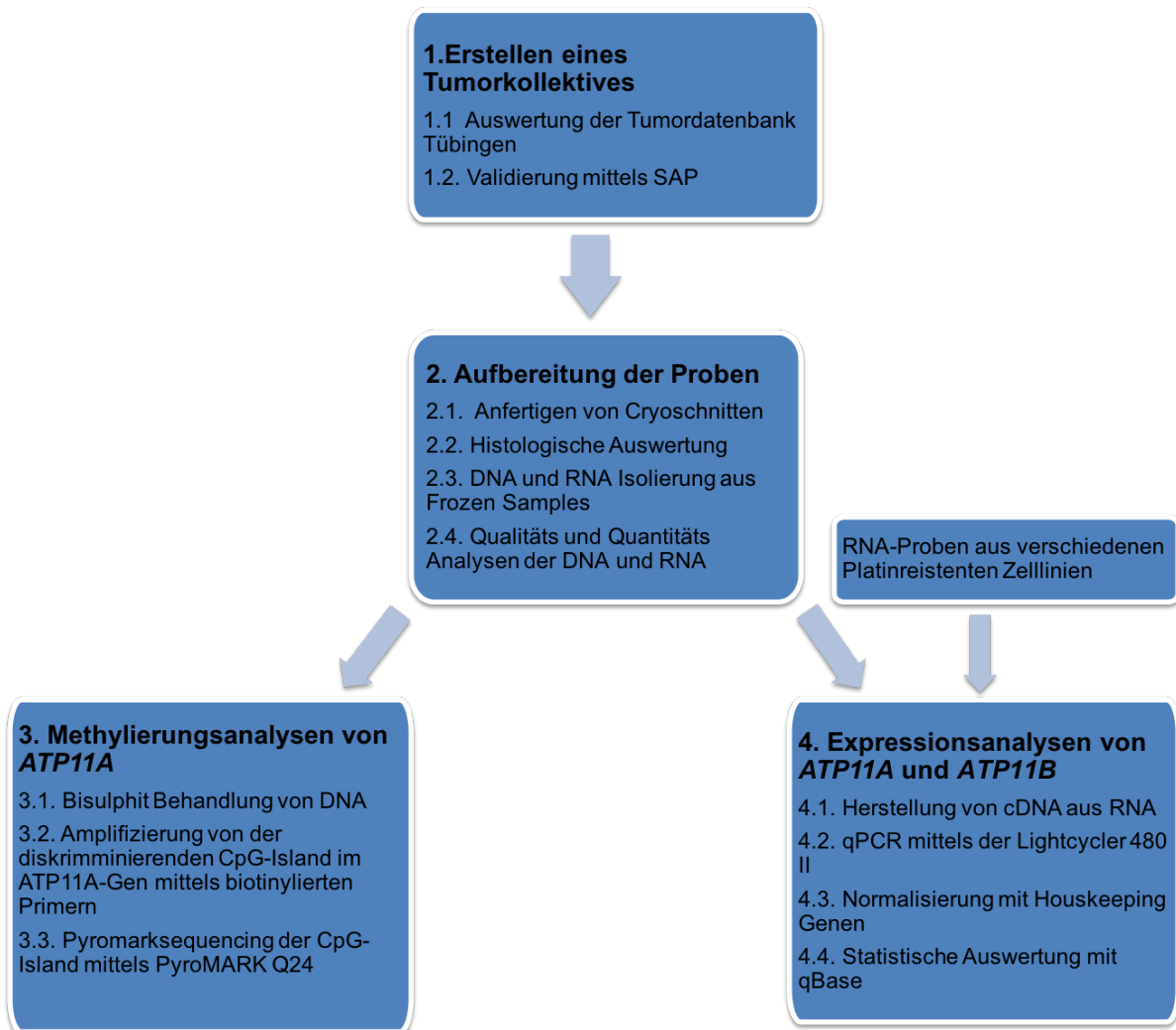


Abbildung 1.9: Flussdiagramm Arbeitsschritte

2. Material und Methoden

2.1. Tumorgewebe

Die für die Studie verwendeten Ovarialkarzinomproben stammen aus der Biobank des südwestdeutschen Tumorzentrums- CCC Tübingen-Stuttgart. Ein Ethikvotum zur Studie wurde durch die Forschungsethikkommission Tübingen erteilt. Die verwendeten Proben werden in der Universitäts Frauenklinik bei etwa -150°C in der Flüssigstickstoff-Gasphase gelagert. Die korrekte Konservierung wird durch das Pathologische Institut Tübingen gewährleistet, welche dabei die aktuellen Standards zur Qualitätssicherung der Proben einhält.

2.1.1. Zusammenstellung der Kohortengruppen

Wie in **Kapitel 1.4.** beschrieben, soll Ziel dieser Arbeit sein, die Ergebnisse einer Voruntersuchung zu validieren. Zu diesem Zweck werden die Tumorproben Kohorten erweitert. Um eine gute Qualität der Tumorproben zu garantieren, werden die in der Biobank gelisteten Ovarialkarzinome im Patientenverzeichnis des Uniklinikums abgeglichen und auf Entität und Krankheitsverlauf der Patientinnen überprüft. Es wurden alle Patientinnen mit Ovarialkarzinom von 2005 bis Mitte 2013 erfasst und abgeglichen.

Bei den 2000 Ovarialkarzinomproben welche in der Tumorbank zur Verfügung standen, handelte es sich bei ca. 1000 um high-grade seröse Tumore. Von diesen 1000 mussten ca. 800 aus der Studie ausgeschlossen werden, da keine Therapie nach den gesetzten Kriterien (siehe **Kapitel 2.1.2.**) durchgeführt werden konnte, die Nachuntersuchungen der Patientinnen nicht am Haus stattfanden oder das genaue Vorgehen nicht aus der Dokumentation ersichtlich wurde. Aus den ca. 200 möglichen Proben können 14 platinresistente Tumorproben mittels der unten beschriebenen Kriterien rekrutiert werden.

Bei der Betrachtung der platinsensitiven Proben werden nun nur Patientinnen als sensitiv gewertet, welche frühestens 17 Monate nach Beendigung der Chemotherapie ein Rezidiv bekamen. Dieser zeitliche Abstand ist ein optimaler Kompromiss um bei größtmöglichem zeitlichen Abstand (zwischen platinresistenten und –sensitiven) eine gleiche Kohortengröße einzuhalten. Die Kohorte der Chemotherapie sensitiven

2. Material und Methoden

Patienten umfasst schlussendlich 15 Patientinnen.

Von allen neu rekrutierten Patientinnen werden zusätzlich weitere Angaben erfasst (Alter, FIGO-Stadium, Lymphknotenstatus, ggf. Metastasen, Grading, Resektionsgrad). Die erhobenen Daten werden nach Richtlinien der Ethik-Kommission der Universitätsklinik Tübingen anonymisiert.

Von den ursprünglich in der Voruntersuchung verwendeten 24 Tumorproben sind noch von 17 Tumoren verwertbares Tumormaterial vorhanden. Mit diesen 17 Tumorproben, welche bereits für die Arrayanalysen validiert wurden (siehe **Kapitel 1.4.**), stehen nun für die Studie 46 Tumore zur Verfügung: 22 platinresistente und 24 platinsensitive Tumore.

2.1.2. Kriterien für die Erweiterung der Kohorten Gruppen

Das erste Kriterium für die Auswahl der Tumore ist der Behandlungsverlauf. Zuerst muss bei den Patientinnen eine zytoreduktive Operation stattgefunden haben, woraufhin eine Standard-Chemotherapie durchgeführt worden sein muss. Wie in **Kapitel 1.1.5.** beschrieben wird in Deutschland standardmäßig bei Ovarialkarzinomen eine dreiwöchentliche Chemotherapie mit Carboplatin, AUC 5 und Paclitaxel mit 6 Zyklen durchgeführt. Das Datum der Operation wird dem Operationsbericht entnommen, die Chemotherapiegabe anhand des Therapieschemas, den Arztbriefen sowie Zwischenberichten nachvollzogen. Aufgrund der hohen Nebenwirkungsrate muss eine Chemotherapie oftmals abgesetzt oder die Dosen verringert werden. Für die Studie werden nur Patientinnen ausgewählt, welche das Standardtherapieschema erhielten. Dosisreduktionen in einzelnen Zyklen der Chemotherapie werden für die Studie toleriert. Patientinnen, bei denen die Chemotherapie aufgrund der Nebenwirkungen abgesetzt oder eine komplette Therapieumstellung vorgenommen wurde, werden nicht in die Studie aufgenommen.

Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Tumore ist die Entität der Tumore. Es muss sich bei der Tumorentität um high-grade-seröse Ovarialkarzinome handeln. Die genaue Entität des Ovarialkarzinoms kann der Gewebefebefundung durch die Pathologie entnommen werden. Auch bei den von uns verwendeten Tumorproben, welche für die Voruntersuchungen verwendet wurden, handelt es sich ausschließlich um high-grade-seröse Tumore.

Des Weiteren müssen die Tumorproben in platinsensitiv und –resistent eingeteilt

2. Material und Methoden

werden. Hierfür werden die Chemotherapiegabe und die weiteren Nachkontrollen der Patientinnen ausgewertet. Um den Zeitpunkt der Beendigung der Chemotherapie zu bestimmen, werden Arztbriefe und Therapiepläne der Patientinnen ausgewertet. Um den Zeitpunkt des Rezidivs bestimmen zu können, werden im Patientenverzeichnis die jeweiligen Arztbriefe und Follow-up Untersuchungen validiert. Zur Definition eines Rezidivs werden wie in der RECIST Leitlinie vorgeschlagen (siehe **Kapitel 1.2.2**) harte Kriterien (Tumorprogress im CT oder MRT) und weiche Kriterien (erneute Aszitisbildung im Ultraschall nachgewiesen) berücksichtigt. Oft gehen weiche Kriterien harten voraus. Ein Rezidiv wird auf den Zeitpunkt datiert, an dem zum ersten Mal eindeutige harte oder weiche Kriterien in Arztbriefen oder Untersuchungsergebnissen festgehalten wurden. Folgen weichen Kriterien jedoch keine harten, werden die Patienten nicht in die Studie mit einbezogen.

Um eine bessere Trennschärfe zwischen platinresistenten und -sensitiven Tumoren zu generieren, soll der zeitliche Abstand zwischen platinresistenten und sensitiven Tumoren so groß wie möglich gewählt werden. Dabei sollen die Kohortengrößen in etwa gleich sein.

Durch die klaren Kriterien für die Tumorproben sowie die sorgfältige Auswahl können mögliche Störvariablen in der Auswertung vermieden werden. Dies ist eine wichtige Grundlage zur eindeutigen Interpretation der Ergebnisse.

2.2. Zelllinien

Für die Analyse der Expressionslevel von *ATP11A* sowie *ATP11B* werden nicht nur Tumorproben verwendet, sondern auch Zelllinien. Diese Zelllinien weisen alle ein unterschiedliches Resistenzlevel gegen Cisplatin auf. Somit soll verglichen werden, ob sich die unterschiedliche Ausprägung der Resistenz diesen Zelllinien auf die Expressionslevel auswirkt.

Die mRNA für die Analyse der Zelllinien werden uns für die qRT-PCR von Dr. Heiko van der Kuip aus dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart zur Verfügung gestellt. Ein Überblick über die Resistenzlevel der Zelllinien gibt **Abbildung 2.1.**

2. Material und Methoden

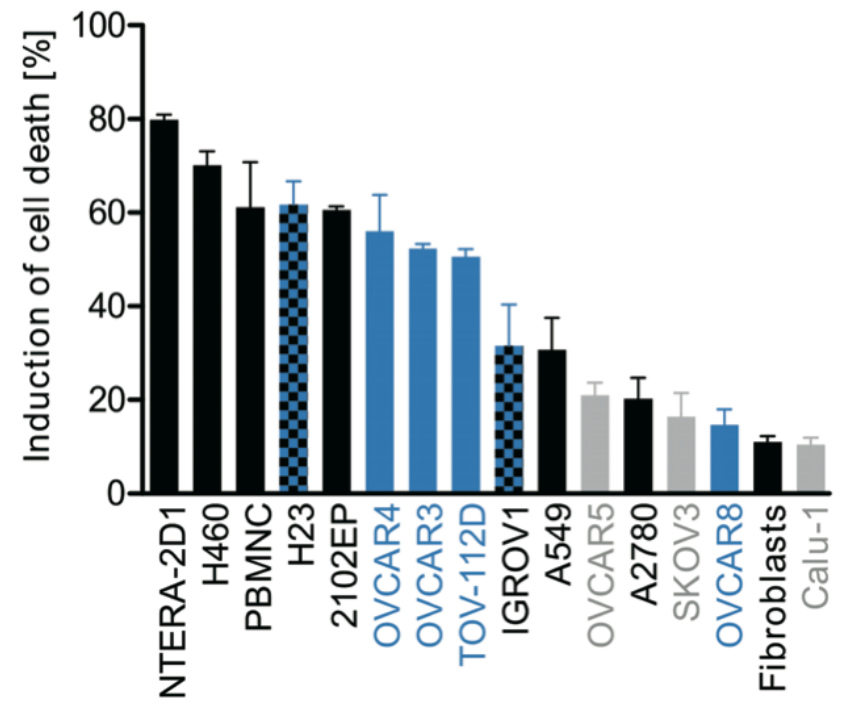


Abbildung 2.1: Unterschiedliche Resistenzlevel auf Cisplatin bei 16 Zelllinien.

Auf der x-Achse sind die Namen der Zelllinien aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Induktion des Zelltods dieser Zellen unter Cisplatin. Je mehr induzierter Zelltod stattfindet, desto sensibler sind die Zellen auf Cisplatin.

Für unsere Analyse standen nicht alle in **Abbildung 2.1.** aufgezeichneten Zelllinien zur Verfügung. Die von uns verwendeten Zelllinien sind in **Tabelle 3.9.** aufgeführt.

2.3. Generierung von DNA & cDNA von Tumorproben

Für Methylierungsanalysen sowie für qRT-PCR wird DNA bzw. RNA der Tumorproben benötigt. Hierfür werden Kryoschnitte der bei -150°C gefrorenen Proben angefertigt. Bei Referenzschnitten erfolgt eine Färbung mit Hämatoxyllin & Eosin. Unter dem Lichtmikroskop werden die Schnitte auf ausreichenden Tumorgehalt sowie deren Entität überprüft (s.u.). Die restlichen Kryoschnitte werden zur weiteren Verwertung genutzt. Aus ihnen wird RNA und DNA isoliert. Ausführliche Quantitäts- sowie Qualitätskontrollen folgen für DNA sowie RNA. Schlussendlich wird aus der RNA cDNA synthetisiert.

2.3.1. Anfertigung von Kryoschnitten

Zunächst werden die schockgefrorenen Tumorproben aus ihren Kryoröhrchen befreit und mittels des flüssigen Tissue Tec O.C.T.[®] compound Medium (optimal cutting

2. Material und Methoden

temperature) der Firma Sakura® Finetek eingebettet. Ein aus Alufolie gefalteter Behälter dient als Gussform. Die befüllte Gussform wird in der Gasphase von Flüssigstickstoff ausgehärtet und dann zur Akklimatisierung in die Kammer des Kryotoms CM3050 S der Firma Leica gelegt. Die Kryoschnitte werden nach Herstellerangaben hergestellt (Bedienungsanleitung Leica CM3050 S, 11/2006). Während die Tumorproben akklimatisiert werden, werden Objektträger sowie Eppendorf-Reaktionsgefäß beschriftet und auf Trockeneis gelegt. Nach erfolgter Akklimatisierung werden die Tumorblöcke in das Kryotom eingespannt. Das Tissue Tec O.C.T.[®] compound Medium wird seitlich von allen Seiten der Tumorprobe abtrepaniert. Dies erhöht die Qualität der isolierten DNA und RNA. Zunächst wird ein Referenzschnitt von 10µm Dicke angefertigt. Dieser wird auf einen gekühlten Objektträger aufgebracht und anschließend mittels H&E angefärbt (siehe **Kapitel 2.3.2**). Nach Begutachtung des Schnitts durch eine/n Pathologin/en (Institut für Pathologie Tübingen) auf ausreichend Tumorgehalt (mind. 60%) und korrekte Tumorentität (high-grade-serös Adenokarzinom) werden weitere 20 Schnitte mit je 10µm Dicke angefertigt. Diese Schnitte werden zusammen in ein gekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß gebracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren. Daraufhin wird ein weiterer Referenzschnitt der Tumorprobe angefertigt, auf einen Objektträger gebracht, angefärbt und durch die/den Pathologin/en begutachtet. Dadurch wird untersucht, ob der Tumoranteil im verwendeten Gewebe konstant bleibt. Nur Proben mit stabilem Tumoranteil werden verwendet. Ansonsten wiederholt sich der Vorgang.

2.3.2. Hämatoxillin & Eosin Färbung der Referenzschnitte

Die Färbung wird nach dem Protokoll der Schnellschnittdiagnostik des Instituts für Pathologie Tübingen durchgeführt. Zunächst werden die Objektträger bei Raumtemperatur akklimatisiert. Daraufhin erfolgt die Färbung wie in **Tabelle 2.1.** dargestellt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.1: Durchführung der Hämatoxillin & Eosin Färbung

Durchführung	Hämatoxillin & Eosin Färbung
Fixierung und Rehydratisation	Objektträger werden für 15sec. in 95% Ethanol getaucht, dann für 15sec. in 70% Ethanol und daraufhin für 15sec in Aqua dest.
Färben	Objektträger wird in 100% Hämalaunlösung sauer nach Mayer für 30 sec. getaucht
Bläuen	Objektträger wird für 2min. in Bottich, gefüllt mit lauwarmen Leitungswasser, gut schwenkt (Nuclei werden dabei blau gefärbt) dann für 15sec. in Aqua dest., anschließend für 15sec in 70% Ethanol
Färben	Objektträger wird in 50% Eosin Y und 1Tropfen Eisessig ca .10x getaucht (Zytoplasma, Kollagenfasern werden rosa gefärbt), dann für 15 sec in Aqua dest. spülen
Entwässern über aufsteigende Alkoholreihe	Objektträger wird je 2x in 70%-80%-100% Alkohol für je 15.sec. getaucht, dann für 2min in 100%Xylol
Eindecken mit Pertex	Objektträger wird luftgetrocknet und anschließend mit Pertex und Deckgläschen versehen

Alle Schnitte werden anschließend mit dem Digitalmikroskop Axioplan 2 imaging der Carl Zeiss Microscopy GmbH aus Göttingen abfotografiert und digital gespeichert.

2.3.3. DNA/RNA Isolation

Aus den generierten Kryoschnitten werden mittels des AllPrep DNA/RNA MicroKits der Firma Qiagen DNA und RNA isoliert. Alle benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien werden in dem Kit zur Verfügung gestellt. Zur Lyse und Homogenisierung der Zellen werden die gefrorenen Schnitte zunächst mit 350µl RLT Plus-Puffer versetzt, dann über eine QIAshredder-Säule der Firma Qiagen gegeben und für 5min bei Höchstgeschwindigkeit mit einer Zentrifuge (Centrifuge 5415 D) der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH zentrifugiert. Die nachfolgende Isolation wird entsprechend des AllPrep DNA/RNA Micro Handbooks durchgeführt und nur punktuell modifiziert **Tabelle 2.2.** zeigt die genaue Durchführung der Isolation.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.2: Durchführung der RNA/DNA Isolation

Durchführung	RNA/DNA Isolation
Binden der genomischen DNA an AllPrep Spin-Säule	Das Lysat wird vorsichtig auf die AllPrep Spin-Säule gegeben, welche in einem 2ml Sammelröhrchen platziert ist. Es wird für 30sec. bei > 8000 x g zentrifugiert. Falls Flüssigkeit nach der Zentrifugation zurückbleibt, wird erneut zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues 2 ml Sammelröhrchen gegeben und daraufhin bei 4°C gekühlt.
RNA Vorbereitung für Spin-Säule	Das Lysat wird mit 350µl 70% Ethanol versetzt und durch auf- und abpipettieren gemischt, bis keine Schlieren mehr vorhanden sind.
Binden der RNA an RNeasy MinElut Spin-Säule	Die Probe wird auf eine RNeasy MinElute Spin-Säule geladen, welche in einem 2ml Sammelröhrchen platziert ist. Es wird für 1min bei > 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.
DNase-Verdau	Auf die RNeasy MinElute Spin-Säule wird 350µl RW1 Puffer gegeben und 30 sec. bei > 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Es wird DNase I Inkubations Mix (aus 10µl DNase I Stammlösung und 70µl RDD-Puffer- NICHT vortexen) auf die Säule gegeben und 15min. inkubiert. Dann wird 350µl RW1-Puffer zugegeben und für 30sec. bei > 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.
Waschschritt RNA	Auf die RNeasy MinElute Spin-Säule wird 500µl RPE-Puffer zugegeben und für 30sec. bei > 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Daraufhin wird 500µl 80%Ethanol auf die Säule gegeben und für 2min bei > 8000 x g zentrifugiert. Die RNeasy MinElute Spin-Säule wird in ein frisches 2ml Sammelröhrchen platziert und bei offenem Deckel wird erneut für 5min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert.
RNA Eluation	Die RNeasy MinElute Spin-Säule wird in ein neues 1,5ml Sammelröhrchen platziert und es werden 14µl RNase freies Wasser direkt auf das Zentrum der Säulenmembran gegeben. Für 1min. wird bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert und die RNA eluiert.
Waschschritt DNA	Die AllPrep Spin-Säule wird mit 500µl AW1-Puffer bestückt und für 30 sec. bei > 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Dann wird auf die Säule 500µl AW2-Puffer pipettiert und für 5min. bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert.
DNA Eluation	Die AllPrep Spin-Säule wird in ein neues 1,5ml Sammelröhrchen platziert und es werden 50µl EB-Puffer(auf 70°C erhitzt) direkt auf das Zentrum der Säulenmembran gegeben. Es wird für 2min. inkubiert, dann für für 1min. bei > 8000 x g zentrifugiert und somit die DNA eluiert. Dieser Schritt wird wiederholt.

2.3.4. DNA/RNA-Quantifizierung

Mittels des NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer der Firma Thermo Scientific wird die Quantität und Reinheit der RNA und DNA Proben gemessen. Dabei wird 1µl der Probe auf das Ende eines Glasfaserkabels (Empfangskabel) gegeben. Ein kleiner Hebel, welcher ein zweites Glasfaserkabel enthält wird so justiert, dass die Probe die Lücke zwischen den Glasfaserkabeln schließt. Die Glasfaserkabel fungieren als Lichtwellenleiter. Die Lichtquelle ist eine gepulste Xenon-Blitzlampe. Das Licht wird nach Passieren der Proben mittels eines CCD-Spektrometers analysiert. Zur Konzentrationsberechnung wird die Absorption des Lichts bei einer Wellenlänge von

2. Material und Methoden

260nm (A_{260}) gemessen. Ein Absorptionswert von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht 50µg/ml an doppelsträngiger DNA und 40µg/ml an RNA. Für die Messungen ist keine Verdünnung der Proben notwendig. Vor einer Messung muss auf die jeweilige Eluationsflüssigkeit (DNA: EB-Puffer; RNA: RNase freies Wasser) geeicht werden. Hierfür wird der Leerwert des EB-Puffers, beziehungsweise des RNase freien Wassers gemessen. Die Reinheit kann anhand der A_{260}/A_{280} Ratio und der A_{260}/A_{230} angezeigt werden. Ein optimaler A_{260}/A_{280} Quotient liegt für DNA bei 1,8. Ein höherer Quotient kann auf RNA-Bestandteile hindeuten, ein Quotient $<1,8$ hingegen auf Phenol oder andere Rückstände von Chemikalien, welche für die Extraktion benutzt werden. Auch kann eine zu geringe DNA Konzentration der Grund für einen niedrigen Quotienten sein. RNA hat einen optimalen A_{260}/A_{280} Quotienten von 2,0. Zu niedrige oder zu hohe Quotienten sind für DNA und RNA gleich. Der A_{260}/A_{230} Quotient sollte bei RNA und DNA zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Werte $<1,8$ weisen auf Glykogen-, Carbohydrate-, Phenol- oder Guaninresiduen hin, hohe Werte auf falsche Eichung oder verschmutzte Arbeitsflächen (ThermoScientific 2011).

2.3.5. RNA-Qualitätskontrolle

Um die Qualität und Vergleichbarkeit der RNA genauer bestimmen zu können, wird mittels des Bioanalyzer 2100 der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) eine RNA-Integrity-Number (RIN-Nummer) berechnet, und es wird ein Elektropherogramm erstellt. Dies ermöglicht eine objektivierbare Qualitätskontrolle der RNA. Als Kit wurde das Agilent RNA 6000 Nano Reagents Part I Kit der Firma Agilent Technologies verwendet. Der Bioanalyzer 2100 kann eine miniaturisierte Kapillarelektrophorese durchführen. Es wird ein Mini-Glaschip verwendet, welcher aus einem Netzwerk mit untereinander verbundenen Kanälen besteht. Eine Gelmatrix, welche einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, wird in die Kanäle pipettiert. Nun können maximal 12 RNAs (je 1µl) mit einer Markersubstanz (5µl) in die dafür vorgesehenen Probenschächte aufgetragen werden. Zusätzlich wird eine Leiter zur Größenbestimmung aufgetragen. Der Mini-Glaschip wird nun in den Bioanalyzer 2100 eingelegt. Nachdem eine Spannung angelegt ist, wandern die negativ geladenen RNAs in den Injektionskanal des Kapillarsystems. Hier lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff an die RNAs. Daraufhin wandern die RNAs in den Separationskana, in dem die Größenaufftrennung der Proben stattfindet. Durch laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion werden am Ende des Kanals die Längen

2. Material und Methoden

bestimmt. Nun kann die Bioanalyzer-BioSizing Software ein Elektropherogramm erstellen. Für eine gute Qualität spricht, wenn der 18S Peak und der 28rRNA Peak im Elektropherogramm in einem Größenverhältnis von 2:3 liegt. Ein erhöhtes Grundsignal, erniedrigte Peaks oder Nebenpeaks sprechen für eine degradierte RNA. Des Weiteren erstellt die Software ein gelähnliches Bild, welches die unterschiedlichen Größen der RNAs anhand von Banden widerspiegelt. Die Firma Agilent hat einen eigenen Algorithmus entwickelt, welcher anhand verschiedener Eigenschaften (Pre Region, Marker, 5S Region, Fast Region, 18S-,28S-Fragment, Inter Region, Precursor Region, Post Region) des jeweiligen Elektropherogramms eine Zahl von 1-10 generiert (Mueller & Schroeder 2004). Zehn steht für vollkommen intakte DNA, 1 für sehr stark degradierte RNA. Die RIN-Nummer lässt eine Objektivierung der Proben zu mit Hilfe von ihr kann analysiert werden, ob die RNAs eine ähnliche Qualität besitzen und somit gut vergleichbar sind. Analysiert werden alle 46 Ovarialkarzinomproben sowie alle für die qRT-PCR verwendeten mRNAs aus Zelllinien. Die Agilent-Analysen wurde mit Hilfe von Vanessa Vosseler und Sven Poths durchgeführt (MFT Tübingen).

2.3.6. cDNA Synthese

Die RNAs der Ovarialkarzinomproben sowie die RNAs der Zelllinien werden mittels QuantiTect Reverse Transcription Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben transkribiert. Für eine gute Vergleichbarkeit in der anschließenden qRT-PCR werden gleiche Mengen der RNAs benötigt. Für die Zelllinien werden je 200ng RNA pro Reaktion eingesetzt, für die Ovarialkarzinomproben je 258ng. In **Tabelle 2.3.** ist die Durchführung der Synthese dokumentiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.3: Durchführung der cDNA Synthese

Durchführung	cDNA Synthese
Berechnung Volumen	Es wird sich an der RNA-Probe orientiert, welche die geringste Menge pro Volumen aufweist. Das benötigte Volumen für eine fixe Menge wird darauf für alle Tumorproben berechnet (Zelllinien 200ng; Tumorproben 258ng), damit die Vergleichbarkeit in der qRT-PCR garantiert wird.
Volumenanpassung	RNA und RNase freies Wasser werden in Stripes pipettiert. Die Stripes werden zuerst mit dem berechneten RNA Volumen befüllt und danach mit RNase freiem Wasser auf 12µl aufgefüllt. Danach wird bei >8000 x g zentrifugiert und die Probe auf Eis gestellt.
DNA Eliminierung	Zu jedem Stripe werden 2µl DNA Wipeout Buffer 7x pipettiert und anschließend für 2min. bei 42°C inkubiert.
Vorbereitung Reverse Transkription	Ein Mastermix für die Reverse Transkription wird angesetzt (Quantiscript Reverse Transcriptase (1µl/Reaktion), Quantiscript RT Buffer 5x (4µl/Reaktion), RT Primer Mix (1µl/Reaktion; muss frisch von -20°C geholt werden)). Nachdem in jedem Stripe der Mastermix vorgelegt ist, wird nun die RNA-Probe (14µl) hinzugefügt, gut gemixt und auf Eis gelagert. Für eine negativ Kontrolle ohne Quantiscript Reverse Transcriptase werden 4µl Quantiscript RT Buffer 5x und 1µl RT Primer Mix als Mastermix pipettiert.
Reverse Transkription	Die RNAs werden bei 42°C für 30min. inkubiert. Danach für 3min. bei 95°C (inaktiviert Quantiscript Reverse Transcriptase). Die Proben werden bei -20°C gelagert.

2.4. Methylierungsanalyse

Um das Methylierungslevel von resistenten und sensitiven Ovarialkarzinomen an der *cg21570597*-Site detektieren zu können, wird die PyroMark-Sequenzier-Methode genutzt. Hierbei wird in Echtzeit sequenziert und detektiert. Über eine geeignete Vorbehandlung (Bisulfitkonvertierung) der DNA kann in der Sequenzierung sichtbar gemacht werden, ob eine CpG-Site methyliert oder unmethyliert ist (siehe **Kapitel 2.4.7.**). In Zusammenarbeit mit dem SpecialTec Service der Firma Qiagen werden geeignete Primer designt, welche spezifisch für die *cg21570597*-Site sind. Nach erfolgter Bisulfitkonvertierung wird mit biotinylierten Primern eine Amplifizierung der gewünschten Sequenz durchgeführt. Ein 2%-Agarosegel wird zur Kontrolle angefertigt. Daraufhin werden die amplifizierten DNA-Stränge mittels der Vacuum Workstation getrennt und der gewünschte DNA-Strang auf die Sequenzierung vorbereitet. Die geplanten Sequenzierungen werden in die PyroMark-Q96-ID-Software eingespeichert und die benötigten Volumina für die Sequenzierung berechnet. Anschließend werden die Proben in das PyroMark-Q96-ID-Gerät eingeladen und die Sequenzierung durchgeführt. Mittels SPSS werden die Daten analysiert und ausgewertet.

2. Material und Methoden

2.4.1. Bisulfitkonvertierung

Um die Unterschiede im Methylierungslevel sichtbar machen zu können, wird die DNA mit dem EZ-DNA Methylation Kit der Firma Zymo Research behandelt. Hierbei werden nicht methylierte Cytosin-Basen zu Uracil umgewandelt. Die epigenetische Modifikation wird folglich in einen Sequenzunterschied übersetzt (Frommer et al., 1992). Dies erfolgt mittels Behandlung durch Natriumbisulfit, welches unmethylierte Cytosin-Basen zu Uracil-Basen umwandelt. In einer anschließenden Polymerase-Kettenreaktion werden dann für Uracil-Basen Thymin-Basen eingebaut. Methylierte Cytosin-Basen reagieren nicht mit Natriumbisulfit und bleiben somit unverändert. In **Abbildung 2.2** ist die Bisulfitkonvertierung schematisch aufgearbeitet. **Tabelle 2.4** beschreibt die einzelnen Schritte der Bisulfitkonvertierung im Detail.

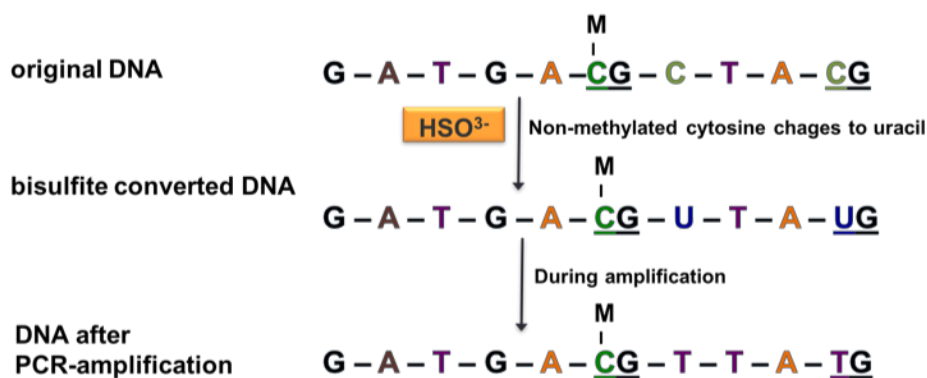


Abbildung 2.2: Ablauf einer Bisulfitkonvertierung. Nicht methyliertes Cytosin wird zu Uracil während der Konvertierung. Methyliertes Cytosin bleibt unverändert. Für Uracil wird bei der Amplifikation Thymin eingebaut. Methyliertes Cytosin bleibt auch während der Amplifikation unverändert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.4: Bisulfitkonvertierung mittels EZ-DNA Methylation Kit von Zymo Research

Durchführung	Bisulfitkonvertierung
Vorbereitung	CT Conversion Reagenz wird angesetzt. Zunächst wird dem CT-Conversion Reagenz 750µl RNase freies Wasser und 210µl des M-Dilution Puffer zugesetzt und bei Raumtemperatur für 10min. gevortext. Danach bei -20°C aufbewahrt. CAVE: das CT Conversion Reagenz ist Lichtempfindlich.
Denaturierung der DNA	5µl von M-Dilution-Puffer, 2µl Proben-DNA sowie 43µl RNase freies Wasser werden in Stripes pipettieren und durch auf- und ab pipettieren gut vermischen. Anschließend für 15min. im ThermoCycler bei 37°C inkubieren.
Konvertierung	CT Conversion Reagenz wird auf 37°C erwärmt und anschließend gevortext. 100µl der CT Conversion Reagenz wird einer Probe hinzugefügt und danach für 16h bei 50°C im Thermo Cycler inkubiert.
Aufreinigung	
1. Binden der Probe auf Säule	In einem Sammelröhrchen wird eine Zymo-Spin™ IC Säule platziert. Auf die Säule wird 400µl M-Binding Puffer sowie die Probe (150µl) gegeben. Der Deckel wird geschlossen und zur Durchmischung wird das Sammelröhrchen mehrmals gedreht. Damit die DNA besser an die Säule bindet werden die Proben kurz stehen gelassen. Anschließend wird für 30sec. bei >10000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
2. Waschen	100µl des M-Wash Puffers werden auf die Säule gegeben, bei Höchstgeschwindigkeit für 30sec. abzentrifugiert und anschließend wird der Durchfluss verworfen. Anschließend wird 200µl des Desulphonation Puffers auf die Säule gegeben und für 15-20min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dies bewirkt die Ablösung des Bisulfits von der DNA. Daraufhin wird 200µl des M-Wash Puffers zugegeben und bei Höchstgeschwindigkeit für 30sec. abzentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt. Abzentrifugiert wird dieses Mal für 5min. Die Durchflüsse werden jeweils verworfen.
Eluation	Die Zymo-Spin™ IC Säule wird in ein frisches 1,5ml Sammelröhrchen platziert und 12µl des M-Elution Puffers werden auf die Säule pipettiert. Es wird für 30sec. bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Die bisulfitkonvertierte DNA wird bei -80°C aufbewahrt.

2.4.2. Primer Design für Amplifizierung und Sequenzierung der DNA

Die verwendeten Primer werden für dieses Projekt speziell vom Special Tec Service der Firma Qiagen designt. Die Primer dürfen nur an bisulfitkonvertierte DNA binden. Der reverse Primer ist biotinyliert, damit dieser DNA-Strang später für eine spezifische PyroMark Sequenzierung isoliert werden kann. Wie in **Abbildung 2.3** zu sehen ist, enthält die zu amplifizierende Sequenz viele Tandem-Repeats. Auch zeigt die Sequenz viele Homopolymere. Aus diesem Grund ist es schwierig, passende Primer für diese Sequenz zu designen.

2. Material und Methoden

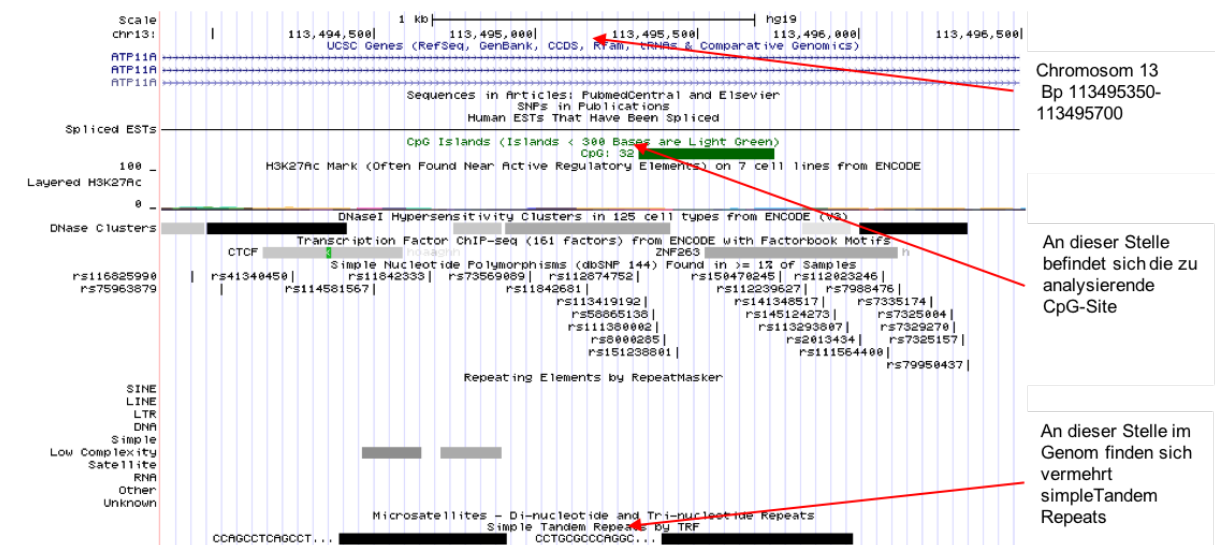


Abbildung 2.3: Gezeigt wird ein Screenshot Bildschirmausschnitt einer Analyse des Genome Browsers.

Im ATP11A-Gen auf Chromosom 13 findet sich zwischen bp 113,495,250 und und 113,495,800 die von uns zu analysierende cg21570597-Site, welche vermehrt simple Tandem Repeats enthält.

Die ursprünglich von der Firma Qiagen angebotenen Primer konnten nicht spezifisch an der DNA binden. Dies bewirkte in der anschließenden PyroMark Sequenzierung Effekte des „Minus Shifts“ und „Restart“. Bei einem „Minus Shift“ erfolgt der Nukleotid Einbau bei einem kleinen Anteil der Template DNA nicht, und es kommt daher zu einer verschobenen Sequenzierung. Gründe für einen „Minus Shift“ sind beispielsweise eine zu geringe Nukleotidkonzentration oder hohe Homopolymere. „Restart“ ist ein Phänomen, das entstehen kann, wenn der Sequenzierprimer nicht vollständig an das Template binden kann. Teilweise bindet dann Sequenzierprimer auch noch leicht verzögert, nämlich nach dem Einbau des ersten Nukleotids und daraufhin beginnen Sequenzierungen zeitversetzt. Dadurch kommt es zu falsch hohen oder niedrigen Peaks.

Abbildung 2.4 zeigt das Pyrogramm, welches die PyroMark Software für Testläufe mit ursprünglichen Primern der Firma Qiagen generiert hat. Genauere Erklärungen zur Generierung des Histogramms und Pyrogramms finden sich in **Kapitel 2.4.5** sowie in **Kapitel 2.4.9**.

Abbildung 2.4 soll dazu dienen, die Phänomene zu verdeutlichen.

Bei der Dispension 2 entspricht das Lichtsignal im Pyrogramm nicht der erwarteten

2. Material und Methoden

Höhe eines 5-fach Homopolymers (auch nicht, wenn man den Zusatzpeak der zweiten Dispersion an Position 3 hinzurechnet). Auch die folgende Dispersion 4 zeigt einen zu geringen Adenin-Einbau. Wenn dann wiederum Tyrosin an Position 6 dispensiert wird, ist der Peak allerdings höher als erwartet (auch schon ohne die zusätzliche siebte Dispersion). Hier könnte ein „Restart“ oder „Minus Shift“ vorliegen. In der Zwischenzeit hat weiterer Sequenzierprimer gebunden, der nun mit dem Einbau des Tyrosins als erstes Nucleotid nach dem Sequenzierprimer beginnt. Daraufhin folgt als zweites Nucleotid ein Adenin, das für die später gebundene Fraktion des Sequenzierprimers an der Dispersion 9 eingebaut wird. Genauso verhält es sich mit dem Guanin an Dispersion 8. Während dieser Peak noch zu gering ist, entspricht die Dispersion 12 dann den Erwartungen (Hauptanteil zu gering aber mit „Restart“ komplett).

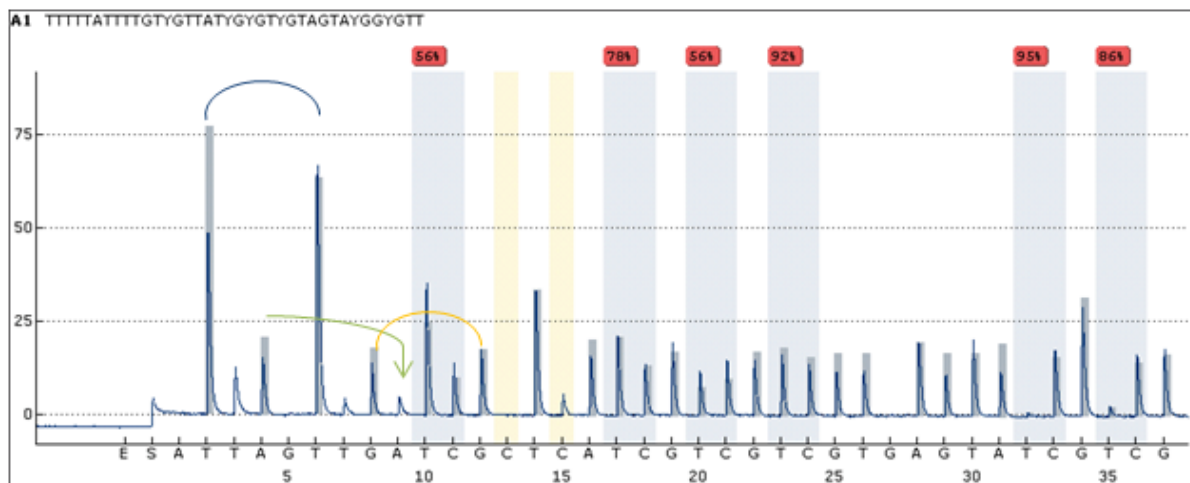


Abbildung 2.4: Pyrogramm mit „Restart“ und „Minus Shift“ Phänomen aufgrund unspezifisch bindender Primer.

Die Software des PyroMark Q96 ID entwirft das Pyrogramm für Test-DNA. Gezeigt wird die Höhe des Lichtpeaks für jede einzelne Base. Zusätzlich angegeben wird die sequenzierte Sequenz, Methylierungslevel für die einzelnen CpG-Sites und Mittleres Methylierungslevel. Die Höhe der Lichtpeaks der einzelnen Basen (blau) wird von der Software mit den zu erwartenden (grau) abgeglichen. Rot angezeigt werden Methylierungslevel, wenn die Sequenzierung nicht erfolgreich war. Die Pfeile verdeutlichen das „Restart“ und „Minus-Shift“ Phänomen.

Die neu designten Primer der Firma Qiagen können die Probleme, welche durch die Homopolymere entstehen, nicht vollständig beseitigen. So ist in **Kapitel 2.4.4** beschrieben, dass im Agarosegel mehrfach Banden zu sehen sind. Jedoch kann der Sequenzierprimer spezifisch an die Template DNA binden und so eine erfolgreiche und spezifische Auswertung garantiert werden. Dies wurde uns vom Special Tec Service der Firma Qiagen bestätigt. **Tabelle 2.5** zeigt die verwendeten Primer.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.5: Primersequenzen

Assay CG21570597_NH	Lot No. 174844455
Forward PCR Primer	GTTTTGTTTAGTTAGGAGTTGGGTATGG
Reverse PCR Primer Biotin Modifikation	CTCCCTCTACACCTAAAACATCC
Sequencing Primer	TGTGGTGTTTTTTTTATTTTG

2.4.3. Polymerase Kettenreaktion für die *cg21570597*-Site auf Chromosom 13

Mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) können mittels Primern spezifische Sequenzen der DNA vervielfältigt werden. Als Ausgangsmatrize werden für jeden Zyklus die Produkte der vorherigen Amplifizierung genutzt. So wird die DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt.

Die Amplifizierung der gewünschten Sequenz wird mittels des PyroMark PCRkit der Firma Qiagen und eines ThermoCycler (BioRad T100 thermal cycler der Firma Bio-Rad) durchgeführt. Wie in Kapitel 2.4.2. beschrieben, ist die Sequenz schwierig zu amplifizieren. Für eine möglichst gute Stabilität wurde die Zusammensetzung des Mastermix modifiziert. In **Tabelle 2.6** sind die einzelnen Konzentrationen der Reagenzien einsehbar. Zunächst wird für alle Proben ein Mastermix hergestellt, welcher dann auf alle benötigten Stripes verteilt wird. Daraufhin wird in jedes Stripe Proben-DNA zugegeben. Es werden auch nicht bisulfitkonvertierte DNA-Kontrollen von jeder Tumorprobe mitgeführt.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des Mastermix

Zusammensetzung Mastermix	Polymerase Kettenreaktion
In ein Stripe wird pipettiert:	
PyroMark PCR Master Mix 2x	12,5µl
CoralLoad Concentrate 10x	2,5µl
25mMgCl ₂	1,5µl
Primer	2,5µl
Q-Solution	5µl
Probe	1µl

2. Material und Methoden

Das Amplifizierungsprotokoll richtet sich nach den Herstellerangaben der Firma Qiagen und ist in **Tabelle 2.7** einsehbar.

Tabelle 2.7: PCR-Protokoll nach PyroMark PCRkit mittels des BioRad T100 thermal cycler

PCR-Protokoll	ThermoCycler
Initialer Aktivierungsschritt	15min. bei 95°C
Denaturierung	30sec. bei 94°C
Anlagerung	30sec. bei 56°C
Extension	30sec. bei 72°C
Zyklusanzahl	45
Extension	10min. bei 72°C

2.4.4. Agarosegele zur Erfolgskontrolle der Amplifizierung

Zur Erfolgskontrolle wird ein 2 % Agarosegel gegossen. In der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Die negativ geladenen Phosphate der DNA wandern zur Anode. Kleinere Fragmente wandern deutlich schneller durch die Gelmatrix als größere. Der DNA wird vor Anlegen des elektrischen Feldes der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid zugegeben. Dadurch können die Fragmente nach erfolgreicher Auftrennung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Zunächst wird ein Agarosegel gegossen. Hierfür werden 1,8g Agarose (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) in 75ml 1x TBE-Puffer (**Tabelle 2.8**) gegeben und in der Mikrowelle (LG Electronics Deutschland GmbH, Willich, D) aufgekocht. Die Agarose löst sich vollständig auf und bildet zusammen mit dem 1x TBE-Puffer eine zähflüssige Masse. Nach kurzem Abkühlen werden 3µl Ethidiumbromid-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) hinzu pipettiert und durch Schwenken gemischt. Nach kurzer Abkühlzeit wird die Masse in einem Gelträger eingegossen und mit Gelkämme versehen. Nach 30 Minuten ist das Gel ausgehärtet und kann in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (PEQLAB Biotechnologie, GmbH, Erlangen, D) überführt werden. Die Gelkämme werden entfernt, und in die Taschen werden je 5µl der Probe und 3µl Blaupuffer (siehe **Tabelle 2.9**) geladen. Der Blaupuffer bewirkt das Absinken der Proben in die Tasche. Zur Fragmentlängenbestimmung wird eine peqGOLD 100 bp DNA-Leiter Plus 50µg (PEQLAB Biotechnologie, GmbH, Erlangen, D) zu Beginn und am Ende jeder Taschenreihe geladen. Nun wird eine Spannung von 120V für etwa 40 Minuten angelegt. Hierfür wird ein Consort E835 Electrophoresis

2. Material und Methoden

Power Supply (PEQLAB Biotechnologie, GmbH, Erlangen, D) verwendet. Das Gel wird anschließend unter UV-Licht fotografiert (Olympus super bright F1.8) und mit der ArgusX1® Software der Firma Biostep bearbeitet.

Tabelle 2.8: Herstellung von 10xTBE Puffer

10x TBE Puffer	
Borsäure (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D)	0,1M
Ethylendiamin-Tetraessigsäure, pH 8,0 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)	20 mM
Tris Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,D)	0,1 M

Tabelle 2.9: Herstellung 10x Agarose Blaupuffer

10x Agarose-Blaupuffer	
Bromphenolblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,D)	0,01%
Ficoll (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,D)	8%
TBE (hergestellt nach Tabelle 2.8.)	1x

2.4.5. Erstellung des Run-Assays und Volumina Berechnungen für die PyroMark Sequenzierung

Um mit den amplifizierten DNA-Sequenzen eine PyroMark Analyse durchführen zu können, muss zunächst ein „Run-Assay“ erstellt werden. Hierfür wird in der PyroMark Software die zu sequenzierende Sequenz eingegeben. Diese entspricht der komplementären Basenabfolge des biotinylierten DNA-Strangs, denn wie in **Kapitel 2.4.7.** beschrieben, zeigt der neu-synthetisierte Strang die zu analysierende Sequenz. Weiter entwirft das „Assay-Setup“ eine Dispensation-Order, welche die Reihenfolge angibt, in welcher Nukleotide in die Reaktion eingespritzt werden. Diese Dispensation-Order zeigt also auch die komplementäre Basenfolge des biotinylierten DNA-Strangs, enthält jedoch vereinzelt Kontroll-Nukleotide, welche aufschlüsseln können, ob bei Fehlschlagen der Sequenzierung ein ‚Restart‘ oder ‚Minus-Shift‘ vorliegt (siehe **Kapitel 2.4.2.**). Außerdem werden Homopolymere nur einmal in die Reaktion eingespritzt, und man sieht in der Dispensation-Order folglich nur eine Base. In diese Dispensation-

2. Material und Methoden

Order kann auch eine Bisulfitkontrolle eingeklickt werden (siehe **Kapitel 2.4.8.**). Als nächsten Schritt erstellt das „Assay-Setup“ ein Histogramm, welches für die jeweils eingespritzte Base in blauen Balken den zu erwartenden Lichtpeak anzeigt. Doppelpfeile zeigen an, dass an dieser Stelle der Sequenz der Lichtpeak abhängig vom Methylierungslevel ist. Blau gemarkert sind die zu analysierenden Methylierungsstellen. Rot angezeigt werden Thymin-Basen, welche ursprünglich Cytosin-Basen waren und welche für eine Bisulfitkontrolle genutzt werden können. **Abbildung 2.5** zeigt das für unsere Sequenz entworfene Histogramm des ‚Assay-Setup‘ des PyroMark Q96 ID Geräts.

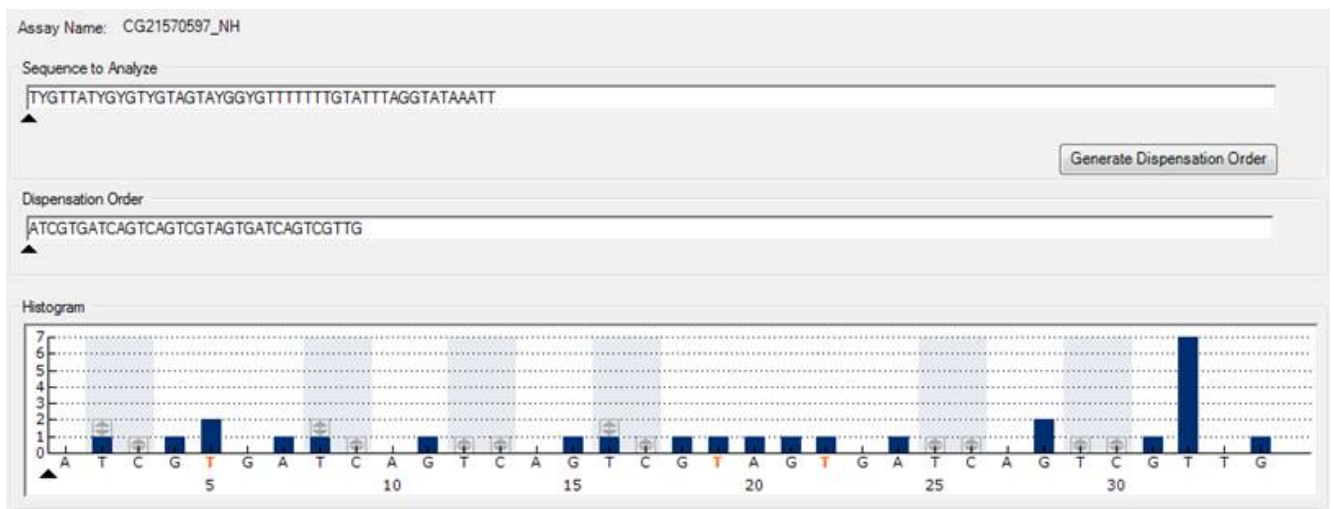


Abbildung 2.5: Histogramm entworfen vom dem 'Assay-Setup' der PyroMark Q96 ID Software.

Im Folgenden sind die zu analysierende Sequenz und die dafür entworfene Dispensation-Order abgebildet.

Sequence to Analyse:

TYGTTATYGYGTYGTAGTAYGGYGT TTT TTTGTATTTAGGTATAAATT

Dispensation-Order:

ATCGTGATCAGTCAGTCGTAGTGATCAGTCGTTG

Als nächster Schritt muss für die Software im ‚Run-Setup‘ eingespeichert werden, wie der Sequenzierungs-Run geplant ist. Es können 96 Proben gleichzeitig gemessen und dabei unterschiedliche Assays verwendet werden. Für unsere Messung wählen wir

2. Material und Methoden

den für uns neu designten Assay. Anschließend werden die Wells mit den eingesetzten Proben beschriftet und abgespeichert. Anhand der Anzahl der geplanten Proben und dem verwendeten Assay berechnet die Software nun die benötigten Volumina für die Enzyme, Substrate, und Nukleotide.

2.4.6. Probenvorbereitung zur PyroMark Sequenzierung

Mit den berechneten Volumina (siehe **Kapitel 2.4.5.**) können die Proben für die Sequenzierung vorbereitet werden. Zunächst wird eine Lösung hergestellt, welche mittels Beads die biotinylierten Primer bindet. In **Tabelle 2.10** ist die exakte Zusammensetzung der Lösung dokumentiert. Der biotinylierte DNA-Strang kann so, gebunden an die Beads, mittels der Vacuum Workstation isoliert werden. Vor Gebrauch muss die Streptavidin Sepharose-Lösung gut gevortext werden, um eine homogene Emulsion herzustellen. Nach Herstellung des Mastermix wird die Bindungslösung auf eine 96-Well Platte (Protein Digestion Plate, 4titude® Ltd., Berlin, D) pipettiert. Pro Well werden 40µl des Mastermix vorgelegt. Daraufhin wird die amplifizierte und im Agarosegel kontrollierte Proben-DNA in die Wells eingefüllt. Die Probenmenge beträgt für dieses Assay 40µl, da nur so ausreichend hohe Licht-Peaks detektiert werden können. Um 40µl Proben-DNA zur Verfügung zu stellen, müssen 2 amplifizierte Tumorproben des gleichen Tumors und der gleichen Bisulfitkonvertierung gepoolt werden. Die Proben werden streng nach der in das ‚Run-Assay‘ eingespeicherten Reihenfolge in die Wells pipettiert, um eine eindeutige Zuordnung der Proben zu garantieren. Das Reaktionsvolumen beträgt insgesamt 80µl.

Tabelle 2.10: Herstellung der Bindungs-Lösung

Bindungs-Lösung Mastermix	Menge pro Well
PyroMark Binding Buffer (Qiagen GmbH, Hilden, D)	38,5µl
Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, München, D)	1,5µl

Die Immobilisation (Bindung der Beads an biotinylierte DNA) erfolgt für mindestens 10 Minuten im Schüttelblock. Dafür wird die 96-Well Platte mit Klebefolie abgedeckt.

Während der Immobilisation wird die Annealing-Lösung hergestellt und je 40µl in ein Well der Pyrosequencing 96-Well Platte (PyroMark Q96 Plate, Qiagen GmbH, Berlin,

2. Material und Methoden

D) vorgelegt. Die Zusammensetzung der Lösung kann **Tabelle 2.11** entnommen werden.

Tabelle 2.11: Herstellung der Annealing-Lösung

Annealing-Lösung Mastermix	Menge pro Well
PyroMark Annealing Buffer (Qiagen GmbH, Hilden, D)	36µl
Sequencing Primer (Qiagen GmbH, Hilden, D; siehe Kapitel 2.3.2.)	4µl

Als nächster Schritt erfolgt die Isolierung des biotinylierten DNA-Strangs mittels der Vacuum Workstation (PyroMark Q96 Vacuum Workstation, Qiagen GmbH, Hilden, D). Während der Isolation werden die Proben mit verschiedenen Puffern gewaschen. Diese müssen in die dafür vorgesehenen Wannen gefüllt werden. **Tabelle 2.12** zeigt eine Auflistung über die verwendeten Flüssigkeiten.

Tabelle 2.12: Puffer und Lösungen für PyroMark Q96 Vacuum Workstation der Firma Qiagen

Puffer und Lösungen für PyroMark Q96 Vacuum Workstation
PyroMark Denaturation Sol. (Qiagen GmbH, Hilden, D)
PyroMark Wash Buffer (Qiagen GmbH, Hilden, D)
70% Ethanol (Merck KgaA, Darmstadt, D)
Milli-Q (Millipore GmbH, Eschborn, D)

Ein Handgerät, welches, angeschlossen an einer Pumpe, ein Vacuum aufbaut, ist bestückt mit 96 Stiften. Diese sind so angeordnet, dass gleichzeitig je ein Stift in ein Well der 96-Well Platte eingetaucht werden kann. Die Beads und der daran gebundene biotinylierte DNA-Strang in der Bindungs-Lösung binden dann an die Filter in den Stiften. Damit die biotinylierte DNA für die PyroMark Sequenzierung verwendet werden kann, muss sie aufgereinigt werden. Für diesen Zweck wird das Handgerät der Reihe nach in die verwendeten Lösungen getaucht. Über die Stifte wird die Flüssigkeit in das Handgerät gesogen und über einen Schlauch in einen Abwurfbehälter gesaugt. Schlussendlich wird das Handgerät über die PyroMark Q96 Platte gehalten, die Pumpe sowie das Vacuum werden abgeschaltet und die Beads mit der biotinylierten-DNA fallen in die für sie vorbereiteten Wells. Damit sich die Beads von der biotinylierten

2. Material und Methoden

DNA lösen, wird die PyroMark Q96 Platte kräftig in der Waagrechten geschüttelt.

Abbildung 2.6 zeigt eine schematische Darstellung der Vacuum Workstation.

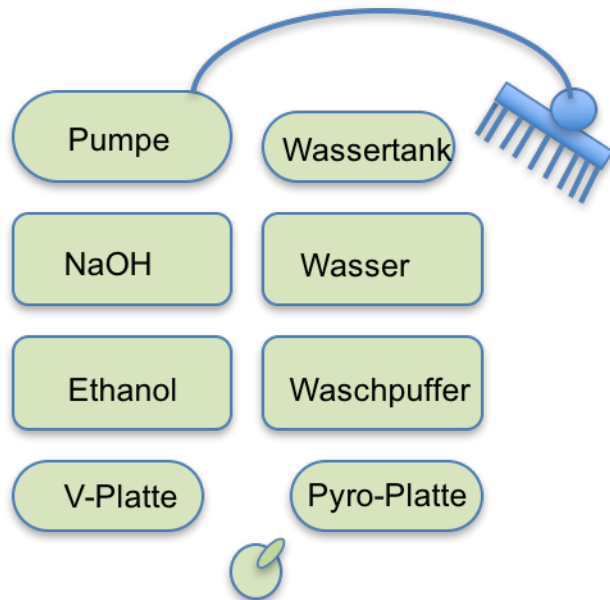


Abbildung 2.6: Schematische Zeichnung der Vacuum Workstation.

Blau gezeichnet ist das Handgerät mit Stiften welche die Beads binden. Das Handgerät ist angeschlossen an eine Pumpe und kann über einen Schlauch Flüssigkeiten über die Stifte in einen Abwurf saugen. Unten in der Mitte ist ein Schalter für das Vacuum. V-Platte steht für die 96-Well-Platte, welche gefüllt mit Bindungslösung ist. Die Pyro-Platte steht für die vorbereitete PyroMark Q96-Platte mit Annealing-Lösung, in welche die biotinylierte DNA überführt wird.

Damit der Sequenzierungsprimer (siehe **Kapitel 2.4.2.**) an die DNA binden kann, wird die PyroMark Q96-Platte für 2 Minuten auf einen 80°C vorgeheizten Heizblock gestellt. Anschließend wird die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 2.13 beinhaltet das genaue Vorgehen zur Isolation.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.13: Durchführung der Isolation des biotinylierten DNA-Strangs mittels Vacuum-Workstation

Durchführung der Isolation des biotinylierten DNA-Strangs mittels PyroMark Q96 Vacuum Workstation

1. Vorreinigung des Handgeräts

Das Handgerät wird in das Wasserreservoir gestellt. Das Vacuum und die Pumpe werden angeschaltet und die Filter für 10sec. gereinigt. Die Pumpe und das Vacuum werden anschließend abgestellt.

2. Binden der DNA an die Stifte im Handgerät

Das Handgerät wird vorsichtig in die V-Platte gestellt. Pumpe und Vacuum werden angestellt. Das Handgerät darf dabei nicht in die Wells gedrückt werden. Durch kurzes Anheben der V-Platte zusammen mit dem Handgerät wird kontrolliert, ob alle Flüssigkeit aus den Wells aufgesogen ist.

3. Waschen

Das Handgerät wird vorsichtig in die 70% Ethanol Kammer gehalten. Wenn das Ethanol beginnt durch den Absaugschlauch zu fließen wird für 5sec. gewartet. Dann wird das Handgerät direkt für 5sec. in die NaOH(Denaturierung)-Lösung gehalten. Es schließt sich direkt die Wash-Puffer Lösung an, jedoch für 10sec..

4. Überführen der DNA auf die PyroMark Q96-Platte

Das Handgerät wird aus der Wash-Puffer-Lösung genommen und vorsichtig geschwenkt, so dass die Stifte vertikal stehen und alle Flüssigkeit aus dem Handgerät abfließen kann. Das Handgerät wird nun vorsichtig nahe über die PyroMark Q96-Platte gehalten. Die Stifte sind dabei so ausgerichtet, dass die Proben über den für sie vorbereiteten Wells sind. Nun wird das Vacuum und folgend die Pumpe ausgeschaltet. Danach wird das Handgerät in die Annealing-Lösung in den Wells getaucht. Das Handgerät wird in den Wells vorsichtig geschüttelt um die Beads zu lösen.

5. Binden der Sequencing-Primer an die DNA

Die PyroMark Q96-Platte wird nun für 2min. auf einen auf 80°C vorgeheizten Heizblock gestellt. Anschließend wird die Platte für 20min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit, in welcher der Sequenzierungsprimer an die DNA bindet, wird die PyroMark Q96 Cartridge (Qiagen GmbH, Hilden, D) vorbereitet. Die Kartusche wird mit Nukleotiden, Enzym und Substrat befüllt, welche später während der Sequenzierung in das Reaktionsgefäß eingespritzt werden. Zu diesem Zweck enthält der Boden der Kartusche feine Nadeln. Die benötigten Volumina werden von der ‚Assay-Run‘-Software berechnet (siehe **Kapitel 2.4.5**). Die aufgezählten Reagenzien werden dem PyroMark Gold Q96 Reagents Kit (5x96) (Qiagen GmbH, Hilden, D) entnommen und nach Herstellerangaben gelöst.

Für das korrekte Befüllen der Kartusche ist es wichtig, dass das Label zum Befüller schaut. **Abbildung 2.7** zeigt eine schematische Darstellung der Kartusche und ihre korrekte Befüllung.

2. Material und Methoden

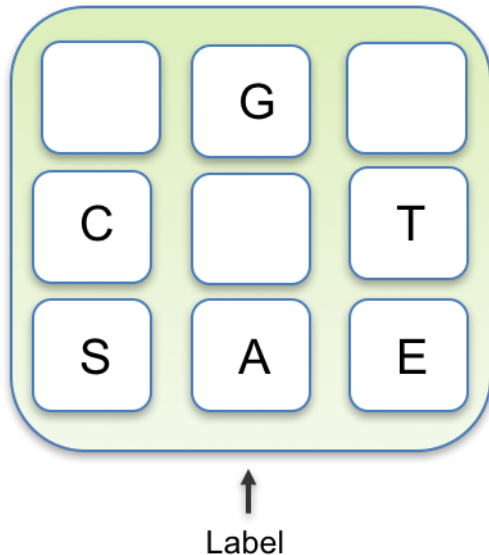


Abbildung 2.7: PyroMark Q96 Cartridge korrekt befüllt.

G steht für Guanin-Base, T für Thymin-Base, E für Enzym, A für Adenin-Base, S für Substrat und C für Cytosin-Base

2.4.7. PyroMark Sequenzierung mittels PyroMark Q96 ID

Nachdem alles, wie in **Kapitel 2.4.5** und **Kapitel 2.4.6** beschrieben, vorbereitet ist, kann die PyroMark Sequenzierung durchgeführt werden. Hierfür wird die befüllte Cartridge in die Roboterplattform des PyroMark Q96 ID Geräts platziert, und die PyroMark Q96-Platte, welche die DNA mit den daran gebundenen Sequenzierprimern enthält, wird über einen Charge-Coupled-Device (CCD) Chip ausgerichtet.

Das Prinzip der PyroMark Sequenzierung besteht darin, dass mittels Enzymen ein korrekter Baseneinbau in ein Lichtsignal umgewandelt wird. Die Detektion erfolgt in Echtzeit. Hierfür fährt die Cartridge über die PyroMark Q96 Platte und appliziert pro Well die benötigten Reagenzien. Zu allererst wird der Enzym-Mix, der aus *DNA-Polymerase*, *ATP-Sulfurylase* und *Luciferase* besteht, in die Wells eingespritzt. Darauf folgend wird ein Substratcocktail in jedes Well eingespritzt. Dieser besteht aus Adenosin-Phosphosulfat (APS) und Luciferin. Danach werden die einzelnen Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) gemäß der Dispensation-Order der Reihe nach in jedes Well gespritzt. Für ein dNTP braucht das Gerät ca. eine Minute pro Platte.

Erfolgt ein enzymatischer Einbau eines Nukleotids mittels *DNA-Polymerase* in die Sequenz, so entsteht im äquimolaren Verhältnis Pyrophosphat. Die Abbildung **Abbildung 2.8** zeigt die genannte Reaktion.

2. Material und Methoden

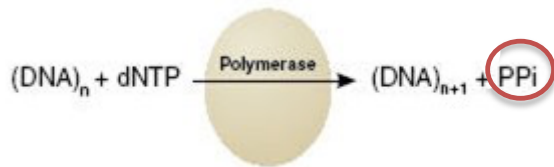


Abbildung 2.8: Beim enzymatischen Nukleotideinbau entsteht Pyrophosphat im äquimolaren Verhältnis zur in die DNA eingebaute Nukleotidmenge

modifiziert nach Qiagen: PyroMark Q24 User Manual; 07/2009

Dieses Pyrophosphat macht sich die *Sulfurylase* zunutze, indem sie mittels APS aus Pyrophosphat Adenosintriphosphat (ATP) entstehen lässt. Dieses ATP reichert sich ebenfalls im äquimolaren Verhältnis an. Die *Luciferase* ist ein ATP-abhängiges Enzym, welches Luciferin in Oxoluciferin katalysiert. Bei dieser Reaktion entsteht Licht. Dieses Licht ist in seiner Intensität äquivalent zum Pyrophosphat. Das Lichtsignal wird von dem CCD-Chip detektiert und in einen Peak umgeschrieben. Somit ist es möglich, eine quantitative Aussage über die Anzahl der eingebauten Nukleotide pro Reaktion zu machen. Die *lag*-Phasen der *DNA-Polymerase*, der *Sulfurylase* sowie der *Luciferase* sind sehr kurz, dadurch tritt das Lichtsignal nur kurz unmittelbar nach Einspritzen der Base auf, und strahlt somit nicht in weitere Sequenzierungsschritte. **Abbildung 2.9** zeigt die beschriebene Reaktion schematisch.

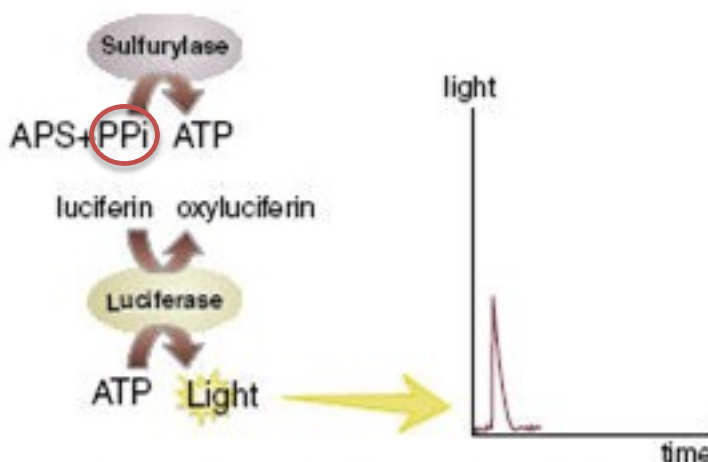


Abbildung 2.9: Katalyse der *Sulfurylase* und *Luciferase* zur Signalgenerierung

modifiziert nach Qiagen: PyroMark Q24 User Manual; 07/2009

2. Material und Methoden

Um zu vermeiden, dass Rest-Nukleotide im Well zurückbleiben, welche zu einem späteren Zeitpunkt eingebaut werden, und so die Sequenzierung verfälschen, ist dem Enzym-Mix die *Apyrase* beigelegt. Diese baut die Nukleotide enzymatisch ab.

Das Einspritzen von nicht passenden Nukleotiden (siehe **Kapitel 2.4.5.**) führt zu keiner Pyrophosphat Synthese und somit zu keinem Lichtpeak. Sie werden direkt von der *Apyrase* abgebaut. Die *lag*-Phase der *Apyrase* ist relativ lange. So findet der enzymatische Abbau der Nukleotide erst nach Ablauf der Reaktionen der *DNA-Polymerase*, der *Luciferase* sowie der *Sulfurylase* statt.

Um zu verhindern, dass ATP mit dem Desoxyadenosintriphosphat (dATP) interferiert, wird statt des dATP Desoxyadenosin-alpha-thio-triohosphat eingespritzt. Dieses Molekül wird sehr effizient von der *DNA-Polymerase*, nicht jedoch von der *Luziferase* erkannt.

2.4.8. Qualitätskontrollen der PyroMark Sequenzierung

Um eine erfolgreiche PyroMark Sequenzierung zu garantieren, werden verschiedene Voruntersuchungen und Kontrollen durchgeführt.

Zunächst werden das korrekte Arbeiten der PyroMark Vacuum Workstation und des PyroMarkQ 96 ID Instruments überprüft. Dies geschieht mittels des PyroMark Control Oligo der Firma Qiagen welche **Abbildung 2.10** in dargestellt ist. Dies ist ein biotinyliertes Oligonukleotid, welches unabhängig von einem Sequenzierprimer arbeitet. Das Control Oligo bildet einen Hairloop und dieser verhilft der Sequenz zum Selbstpriming. So kann eine Sequenzierung ohne Primer stattfinden. Das Vorgehen für die Vorbereitung der Sequenzierung ist entsprechend dem Vorgehen für die Tumorproben (**Kapitel 2.4.6**). Die Vacuum Workstation isoliert das biotinylierte Control Oligo, danach wird es im PyroMark Q96 ID sequenziert (siehe **Kapitel 2.4.7**). Die gewünschte Sequenz enthält Homopolymere von 2-3 Basen, Einzelbasen (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) sowie eine variierende Base, welche entweder ein Cytosin oder Thymin enthält. Diese Base spiegelt eine CpG-Site wider und wird in Prozent angegeben.

2. Material und Methoden

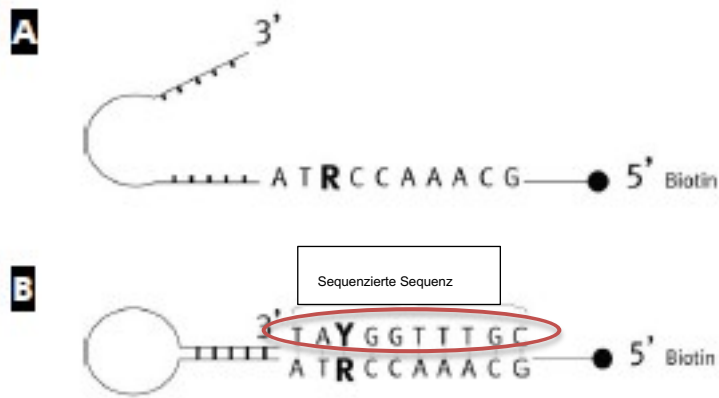


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des Control-Olig der Firma Qiagen
modifiziert nach Qiagen: PyroMark Q24 User Manual; 07/2009

Als weitere Kontrollen werden Leerproben und Bisulfit-behandelte Kontrollproben sequenziert. Dies überprüft das korrekte Arbeiten der Primer, welche in **Kapitel 2.4.2** genauer beschrieben sind. Leerproben dürfen bei der Sequenzierung keine Ergebnisse liefern, Bisulfit-behandelte Kontrollproben sollen in gewünschter Sequenz sequenziert werden und die Methylierungslevel sollen korrekt detektiert werden.

Ob eine Bisulfitkonvertierung komplett abgelaufen ist, kann anhand einer Bisulfitkonvertierungskontrolle in der Sequenzierung überprüft werden. Eine unvollständige Bisulfitkonvertierung würde das Ergebnis verwässern. In diesem Falle würden nicht methylierte Cytosin-Basen nicht in Thymin-Basen umgebaut und würden somit in der Sequenzierung als methyliert angezeigt werden. Die Bisulfitkontrolle wird möglichst am Anfang der Sequenzierung programmiert. Hierfür wird eine Cytosin-Base in der Sequenz gesucht, welche nicht im Zusammenhang mit einer CpG-Site steht, und somit auch niemals methyliert ist. Diese Cytosin-Base wird im korrekten Fall mittels der Bisulfitkonvertierung zu einer Thymin-Base. In der Dispensation-Order (siehe **Kapitel 2.4.5.**) wird direkt nach dieser Thymin-Base (in rot markiert) nun eine Cytosin-Base programmiert. An dieser Stelle darf bei kompletter Konvertierung kein Peak messbar sein, ansonsten ist die Bisulfitkonvertierung unvollständig.

Ob die Methylierungslevel korrekt erkannt werden, wird mittels Kontroll-DNA kontrolliert, welche ein uns bekanntes Level an Methylierung aufweisen. Zu diesem Zweck wird das EpiTect PCR Controll DNA Set (100) der Firma Qiagen verwendet. Dieses Set enthält Bisulfit behandelte unmethylierte 0% und methylierte 100% DNA. Diese werden in verschiedenen Verhältnissen gemischt, so dass 4 verschiedene Kontroll-DNAs mit Methylierungsleveln von 0%, 30%, 70% und 100% zur Verfügung

2. Material und Methoden

stehen. Diese Kontroll-DNAs werden mit den Primern (siehe **Kapitel 2.4.2.**) der Firma Qiagen nach dem beschriebenen Protokoll in **Kapitel 2.4.3.** amplifiziert. Ein Agarosegel wird zur Erfolgskontrolle durchgeführt, und in jedem Sequenzierungsdurchlauf werden je 2 Proben von allen vier Methylierungsleveln geladen (siehe **Kapitel 2.4.5.** und **2.4.6.** und **2.4.7.**)

Damit eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse garantiert wird, werden von jeder Tumorprobe 2 unabhängige Bisulfitbehandlungen (siehe **Kapitel 2.4.1.**) angefertigt. Von diesen Proben werden jeweils zwei PyroMark Sequenzierungen durchgeführt, so dass von jeder Tumorprobe 4 Sequenzierungen zur Auswertung zur Verfügung stehen.

2.4.9. Auswertung der PyroMark Sequenzierung

Nach Beendigung des ‚Sequenzierungs-Run‘ wertet die ‚PyroMark Q96 ID‘-Software die einzelnen Proben, welche auf der PyroMark Q96-Platte mitgeführt werden, selbständig aus. Für jede Probe wird ein Pyrogramm erstellt, welches die einzelnen Lichtpeaks in der Dispensation Order anzeigt. Die Software gleicht die Höhe der Lichtpeaks mit den erwarteten ab und kann somit berechnen, ob die Sequenzierung erfolgreich und auswertbar ist. Der Grad der Methylierung wird in Prozent angegeben. Dabei werden die Prozentangaben der einzelnen CpGs blau markiert, wenn der Run erfolgreich war, gelb, wenn er auswertbar ist jedoch nicht komplett stabil, oder rot, wenn eine Sequenzierung nicht erfolgreich war. **Abbildung 2.11.** zeigt einen Screenshot des ‚CpG‘-Setups, in welchem die einzelnen Proben nach erfolgter Sequenzierung angezeigt werden.

2. Material und Methoden

	1	2	3	4	5	6	7
A	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng
B	CG21570597_ CEPH10211 10	CG21570597_ CEPH1078 10n	CG21570597_ CEPH 1424/3 1	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng	CG21570597_ Qiagen 10ng

Abbildung 2.11: Screenshot des ‚CpG‘-Setup der ‚PyroMarkQ96 ID‘- Software nach erfolgter Sequenzierung.

Zu sehen sind Kontroll-Proben mit definiertem Methylierungslevel der Firma Qiagen und CEPH-DNA aus dem Genetischen Labor der Uni Tübingen. Blau markiert sind Runs welche einwandfrei sequenziert werden konnten, gelb markiert ist eine CEPH-DNA, welche aufgrund von zu wenig Probenmaterial nicht perfekt sequenziert werden konnte, jedoch auswertbar ist.

Die einzelnen Methylierungswerte wurden mittels SPSS ausgewertet. Die platinresistenten und platinsensitiven Ovarialkarzinomproben werden einander gegenübergestellt und verglichen. Geeignete Tests zur Überprüfung der Signifikanz werden angewendet.

2.5. Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ermöglicht die Berechnung der relativen Expression eines Gens. Mittels dieser Methode untersuchen wir die Genexpression von *ATP11A* sowie *ATP11B* in 10 Zelllinien sowie Ovarialkarzinomproben, welche resistent oder sensitiv auf platinhaltige Chemotherapie sind. Hierfür muss zunächst, wie in **Kapitel 2.3.6.** beschrieben, mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Für die qRT-PCR wird der LightCycler®480 im 384er Format der Firma Roche verwendet. Um Expressionslevel berechnen zu können, wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green der Firma Qiagen genutzt, welcher sich in die kleine Rinne doppelsträngiger DNA einbaut. Während der Amplifikation des gewünschten Gens wird in jedem Zyklus das Fluoreszenzsignal gemessen. Überschreitet die Fluoreszenz nach einer gewissen Zykluszahl die Hintergrundfluoreszenz, so tritt die Exponentialphase der Amplifikation ein. An diesem Punkt ist die PCR-Effizienz optimal und entspricht somit nahezu dem Faktor 2. Ein Crossing point (CP) wird an dieser Stelle von der Software berechnet. Nach welcher Zykluszahl dieser CP-Wert eintritt, ist abhängig vom Expressionslevel des Zielgens.

2. Material und Methoden

Somit kann nach der Relativierung mittels Referenzgenen in qBase das relative Expressionslevel ermittelt werden.

2.5.1. Primerdesign für qRT-PCR

Für ein optimales Primerdesign ist es wichtig, verschiedene Faktoren zu beachten: Das zu amplifizierende Fragment sollte eine Länge von 80-150bp besitzen. Das Fragment sollte dabei eine Exon/Exon-Grenze mit einem Intron überspannen, welches mindestens 500bp besitzt. So kann überprüft werden, ob die Ergebnisse durch Verunreinigung mit genomischer DNA verfälscht werden. Da in einem solchen Fall das Intron mit amplifiziert werden würde, würden sich die Fragmente in ihrer Länge deutlich unterscheiden. Eine optimale Primerlänge beträgt 20bp. Vor- und Rückwärtsprimer sollten einen ähnlichen GC-Gehalt aufweisen. Die Schmelzpunkte der Vor- und Rückwärtsprimer sollten bei 60°C liegen. In der *ENSEMBLE* Datenbank kann in die Primer-Entwurf-Software ‚Primer 3‘ die gewünschte Sequenz eingelesen werden und nach passenden Primern gesucht werden. In der *NCBI*-Datenbank muss mittels *BLAST* abgeglichen werden, ob es andere genomische DNA-Bereiche gibt, die durch die Primer amplifiziert werden könnten und die die qRT-PCR Ergebnisse verfälschen. In **Tabelle 2.14** sind alle benutzten Primer aufgelistet. Die Primerlösungen haben Stock-Konzentrationen von 100µM und werden in einer Konzentration von 3µM verwendet.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.14: Primersequenzen der verwendeten Gene für die qRT-PCR

Gen Symbol	Sequenz vorwärts 5'-3'	Sequenz rückwärts 5'-3'	Primernummer
Glycerinaldehyd-3- Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)	AGCCACATCG CTCAGACAC	GCCCAATACGACC AAATCC	5443 5444
Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)	GGTTTCCCATT CAAGACCTG	TGGTTTCCATGTC CATTGGT	2936 2937
Hydroxymethylbilansynt hase (HMBS)	CGCATCTGGA GTTCAGGAGTA	CCAGGATGATGGC ACTGA	5435 5436
β-Actin	TCCCTGGAGA AGAGCTACGA	AGGAAGGAAGGCT GGAAGAG	9340 9341
ATP11A	CGCTGCTGTTC TACGTTGTC	CGGCACAGGACTT TCTTGAG	0879 0880
ATP11B	AGCAGAACCA CTTGACAGGA	AGTCATTGGCAGC CTAGTGT	0882 0881

Um die PCR-Effizienz der Primer zu testen, wird eine Standardkurve (siehe **Kapitel 2.5.3**) angefertigt. Die Spezifität wird mittels Schmelzkurvenanalyse bestimmt (siehe **Kapitel 2.5.2**).

2.5.2. Durchführung der qRT-PCR

Zur Durchführung wird das QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Das Vorgehen erfolgt gemäß dem QuantiTect® SYBR® Green PCR Handbook. Die eingesetzten Volumina werden jedoch halbiert. Die Primer werden, wie in **Kapitel 2.5.2** beschrieben, verdünnt und daraufhin werden Vor- und Rückwärts Primer zu gleichen Teilen in einem Eppendorf Sammelröhrchen gemischt. In einer 384-Well Mikrotiterplatte (384 PCR-Platte, Treff Lab, CH) wird daraufhin der Mastermix vorgelegt (siehe **Tabelle 2.15**) Danach werden je 2µl Probe hinzu pipettiert, welche zuvor 1:20 verdünnt wurden. Das Reaktionsvolumen beträgt pro Well insgesamt 10µl.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.15: Pipettierschema Mastermix bei qRT-PCR

Mastermix	Eingesetztes Volumen pro Reaktion
RNAse free water	2µl
Primer (Vor-und Rückwärts)	1µl
QuantiTect SYBR Green	5µl

Jedes Zielgen wird in technischen Triplikaten gemessen. Auf jeder PCR-Platte werden außerdem eine Standardkurve (siehe **Kapitel 2.5.3.**) und pro Zielgen 2 Negativkontrollen mitgeführt. Eine RT-Kontrolle erkennt eine Kontamination mit genomischer DNA in der cDNA; eine ddH₂O-Kontrolle erkennt Kontamination bei den Chemikalien oder Primern. Nachdem die 384-Platte korrekt befüllt ist, wird sie mit einer Klebefolie (4ti-0560, Lot no 122822, Firma 4titude, Wotton, UK) verschlossen und bei 1000 *rpm* für 2 Minuten zentrifugiert. Daraufhin kann sie in das LightCycler®480 der Firma Roche eingelegt werden, und die Amplifikation wird gestartet.

Tabelle 2.16 zeigt das verwendete Programm.

Tabelle 2.16: qRT-PCR Programm

Programmname	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Dauer (HH:MM:SS)	Steigung (°C/s)	Akquisition
Denaturierung	1	95	00:15:00	4,6	-
Amplifikation	45	94	00:00:15	2,5	-
		58	00:00:30	2,4	-
		72	00:00:30	4,6	einmalig
Schmelzkurve	1	95	00:00:15	4,6	-
		65	00:00:20	2,4	-
		95	-	0,1	kontinuierlich
Kühlung	1	40	00:00:30	1,5	-

2. Material und Methoden

Die qRT-PCR eines Zielgens unterteilt sich in eine Hintergrundphase (hier wird amplifiziert, es kann aber keine Fluoreszenz, abgesehen von der Hintergrundfluoreszenz, gemessen werden), eine Exponentialphase (das Fluoreszenzsignal hebt sich gegen die Hintergrundfluoreszenz ab und steigt exponentiell an) sowie eine Plateauphase (da die Reaktionskomponenten limitiert sind). Wie schon oben erwähnt, wird die Mengenanalyse in der frühen Exponentialphase durchgeführt, nämlich genau an dem Punkt, an welchem sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrundsignal abhebt. Hierfür berechnet die LightCycler®480 Software mittels der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve einen Cp-Wert für jede Probe (siehe Light Cycler 480 Instrument - Operator's Manual Version 1.5). Je nachdem, wie viele Zyklen gebraucht werden um den Cp-Wert zu erreichen, gibt dies Aufschluss auf die Ausgangs cDNA-Menge.

Die abschließende Schmelzkurvenanalyse dient zur Kontrolle, ob ein spezifisches Produkt generiert wurde. Hierfür heizt der LightCycler ®480 auf 95°C. Während des Erhitzens wird kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur trennen sich die DNA-Stränge. Dadurch wird der SYBR Green-Farbstoff freigesetzt und kein Fluoreszenzsignal kann mehr gemessen werden. Daraufhin wird wieder auf 65°C gekühlt. Die LightCycler®480 Software erstellt anhand der gemessenen Signale ein Diagramm. Auf der X-Achse wird die Temperatur aufgetragen auf der Y-Achse die Änderung der relativen Fluoreszenz. Für jedes Produkt sollte sich eine spezifische Schmelzkurve ergeben. So kann auch nochmals die Spezifität der Primer kontrolliert werden. Falls eine Schmelzkurve in einer Probe von den restlichen abweicht, wird diese Probe aus der Auswertung ausgeschlossen. **Abbildung 2.12** zeigt beispielhaft eine Schmelzkurvenanalyse für die Standardkurven der Primer Etablierung für das *ATP11B-Gen*.

2. Material und Methoden

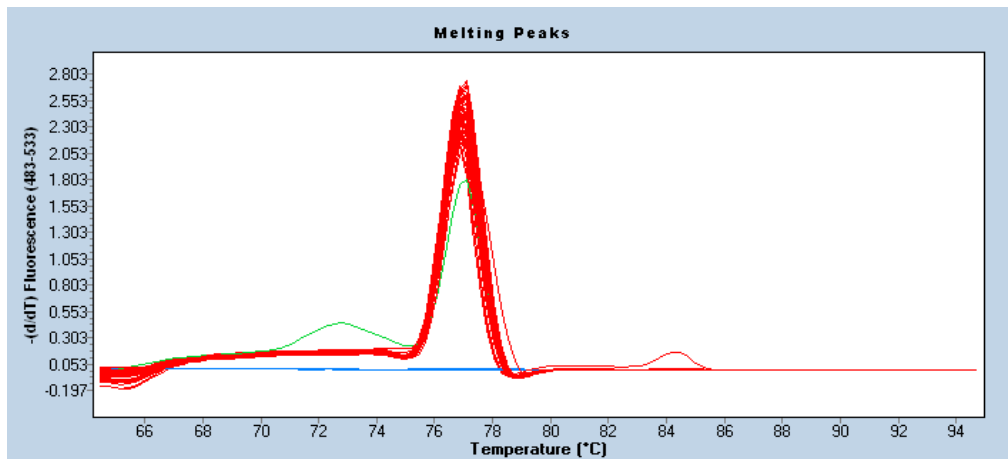


Abbildung 2.12: Schmelzkurvenanalyse für Primer Etablierung von *ATP11B* mittels Standardkurve. Rot gezeichnet sind die Standardverdünnungen, grün die RT⁻-Kontrolle.

2.5.3. Effizienzbestimmung mit Hilfe von Standardkurven

Da sich in der Exponentialphase die DNA-Fragmente theoretisch verdoppeln, sollte die Effizienz einer qRT-PCR 2 sein. In Wirklichkeit liegt sie jedoch etwas unter 2. Mit Hilfe der Standardkurve kann die Effizienz berechnet werden und somit die Eignung der Primer überprüft werden. Um eine Standardkurve zu generieren wird zunächst ein cDNA-Mix hergestellt. Dazu wird je 1 µl einer Probe verwendet. Daraus werden 1:5, 1:25, 1:125 sowie 1:625 Verdünnungen hergestellt. Diese Verdünnungen werden jeweils doppelt bestimmt. Daraus errechnet sich die Standardkurve. Die Steigung zeigt wie schnell die DNA mit der Zykluszahl zunimmt. Aus dem Anstieg der Kurve wird die Effizienz mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Anstieg})}$$

Die LightCycler®480 Software geht dabei nach Kriterien vor, welche in LightCycler®480 Instrument-Operator's Manual Version 5.1 beschrieben sind.

Abbildung 2.13 zeigt beispielhaft die Standardkurve für *ATP11B*. Mit einer Effizienz von 2,125 zeigt sie ein optimales Ergebnis.

2. Material und Methoden

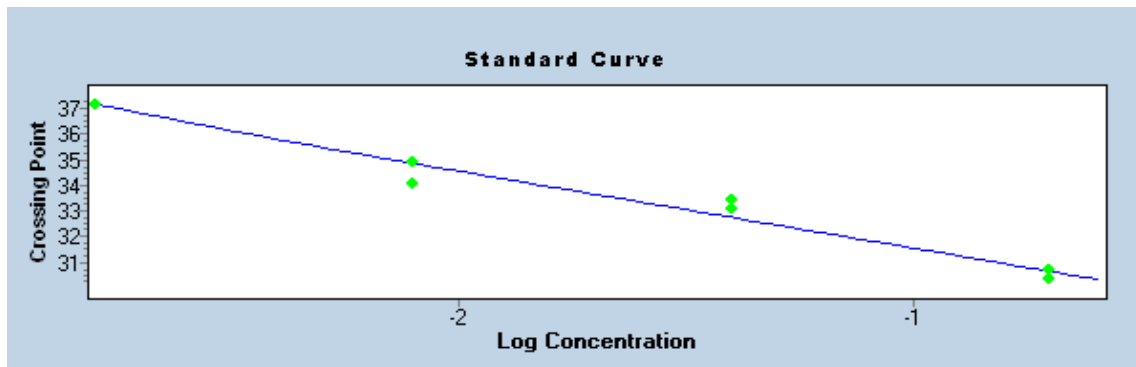


Abbildung 2.13: Standardkurve von *ATP11B* mit einer berechneten Effizienz von 2,152.

Nicht nur für die Etablierung der Primer, sondern auch auf jeder Platte, welche Probenmaterial enthält, wird eine Standardkurve mitgeführt, um mögliche Schwankungen einberechnen zu können.

2.5.4. Berechnung der relativen Expression von Genen

Um die Expressionslevel von *ATP11A* und *ATP11B* der platinresistenten und platin sensitiven Proben vergleichen zu können, müssen diese mit Referenzgenen normalisiert werden. Referenzgene sind Gene, welche über alle Genome hinweg stabil exprimiert werden. Um dennoch auszuschließen, dass auch Referenzgene in ihrer Expression schwanken, werden mehrere Referenzgene zur Normalisierung herangezogen und gemittelt. Diese Referenzgene werden mit den zu analysierenden Genen zusammen vermessen. Nachdem die LightCycler®480 Software für jede eingesetzte Probe einen Cp-Wert errechnet hat, wird dieser in qBase eingespeist.

Zunächst ermittelt der GeNorm Algorithmus der qBase Software einen M-Wert sowie einen CV-Wert für jedes eingesetzte Referenzgen. Der geringste M-Wert beziehungsweise CV-Wert zeichnet das stabilste Referenzgen aus. Des Weiteren kann eine Effizienzkorrektur in qBase vorgenommen werden, falls sich die Effizienten zwischen Referenzgen und Zielgen unterscheiden. Anschließend wird ein mittlerer Expressionsunterschied aus den Triplikaten der Proben ermittelt und mit Hilfe der Referenzgene normalisiert. Auch wird der Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) berechnet. Als Grundlage gilt folgende Formel (Paffel, 2001):

$$\text{Relative Expression} = \frac{\left(E_{\text{Zielgen}} \right)^{CP_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Experiment})}}{\left(E_{\text{Referenzgen}} \right)^{CP_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Experiment})}}$$

Die ermittelten Werte in qBase werden zur weiteren Auswertung in SPSS eingelesen. Für die relative Expression der Zelllinien, welche unterschiedlich resistent auf Platin sind, werden Korrelationen berechnet. Die platinresistenten und platin sensitiven Ovarialkarzinomproben werden einander gegenübergestellt und verglichen. Geeignete Tests zur Überprüfung der Signifikanz werden angewendet.

2.6. Statistik

In SPSS werden für alle Daten Deskriptive Statistiken erstellt. Des Weiteren werden die jeweiligen Daten auf Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk- und des Kolmogorov-Smirnov^aTests getestet. Zur Veranschaulichung werden Q-Q-Diagramme und Histogramme erstellt. Zur genaueren Analyse werden Box-Plots generiert. Sind die Daten normalverteilt und handelt es sich um zwei unabhängige Stichproben, wird auf Signifikanz mittels des T-Tests ($p < 0,05$) getestet. Sind die Daten nicht normalverteilt, wird die Signifikanz mittels Mann-Whitney U-Test ermittelt ($p < 0,05$).

Weiterführend wird mittels G*Power die Effektgröße berechnet, welche für ein signifikantes Ergebnis bei unserer Kohortengröße benötigt würde.

3. Ergebnisse

3.1. Entitäten und Klassifizierung der Tumorproben

Wie in **Kapitel 2.1.1** beschrieben, wurde für die Validierung der Ergebnisse des 450k-Arrays die Kohorte der Tumorproben erweitert. Für die Studie standen insgesamt 46 Tumore zur Verfügung, darunter 22 platinresistente und 24 platinsensitive Tumore. Durch die klar definierten Kriterien für die Tumorproben sowie die sorgfältige Auswahl können mögliche Störvariablen in der Auswertung vermieden werden. Dies ist eine wichtige Grundlage zur eindeutigen Interpretation der Ergebnisse.

3.1.1. Signatur und Eigenschaften der einzelnen Tumoren bei platinresistenten und sensitiven Tumorproben

In **Tabelle 3.1.** sind die platinresistenten Tumorproben aufgelistet, welche für die Studie neu gewonnen werden konnten. Die Tumornummer identifiziert die Tumorprobe (T steht hierbei für Tübingen) in der Tübinger Tumordatenbank. Des Weiteren wurden in **Tabelle 3.1.** folgende Variablen mit aufgenommen: Alter der Patientinnen bei OP (Alter bei OP), die Zeitspanne von der letzten Chemotherapiegabe bis zum Tumorprogress in Monaten (Progress), Ausbreitungsstadium (T-Stadium), Lymphknotenbefall (LK), Metastasen (M), Befall der Lymphbahnen (Lymph), Resektionsrand (Rand) sowie Dysplasiegrad (Grading). Eine Beschreibung der Variablen wird in **Kapitel 1.1.2.** und **Kapitel 1.1.1.** vorgenommen. In **Tabelle 3.1** steht ein X wenn keine Daten erhoben werden konnten. Dafür gibt es zwei Gründe: der begutachtende Pathologe konnte keine Aussage treffen, oder die Daten wurden nicht im Patientenverzeichnis gespeichert.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.1: Tumorkollektiv der platinresistenten Tumoren

Zusammenfassung: platinresistente Tumoren

	T-Nr.	Alter bei OP	Progress [Monate]	T- Stadium	LK	M	Lymphne	Rand	Grading
1	1565	61	4,01	3b	ja	ja	ja	<1cm	3
2	2081	59	4,04	3b	X	X	nein	X	3
3	2105	71	,00	3c	ja	X	nein	<0,5cm	2-3
4	2339	57	3,00	X	X	X	X	X	2-3
5	2441	61	,99	3b	ja	X	ja	X	3
6	2443	53	6,01	3c	nein	X	ja	X	3
7	2789	54	,99	3c	ja	X	nein	X	3
8	2792	59	3,02	3c	nein	X	ja	X	3
9	2808	70	,00	3c	nein	ja	X	<1cm	3
10	2926	67	,00	3c	ja	X	X	X	3
11	3063	52	5,95	3c	ja	ja	nein	X	2-3
12	3349	70	4,01	3c	ja	X	ja	<0,5cm	3
13	3363	65	7,00	3c	nein	X	nein	X	3
14	3764	45	4,01	3c	ja	X	ja	X	3

In **Tabelle 3.2** sind die platin sensitiven Tumorproben aufgelistet, welche für die Studie neu gewonnen werden konnten. Die Tumornummer identifiziert die Tumorprobe (T steht hierbei für Tübingen) in der Tübinger Tumordatenbank. **Tabelle 3.2** ist entsprechend der **Tabelle 3.1** aufgebaut.

3. Ergebnisse

Table 3.2: Tumorkollektiv der platinsensitiven Tumore

Zusammenfassung: platinsensitive Tumore

	T-Nr.	Alter bei Progress OP	Alter bei Progress [Monat]	T- Stadium	LK	M	Lymphe	Rand	Grade
1	1743	67	33,97	3c	nein	ja	ja	<1cm	2
2	1861	50	20,01	2c	nein	X	nein	X	2
3	1920	54	57,00	2c	nein	X	nein	R0	3
4	2001	42	48,95	3c	nein	X	ja	R0	3
5	2069	64	19,02	3c	nein	X	nein	X	2
6	2177	56	18,96	3b	nein	X	ja	<0,5cm	3
7	2292	44	25,99	3c	ja	X	ja	X	3
8	2393	66	28,02	3c	ja	X	nein	X	3
9	2445	77	19,02	3b	nein	X	nein	X	3
10	2488	46	17,02	3c	nein	X	nein	X	3
11	2511	64	49,02	3c	ja	X	nein	X	3
12	3304	45	31,05	3a	nein	X	nein	X	3
13	3331	60	20,99	3b	ja	X	nein	X	3
14	3488	50	21,03	3c	nein	X	nein	R0	3
15	3782	66	19,06	3c	nein	X	nein	X	3

3. Ergebnisse

3.2. Histologische Validierung und Qualitätskontrollen der Tumor RNA und DNA

Bei der Aufbereitung der Ovarialkarzinom Proben war es wichtig, eine hohe Qualität des Materials zu garantieren, um aussagekräftige Daten zu generieren.

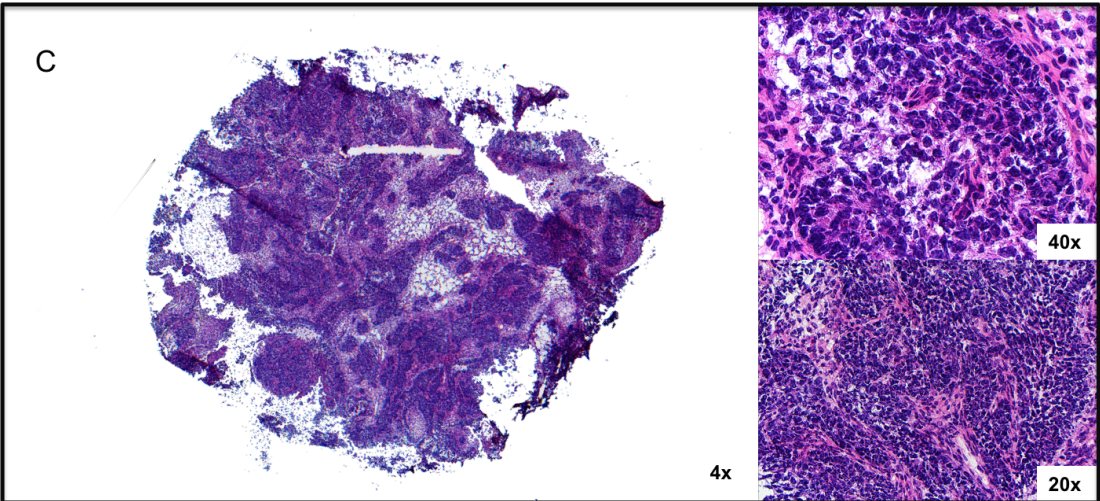
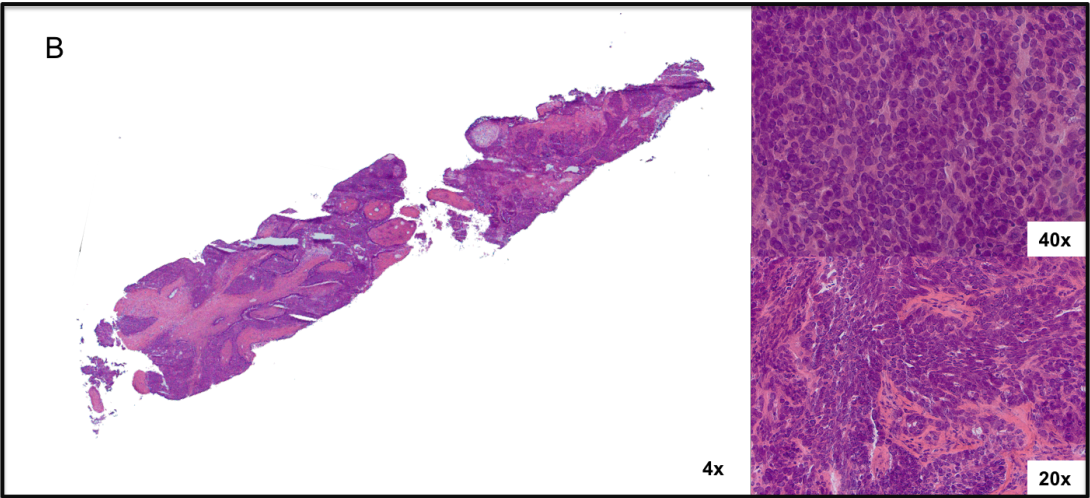
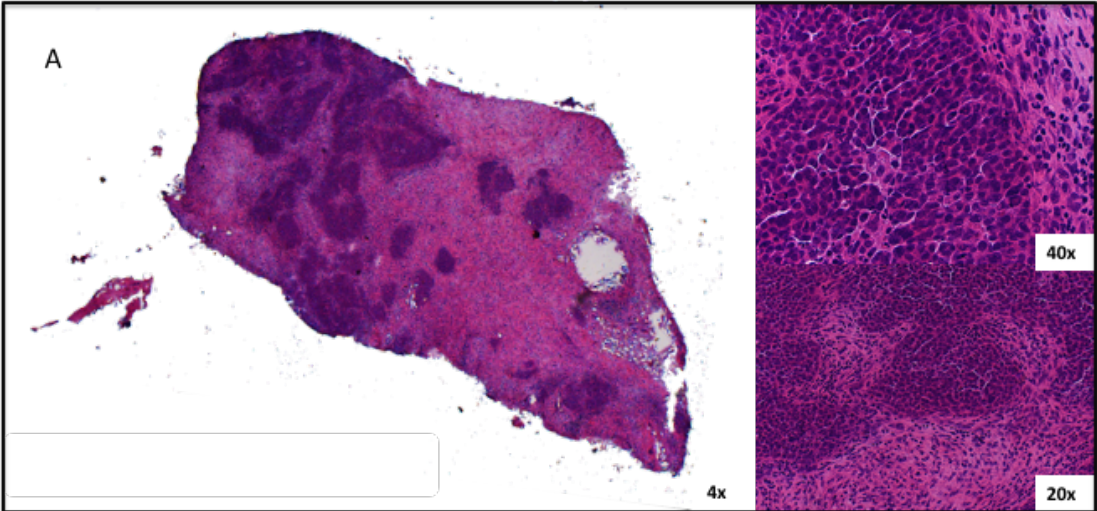
Für die Expressions- und Methylierungsanalysen wurde RNA und DNA aus den einzelnen Tumoren benötigt. Hierfür wurden zunächst Kryoschnitte von Tumorproben angefertigt und diese lichtmikroskopisch auf Tumorgehalt sowie Tumorentität untersucht (siehe **Kapitel 2.3.1.** und **2.3.2.**). Aus validiertem Tumormaterial wurde RNA und DNA isoliert (siehe **Kapitel 2.3.3.**). Die Quantitäten wurden anhand des NanoDrop[®] 1000 Spektrophotometer gemessen, die Qualitäten der RNA mittels des Agilent Bioanalyzer 2100 (siehe **Kapitel 2.3.4.** und **2.3.5.**) überprüft.

3.2.1. Kryoschnitte und HE-Färbungen aus stickstoffkonservierten Tumorproben

Wie in **Kapitel 2.3.1.** beschrieben, wurden von allen 46 Tumorproben Kryoschnitte angefertigt. Von jedem Tumor wurden 20 Schnitte mit einer Dicke von 10 µm generiert. Der erste sowie der letzte Schnitt wurden auf einem Objektträger fixiert und mittels einer H&E-Färbung angefärbt (siehe **Kapitel 2.3.2.**). Die Schnitte wurden durch das Pathologische Institut Tübingen, auf Tumorentität und Tumorgehalt validiert. Aufgrund der präzisen Vorauswahl der Tumore wurde uns bestätigt, dass es sich bei allen Tumoren um high-grade seröse Adenokarzinome handelte. Da die Tumorproben naturgemäß auch Nekrose und Fibrose enthalten, mussten in manchen Fällen erneut Kryoschnitte angefertigt werden, da zu wenige Tumorzellen in den Schnitten vorlagen. Es wurden nur Kryoschnitte verwendet, bei denen mehr als 60% Tumormaterial enthalten war.

Abbildung 3.1.A-F zeigt H&E gefärbte Schnitte in unterschiedlicher Vergrößerung (4x, 20x, 40x) sowie unterschiedlichem Tumorgehalt (A 60%, B 70%, C 70%, D 80%, E 90%, F 90%)

3. Ergebnisse



3. Ergebnisse

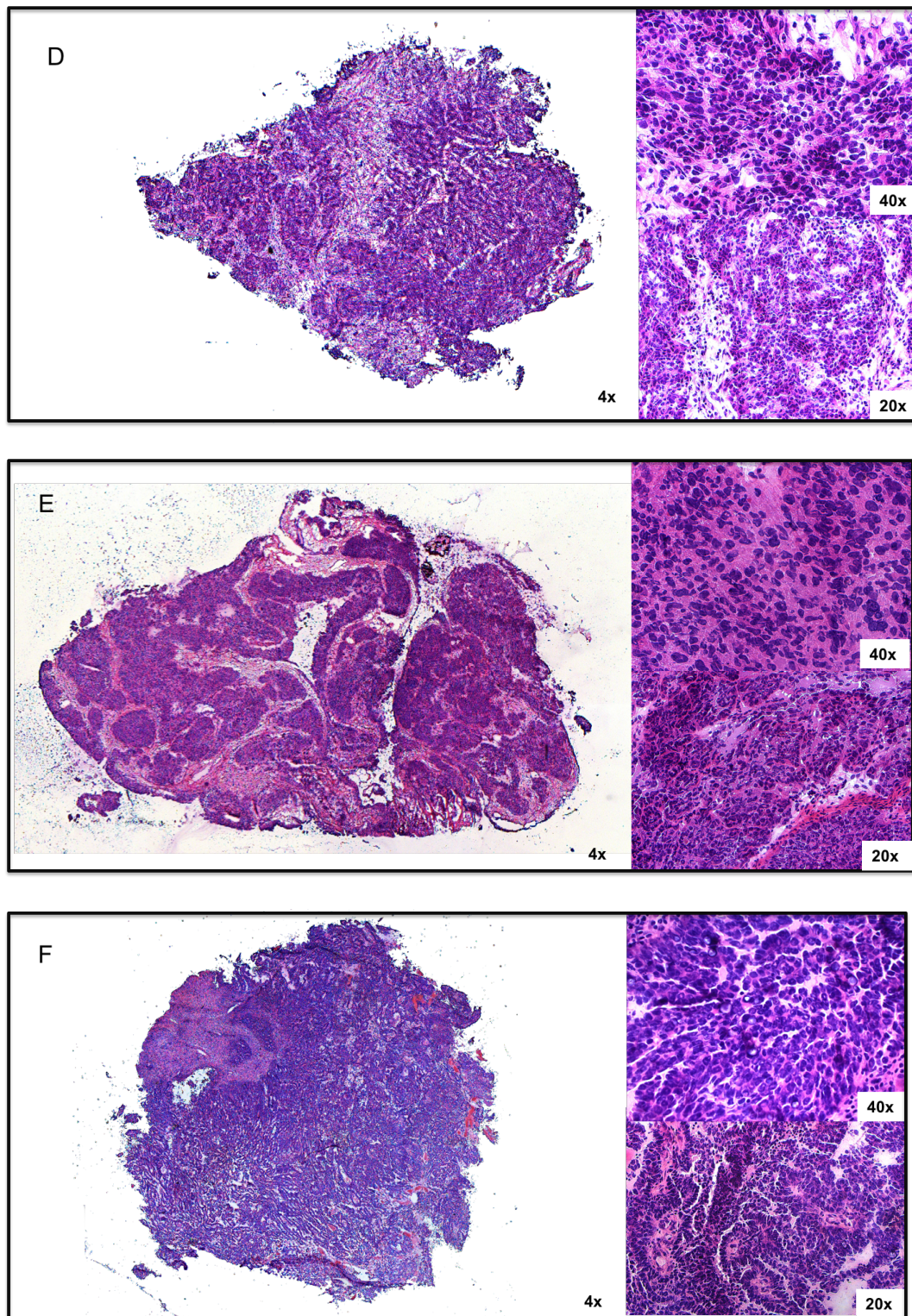


Abbildung 3.1: Beispielhaft gezeigte H&E-Färbungen von high-grade serösen Tumorproben

fotografiert mit Axioplan 2 imaging. Alle Tumore gezeigt in 4x, 20x, und 40x Vergrößerung. A Tumorprobe T848 mit Tumoranteil von 60%. B Tumorprobe T2177 mit Tumoranteil von 70%. C Tumorprobe mit Tumoranteil von 70%. D Tumorprobe T865 mit Tumoranteil von 80%. E Tumorprobe T717 mit Tumoranteil von 90%. F Tumorprobe T649 mit Tumoranteil von 90%.

3. Ergebnisse

3.2.2. Quantität- und Qualitätskontrollen von isolierter Tumor DNA & mRNA mittels Agilent Bioanalyzer 2100 und NanoDrop[®] Spektrophotometer

Aus Kryoschnitten, welche nicht für die Validierung benötigt wurden, wurden RNA und DNA isoliert (siehe **Kapitel 2.3.3.**). Mit Hilfe des NanoDrop[®] ND-1000 Spektrophotometers wurden die isolierten Mengen (RNA/DNA) ermittelt wobei auch die Qualität der RNA und DNA eingeschätzt werden kann (siehe **Kapitel 2.3.4.**). Da die Qualität der mRNA einen markanten Einfluss auf die Richtigkeit der qPCR-Ergebnisse hat, wurde die Qualität der mRNA nochmals mittels des Agilent Bioanalyzer 2100 gemessen (siehe **Kapitel 2.3.5.**).

In **Tabelle 3.3** sind die einzelnen platinresistenten Tumore der Studie erfasst, sowie deren jeweilige Qualität und Quantität. In **Tabelle 3.4** werden die einzelnen platinsensitiven Tumore der Studie aufgelistet, sowie deren jeweiligen Qualität und Quantität. **Tabelle 3.3** und **Tabelle 3.4** zeigen für jede Tumorprobe den Tumorgehalt der Kryoschnitte, die Menge der daraus isolierten RNA und DNA [ng/μl], welche mit dem NanoDrop[®] ND-1000 Spektrophotometers gemessen wurde sowie den RIN-Wert, welcher vom Agilent Bioanalyzer 2100 errechnet wurde, und eine objektivierte Einschätzung über die RNA-Qualität gibt. In unserer Studie erhielten alle RNA-Tumorproben RIN-Werte >5. Einzig die Tumorprobe T848_1 wies einen RIN-Wert von 4,9 auf. Dieser Wert wurde für unsere Studie toleriert, da kein weiteres Tumormaterial dieses Tumors vorhanden war.

In

Abbildung 3.2 B werden die Screenshots von T649 sowie T2792 der Nanotrop Messungen gezeigt. Beispielhaft ist in

Abbildung 3.2 A eine Visualisierung durch den Agilent Bioanalyzer 2100 für die Tumorproben T3304 sowie T3349 dargestellt. Dabei stellt die X-Achse eine Zeitachse dar, welche den Probeneintritt in den Injektionskanal anzeigt. Die Y-Achse zeigt die Intensität des detektierten Fluoreszenz Signals, welches Rückschlüsse auf die Probenkonzentration gibt. Die Fluoreszenz Peaks entsprechen den ribosomalen-RNA-Banden in dem visualisierten Gelbild (rechts). In der Visualisierung sollte der 18S Peak der rRNA mit dem 28S Peak der rRNA, bei größtmöglicher Qualität, ein Verhältnis von 2:3 aufweisen.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.3: *Qualität- und Quantitätsmerkmale der 22 platinresistenten Tumorproben*

Tumornummer	Tumoranteil Cryoschnitt (%)	DNA Menge (ng/μl)	RNA Menge (ng/μl)	RNA Integrity Number
T2808	80	157,56	662,4	7,1
T2339	80	60,7	347,69	7,9
T2081	70	56,75	212,67	5,1
T2443	90	93,5	447,81	7,4
T3349	90	95,46	585,73	8,2
T2926	90	98,76	1453,36	7,5
T3363	90	47,81	379,69	8,4
T2105	60	55,39	98,31	6,6
T2441	70	35,02	335,61	7,1
T3764	70	74,87	732,78	8,3
T1565	70	59,87	773,74	9,1
T3063	70	53,12	306,65	6,9
T2789	60	49,31	278,46	8,6
T2792	80-90	73,68	335,7	8
T167	70-80	38,16	83,54	7,2
T463_2	90	51,18	273	8,6
T649	90	213,46	1072,7	9,3
T663_2	80	22,73	93,44	7,8
T717_1	90	28,96	123,33	8
T860_1	80-90	24,59	81,84	6,2
T865	80	85,31	701,66	9,2
T1196_1	80	33	244	7,3
Mittelwert:	79,3			7,7

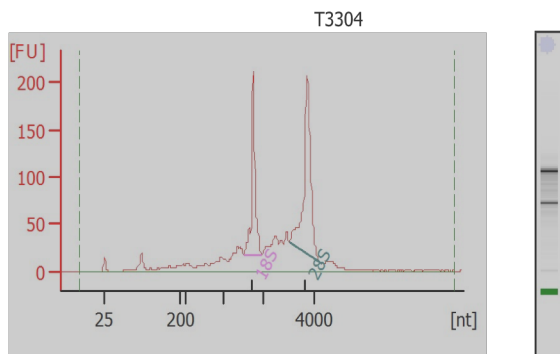
3. Ergebnisse

Tabelle 3.4: Qualität und Quantitätsmerkmale der 24 platinsensitiven Tumore

Tumornummer	Tumoranteil Cryoschnitt (%)	DNA Menge (ng/µl)	RNA Menge (ng/µl)	RNA Integrity Number
T270_1	90	31,15	51,62	8,9
T377_1	80	82,01	158,25	8,3
T402	70-80	32,23	27,29	8,7
T436	80	33,47	47,39	8,2
T450_1	50	31,65	137,61	7,8
T619	70	24,68	125,58	7,9
T761	90	134,07	1044,31	8,9
T813	80-90	26,43	35,27	6,9
T848_1	60	26,44	26,05	4,9
T2488	90	69,75	271,06	8,2
T2177	70	40,2	303,55	7,5
T2445	80	37,46	273,97	5,6
T2291	100	74,05	994,1	7
T2393	80	45,47	325,02	7,3
T3304	70	75,53	553,3	8,3
T2511	80	153,27	1586,35	8,6
T2069	60	90,87	1964,06	8,8
T1861	60-80	53,71	708,93	8,40
T2001	70	40,73	92,14	8,1
T1920	90	33,95	437,56	8,30
T1743	80	64,67	419,42	8,6
T3782	70	180,32	780,34	8,9
T3331	60	129,96	720,29	9,2
T3488	50	105,56	510,19	9,1
Mittelwert:	75			8,0

3. Ergebnisse

A

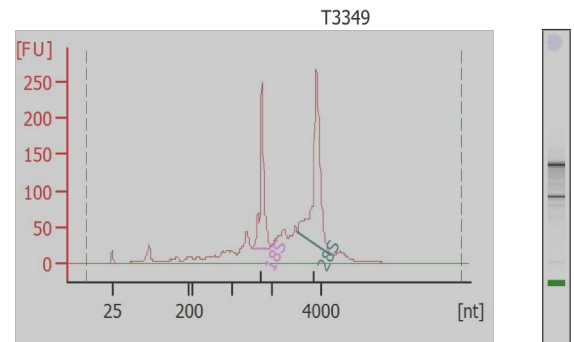


Overall Results for sample 7 : T3304

RNA Area: 1.567,3
 RNA Concentration: 1.171 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1,6
 RNA Integrity Number (RIN): 8.3 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 8.30

Fragment table for sample 7 : T3304

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.502	1.952	242,0	15,4
28S	3.043	4.299	395,7	25,2



Overall Results for sample 6 : T3349

RNA Area: 2.007,5
 RNA Concentration: 1.500 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1,6
 RNA Integrity Number (RIN): 8.2 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 8.20

Fragment table for sample 6 : T3349

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1.515	1.972	302,0	15,0
28S	3.026	4.337	498,1	24,8

B

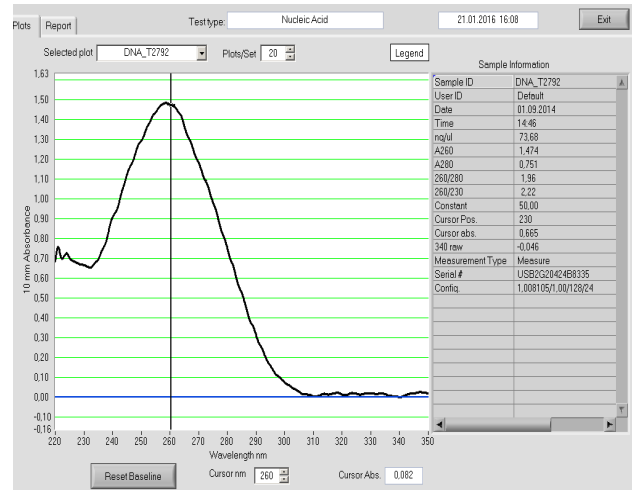
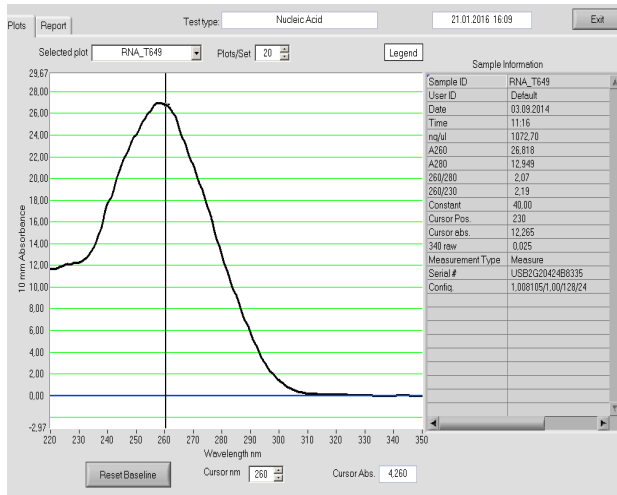


Abbildung 3.2: NanoDrop- & Agilent-Messungen zur Qualität und Quantitätssicherung

A Zeigt beispielhaft das Elektropherogramm (links) und Gelbild (rechts) der RNA Qualitätskontrolle der Tumprobe T3304 und T3349 errechnet, und visualisiert durch den Agilent Bioanalyzer 2100. T3304 hat einen errechneten RIN Wert von 8,3, T3349 einen RIN Wert von 8,2. B Zeigt beispielhaft das Ergebnis der Quantitätsmessung von T649 (RNA) und T2792 (DNA) durch das NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer. Für T649 beträgt die RNA Menge 1072,70 ng/µl, die A260/280 Ratio liegt bei 2,07, die A260/230 Ratio bei 2,19. Für T2792 beträgt die DNA Menge 73,68 ng/µl, die A260/280 Ratio liegt bei 1,96, die A260/230 Ratio bei 2,22.

3. Ergebnisse

3.3. Bisulfitkonvertierung und Polymerase Kettenreaktion mit biotinylierten Primern zur Vorbereitung des Pyrosequencing

Um eine möglichst genaue Validierung garantieren zu können, wurden von allen 46 Tumorproben zwei unabhängige Bisulfitbehandlungen angefertigt (siehe **Kapitel 2.4.1.**). Mittels biotinylierter Primer folgte die Amplifizierung der zu untersuchenden *cg21570597*-Site (siehe **Kapitel 2.4.3.**). Um die Effektivität der Amplifizierung zu überprüfen, wurden eine Gelelektrophorese der Proben auf einem 2% Agarosegel durchgeführt (siehe **Kapitel 2.4.4.**). Nach Angaben von Qiagen war das zu erwartende Produkt ca. 200bp groß.

3.3.1. Genamplifizierung der Tumorproben und dessen Erfolgskontrolle mittels Agarosegelen

Von jeder der zwei Bisulfitkonvertierungen einer Tumorprobe wurden zwei PyroMark Sequenzierungen durchgeführt (siehe **Kapitel 2.4.8.**). Da die amplifizierten Proben für die Sequenzierung gepoolt werden mussten (siehe **Kapitel 2.4.7.**), wurden schlussendlich von jeder Probe acht Amplifizierungen angefertigt und man erhielt 4 unabhängige PyroMark Sequenzierungen. Insgesamt wurden für diese Probenanzahl 5 Amplifizierungsdurchläufe durchgeführt. Das Protokoll ist in **Kapitel 2.4.3** einsehbar.

Da die biotinylierten Primer nur an Bisulfit behandelte DNA binden dürfen, wurden von jedem Tumor nicht Bisulfit behandelte Kontrollen amplifiziert. In der Gelelektrophorese sollte hier kein Produkt sichtbar sein.

In **Abbildung 3.3** ist ein repräsentatives 2% Ethidiumbromid-Agarosegel abgebildet. Darauf wird sichtbar, dass während der Amplifizierung der bisulfitkonvertierten Tumorproben nicht 1 Produkt, wie gewünscht entsteht, sondern mehrere. Der Hauptpeak ist wie erwartet bei 200bp. Durch Optimierung der PCR und die Entwicklung neuer Primer durch die Firma Qiagen konnten die Ergebnisse verbessert werden. Ausschlaggebend ist, ob die Produkte mittels Pyrosequencing spezifisch sequenziert werden können. Aus **Tabelle 3.5** kann entnommen werden, in welche Tasche im Agarosegel die jeweiligen Tumorproben aufgetragen wurden. B1 steht dabei für Tumorproben, welche zusammen in einem ersten Durchlauf bisulfitkonvertiert wurden. B2 steht für Tumorproben, die zusammen in einem zweiten

3. Ergebnisse

unabhängigen Durchlauf bisulfitkonvertiert wurden. Lad steht für Längenleiter. Diese dient zur Fragmentlängenbestimmung. K steht für nicht bisulfitkonvertierte Tumorproben. Wie in **Abbildung 3.3** auf Position A7 & A12 auffällt, sind auch bei diesen nicht bisulfitkonvertierten Tumorproben Banden zu sehen.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.5: Positionierung der Tumorproben im 2% Agarosegel

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A lad	B1_	B1_	K_	B2_	B2_	K_	B1_	B1_	B2_	B2_	K_	B1_	B1_	K_	B1_	B1_	K_	B1_	lad	
	2443	2443	2443	3063	3063	3063	1565	1565	1565	1565	1565	3349	3349	3349	167	167	B167	270		
B lad	B1_	K_	B1_	B1_	K_	B1_	B1_	K_	B1_	B1_	K_	B1_	B1_	K_	B1_	B1_	B1_	B1_	lad	
	270	270	2926	2926	2926	663	663	663	1196	1196	1196	3363	3363	3363	717	717	717	2105		
C lad	B1_	K_	B1_	B1_	B1_	B2_	B2_	K_	B1_	B1_	K_	B2_	B2_	K_	B1_	B1_	K_	o	lad	
	2105	2105	860	860	860	2488	2488	2488	463	463	463	2393	2393	2393	649	649	649	%		
D lead	o	30	30	70	70	100%	100%	lad												
	%	%	%	%	%	Meth	Meth													
	Meth	Meth	Meth	Meth	Meth															

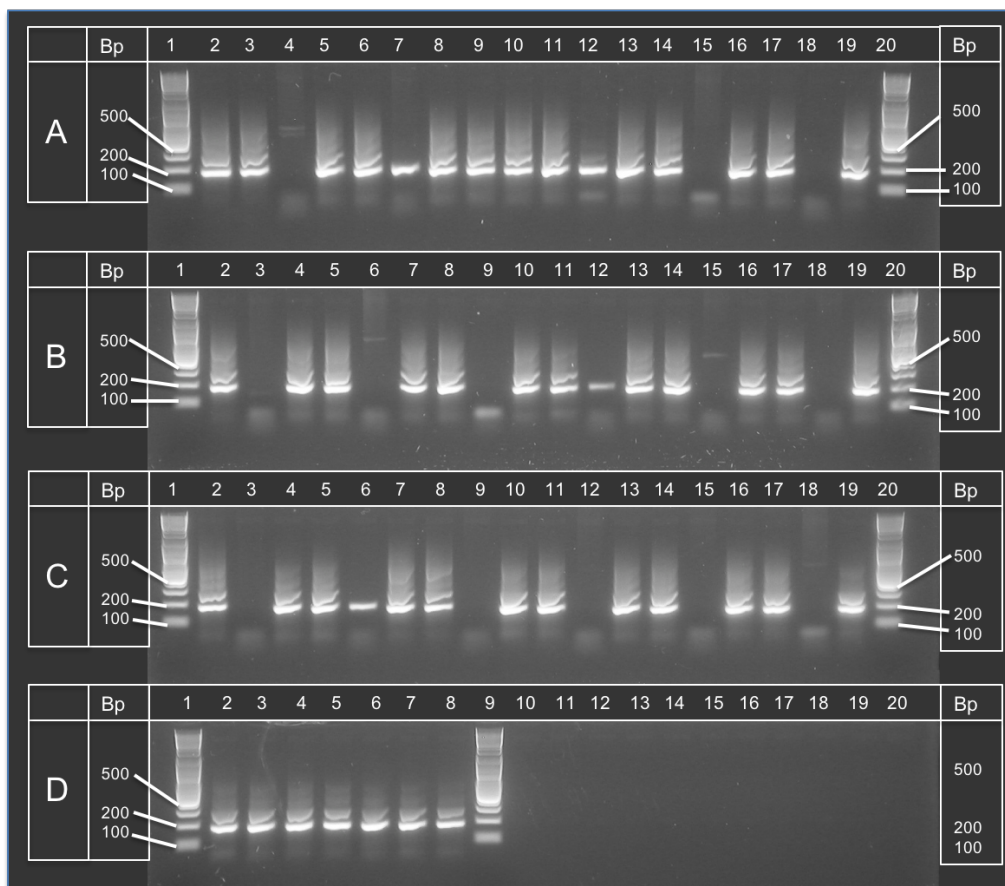


Abbildung 3.3: 2% Agarosegele von Tumorproben nach Amplifizierung mittels biotinylierten Primern

3. Ergebnisse

3.4. Methylierungsanalysen der 46 Ovarialkarzinome mittels Pyrosequencing

Mit den amplifizierten Proben wurden Methylierungsanalysen mittels Pyrosequencing durchgeführt. Diese Technik ermöglicht quantitative Aussagen über ein Methylierungslevel (siehe **Kapitel 2.4.9.**), und ist somit für die Validierung unserer Vorergebnisse des 450k-Array geeignet. Für die Analysen wurden jeweils zwei Proben des gleichen Tumors gepoolt. Mittels der Vacuum Workstation wurden die biotinylierten DNA Stränge isoliert und der Sequencingprimer angelagert (siehe **Kapitel 2.4.6.**). Daraufhin konnte mit Hilfe des PyroMarks Q96 ID die Sequenzierung erfolgen und das Methylierungslevel der *cg21570597*-Site ermittelt werden (siehe **Kapitel 2.4.7.**). Es folgte eine genaue Analyse der Methylierungslevel und eine Gegenüberstellung der Methylierungslevel von sensitiven versus resistenten Tumorproben in SPSS.

3.4.1. Qualitätsüberprüfung des Assays

Um zu prüfen, ob der PyroMark Q96 ID und die von Qiagen designten Primer (siehe **Kapitel 2.4.2.**) einwandfrei arbeiten, wurde zunächst ein Control Oligo zusammen mit Leerproben sowie bisulfitkonvertierter und amplifizierter Kontroll-DNA sequenziert (siehe **Kapitel 2.4.8.**). Das Control Oligo, die Kontroll DNA sowie die Leerproben wurden richtig erkannt und sequenziert. Dies soll das korrekte Arbeiten der Vacuum Workstation und des PyroMark Q96 ID garantieren.

Das Protokoll für die Sequenzierung der Tumorproben wurde in Zusammenarbeit mit dem Technical-Support der Firma Qiagen modifiziert. Mit der Verlängerung der Annealing Zeit für den Sequenzierprimer und dem zusammenmischen der amplifizierten Proben (siehe **Kapitel 2.4.6**) konnten korrekte Ergebnisse für bisulfitkonvertierte und amplifizierte DNA erzielt werden.

Um alle Ovarialkarzinom Proben zu messen, wurden vier Sequenzierungsdurchläufe benötigt (siehe **Kapitel 2.4.7**). Bei jedem Sequenzierungsdurchlauf führten wir Methylierungskontrollen mit, welche ein uns bekanntes Methylierungslevel aufwiesen (0%, 30%, 70%, 100%) (siehe **Kapitel 2.4.8.**). Die Methylierungskontrollen stimmen mit den erwarteten Methylierungslevel überein. Die Mittelwerte sind für die Methylierungslevel (0%, 30%, 70%, 100%) wie folgt: 6%, 27,8%, 64%, 92,1%. Die maximale Abweichung vom Ziellevel beträgt höchstens 16% Punkte. Dies bestätigt

3. Ergebnisse

nochmals die korrekte Funktion des T100 Thermal Cycler, der Vacuum Work Station sowie des PyroMark Q96 ID.

Es wurde in jeder Sequenzierung eine Kontrolle programmiert, um die Proben auf vollständige Bisulfitkonvertierung zu überprüfen (siehe **Kapitel 2.4.8.**). In allen Tumorproben war die Bisulfitkonvertierung vollständig erfolgt.

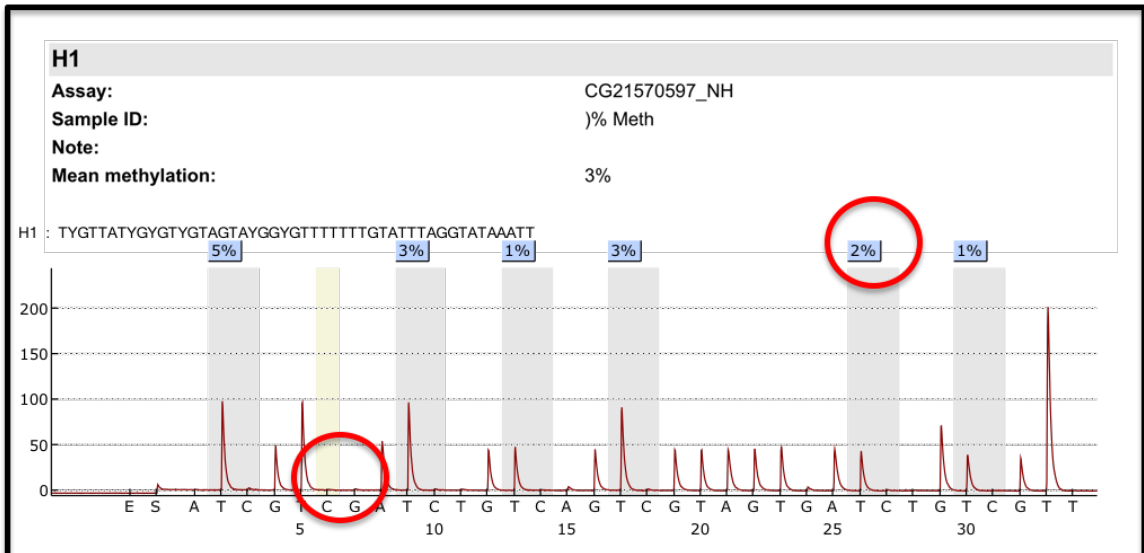
Auch die nicht bisulfitkonvertierten Tumorproben wurden innerhalb der vier Sequenzierungsdurchläufe gemessen. Wie erwartet, konnten diese Tumorproben nicht sequenziert werden, wenn im Agarosegel keine Kontamination sichtbar war.

Insgesamt wurde von jeder unserer 46 Tumorproben 4 Methylierungsanalysen generiert, je zwei von einer Bisulfitkonvertierung. Damit kann eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden.

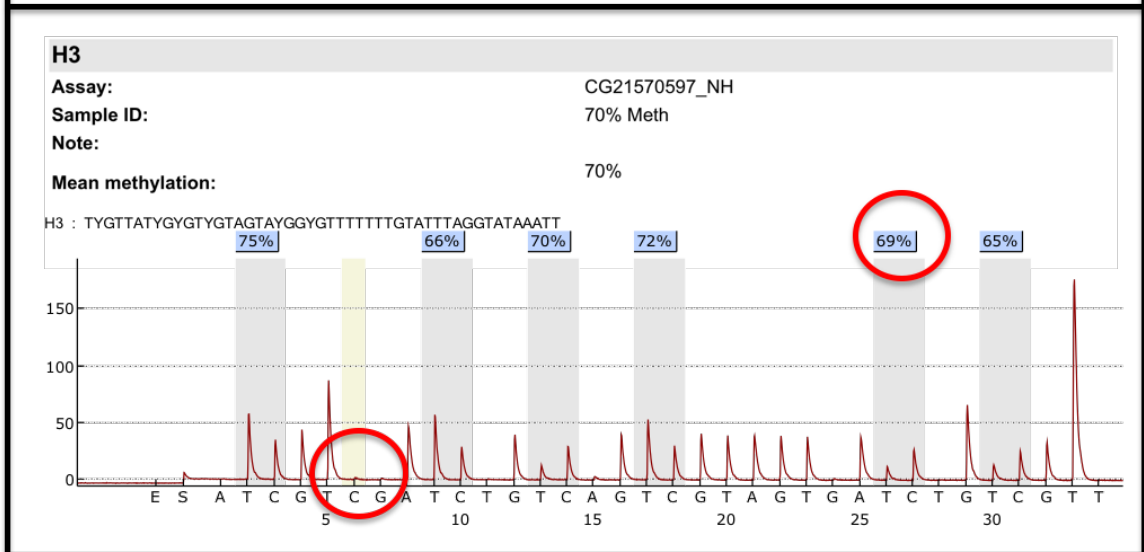
In **Abbildung 3.4** werden beispielhaft Pyrogramme gezeigt, welche der Pyromark Q96 ID nach der Sequenzierung für jede einzelne Probe generiert. Hier wird die Höhe des Lichtpeaks für jede einzelne Base aufgezeigt. Die Höhe der Lichtpeaks der einzelnen Basen wird von der Software mit den zu erwartenden abgeglichen. Die Methylierungslevel werden blau angezeigt, wenn die Sequenzierung erfolgreich war (siehe **Kapitel 2.4.9**). Zusätzlich angegeben wird die sequenzierte Sequenz, die Methylierungslevel für die einzelnen CpG-Sites und das mittlere Methylierungslevel aller CpG-Sites. Rot umrandet ist in **Abbildung 3.4** das Methylierungslevel der cg21570597-Site, welche validiert wird. Des Weiteren ist die Bisulfitkonvertierungskontrolle markiert. In den Pyrogrammen ist kein Peak am markierten Cytosin nachweisbar. Dies spricht für eine komplett abgelaufene Bisulfitkonvertierung.

3. Ergebnisse

A



B



3. Ergebnisse

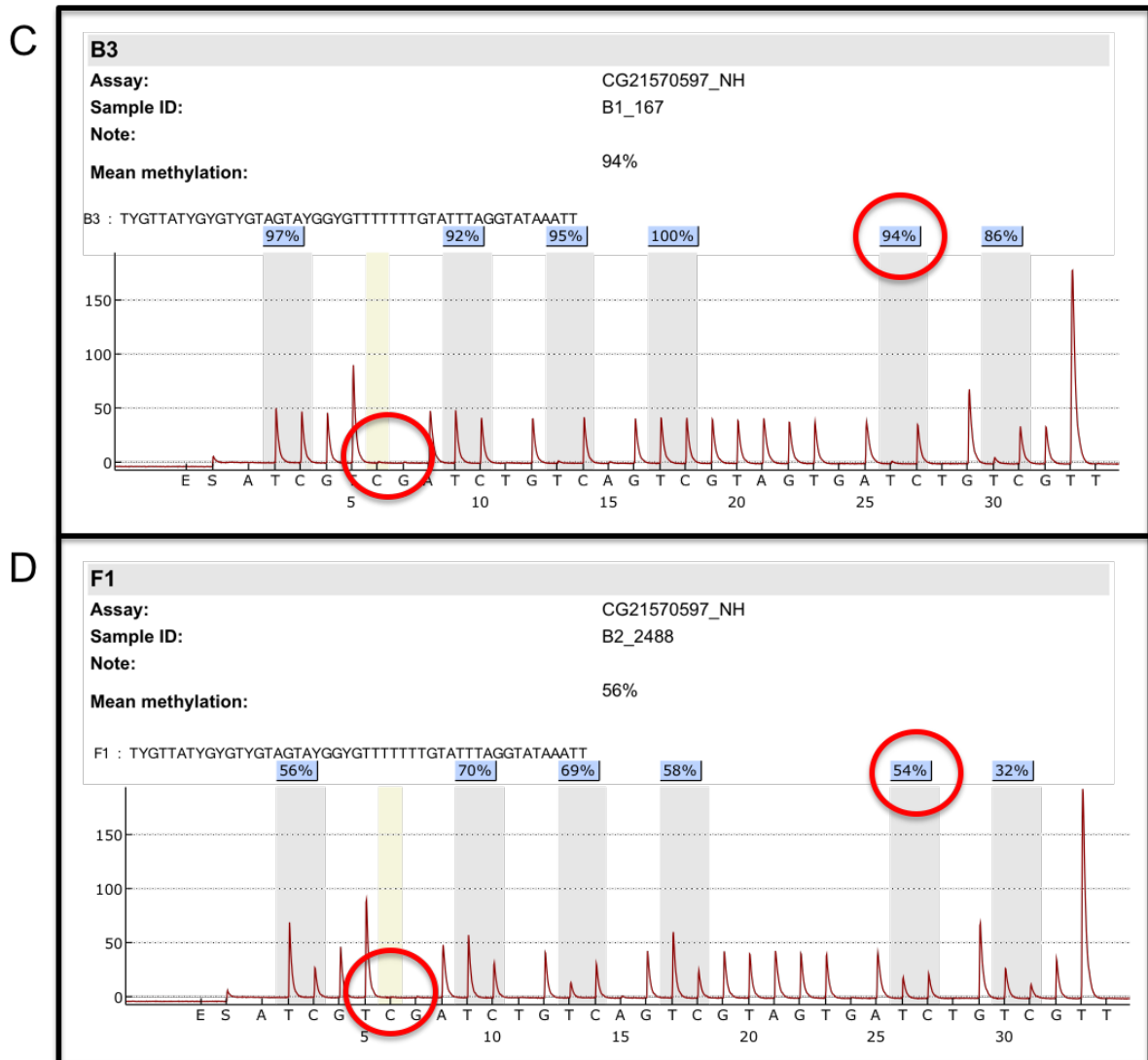


Abbildung 3.4: Beispielhafte Histogramme der PyroMark Sequenzierung.

Die Software des PyroMark Q96 ID erstellt nach erfolgter Sequenzierung für jede Tumorprobe ein Pyrogramm. Gezeigt wird Höhe des Lichtpeaks für jede einzelne Base. Zusätzlich angegeben werden die sequenzierte Sequenz, die Methylierungslevel für die einzelnen CpG-Sites und das mittlere Methylierungslevel. Die Höhe der Lichtpeaks der einzelnen Basen wird von der Software mit den zu erwartenden abgeglichen. Blau angezeigt werden Methylierungslevel wenn die Sequenzierung erfolgreich war. Rot markiert ist das Methylierungslevel der cg21570597-Site, welche validiert wird. Des Weiteren ist die Bisulfitkonvertierungskontrolle markiert. A Methylierungskontrolle mit 0% Methylierung zeigt ein Methylierungslevel von durchschnittlich 3% B Methylierungskontrolle mit 70% Methylierung zeigt ein Methylierungslevel von durchschnittlich 70% C Tumor T167 zeigt an CpG-Site5 (cg21570597) ein Methylierungslevel von 94% D Tumor T 2488 zeigt an CpG-Site5 (cg21570597) ein Methylierungslevel von 54%.

3. Ergebnisse

3.4.2. Methylierungslevel von platinresistenten versus platin sensitiven Ovarialkarzinomen

Die Methylierungslevel der 5. CpG-Site (*cg21570597*) wurden aus den Rohdaten ausgelesen und mit SPSS ausgewertet (siehe Kapitel 2.4.9.). Die 4 Messungen einer Tumorprobe wurden einander gegenübergestellt, um so die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Im Gegensatz zu dem 450k-Array kann kein Unterschied in den Methylierungsleveln zwischen resistenten und sensitiven Tumoren detektiert werden. Resistente Tumore haben im Mittel ein Methylierungslevel von 84,6%, sensitive Tumore im Mittel ein Methylierungslevel von 89%. **Tabelle 3.6** zeigt eine deskriptive Statistik bei sensitiven und resistenten Ovarialkarzinomen, wobei sie getrennt voneinander betrachtet werden.

Tabelle 3.6: Deskriptive Statistik von Methylierungsleveln [%] bei platinresistenten und platin sensitiven Tumoren

Statistiken ^a		
Methylierungslevel [%]		
N	Gültig	22
	Fehlend	0
Mittelwert		84,6441
Standardfehler des Mittelwertes		5,48986
Median		96,2500
Standardabweichung		25,74972
Schiefe		-2,150
Standardfehler der Schiefe		,491
Kurtosis		3,567
Standardfehler der Kurtosis		,953
Minimum		8,25
Maximum		98,50
Perzentile	25	91,7500
	50	96,2500
	75	96,6900

a. Ausprägung = resistent

Statistiken ^a		
Methylierungslevel [%]		
N	Gültig	24
	Fehlend	0
Mittelwert		89,4375
Standardfehler des Mittelwertes		2,96306
Median		95,5000
Standardabweichung		14,51597
Schiefe		-2,429
Standardfehler der Schiefe		,472
Kurtosis		5,138
Standardfehler der Kurtosis		,918
Minimum		46,50
Maximum		97,25
Perzentile	25	90,5000
	50	95,5000
	75	96,6250

a. Ausprägung = sensitiv

3. Ergebnisse

Abbildung 3.5 C&D zeigen die Methylierungslevel der resistenten und sensitiven Tumore im Vergleich. Im Boxplot (**Abbildung 3.5 C**) wird gezeigt, dass 39 Tumore der 46 Ovarialkarzinome zwischen 80%-100% methyliert sind. 4 resistente Tumore und 3 sensitive zeigen Methylierungslevel unter 70%. Die Daten zeigen keine Normalverteilung (Shapiro-Wilk 0,000; Kolmogorov-Smirnov^a 0,00). **Abbildung 3.5 A** zeigt das zugehörige Histogramm und **Abbildung 3.5.B** das Q-Q-Diagramm für die Methylierungslevel [%]. Da keine Normalverteilung der Daten vorliegt und diese intervallskaliert sind, führten wir mittels SPSS den Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben durch. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,445$) im Methylierungslevel zwischen resistenten und sensitiven Ovarialkarzinomen.

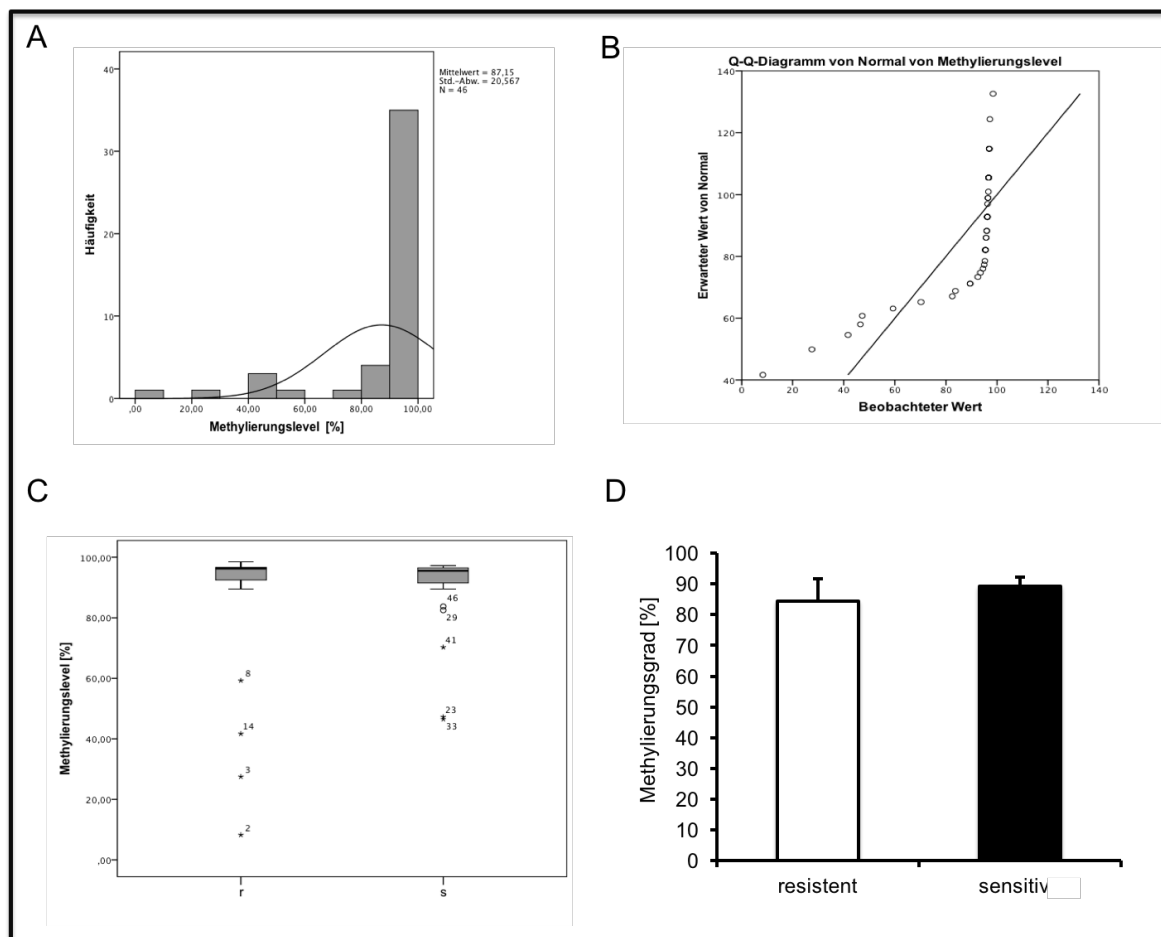


Abbildung 3.5: Methylierungslevel von platin sensitiven versus platinresistenten Proben

Bisulfit-behandelte Tumorproben wurden mittels biotinylierten Primern amplifiziert, auf 2% Agarosegele zur Kontrolle aufgetragen und anschließend mittels Pyrosequencing auf Methylierungslevel der cg21570597-Site untersucht. In SPSS wurden die Daten ausgewertet. A zeigt das zugehörige Histogramm mit Gaußscher Verteilungskurve B das errechnete Q-Q Diagramm C Boxplot von resistenten versus sensitiven Ovarialkarzinomen D Balkendiagramm resistente und sensitive Ovarialkarzinome im Vergleich.

3. Ergebnisse

In **Tabelle 3.7.** werden die Methylierungslevel (%) aller 46 Tumorproben aufgelistet. Hierbei werden die Mittelwerte (%) angegeben, welche sich aus den 4 PyroMark Sequenzierungen für eine Tumorprobe errechnet haben. Des Weiteren wird die maximale Differenz (Max Differenz (%)) gezeigt, um welche sich die einzelnen PyroMark Sequenzierungen einer einzelnen Tumorprobe maximal unterscheiden. Auch wird die Standardabweichung des Mittelwertes (STABW) angegeben. Die einzelnen Methylierungslevel einer Tumorprobe unterscheiden sich im Mittel um 3% Punkte und haben eine durchschnittliche Standardabweichung von 1,18. Die größte Differenz der Methylierungslevel liegt bei 20% Punkten bei Tumor T2443 mit einer Standardabweichung von 8,83. Die geringste Differenz der Methylierungslevel liegt bei 0% bei Tumor T436 sowie T3304 und T2792. Diese Tumore haben folglich eine Standardabweichung von 0.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.7: Methylierungslevel der einzelnen Tumore

Platin-resistente Tumore				Platin-sensitive Tumore			
T-Nummer	Mittelwert (%)	Max Differenz (%)	STABW	T-Nummer	Mittelwert (%)	Max Differenz (%)	STABW
T2808	96,75	1,00	0,50	T270_1	45,40	14,00	5,03
T2339	96,25	1,00	0,50	T377_1	89,50	4,00	1,73
T2081	96,25	1,00	0,50	T402	96,25	1,00	0,50
T2443	42,00	20,00	8,83	T436	96,00	0,00	0,00
T3349	96,50	4,00	1,73	T450_1	96,75	1,00	0,50
T2926	89,33	1,00	0,58	T619	95,50	1,00	0,58
T3363	95,20	7,00	2,77	T761	82,50	3,00	1,29
T2105	92,33	1,00	0,58	T813	95,00	5,00	2,16
T2441	96,50	9,00	3,87	T848_1	95,50	2,00	1,00
T3764	96,67	1,00	0,58	T2488	67,00	12,00	5,25
T1565	96,75	5,00	2,36	T2177	96,75	1,00	0,50
T3063	96,80	2,00	0,84	T2445	96,75	1,00	0,50
T2789	96,50	1,00	0,58	T2291	95,50	1,00	0,58
T2792	97,00	0,00	0,00	T2393	96,80	1,00	0,45
T167	95,00	2,00	0,71	T3304	97,00	0,00	0,00
T463_2	7,80	3,00	1,10	T2511	97,25	1,00	0,50
T649	26,00	9,00	3,67	T2069	96,25	1,00	0,50
T663_2	96,80	2,00	0,84	T1861	46,50	6,00	2,65
T717_1	95,40	1,00	0,55	T2001	94,50	6,00	2,65
T860_1	96,20	2,00	0,84	T1920	95,50	1,00	0,58
T865	96,25	1,00	0,50	T1743	96,25	2,00	0,96
T1196_1	58,20	11,00	4,15	T3782	83,75	6,00	3,20
				T3331	93,50	1,00	0,58
				T3488	95,75	2,00	0,96
Mittelwert	84,39	3,86	1,66	Mittelwert	89,23	3,04	1,18

3. Ergebnisse

In **Tabelle 3.8** sind die Tumore aufgelistet, welche sowohl für die 450k-Array Analyse als auch das Pyrosequencing verwendet wurde. **Abbildung 3.6** zeigt die Tumorlevel der einzelnen Tumore. Rot markiert sind Tumore, welche auch mittels 450k-Array gemessen wurden. Platinresistente Tumoren, welche im 450k-Array niedrige Methylierungslevel aufwiesen, sind in unserer Analyse stark methyliert. Hierbei handelt es sich um die Proben T167, T663_2, T717, T860, T865. Die restlichen Tumore T463_2, T649 und T1196, welche im 450k-Array verwendet wurden und für die Pyrosequencing Analyse zur Verfügung standen, weisen sowohl im 450k-Array als auch im Pyrosequencing Methylierungslevel unter 70% auf. Die sensitiven Tumore welche im 450k-Array hohe Methylierungslevel aufwiesen, zeigen jetzt meist auch hohe Methylierungslevel: T377, T402, T436, T450_1, T619, T761, T813, T848. Eine Ausnahme ist Tumor T270_1, welcher als sensibler Tumor im Array hohe Methylierungslevel aufwies und nun ein mittleres Methylierungslevel von 45% zeigt.

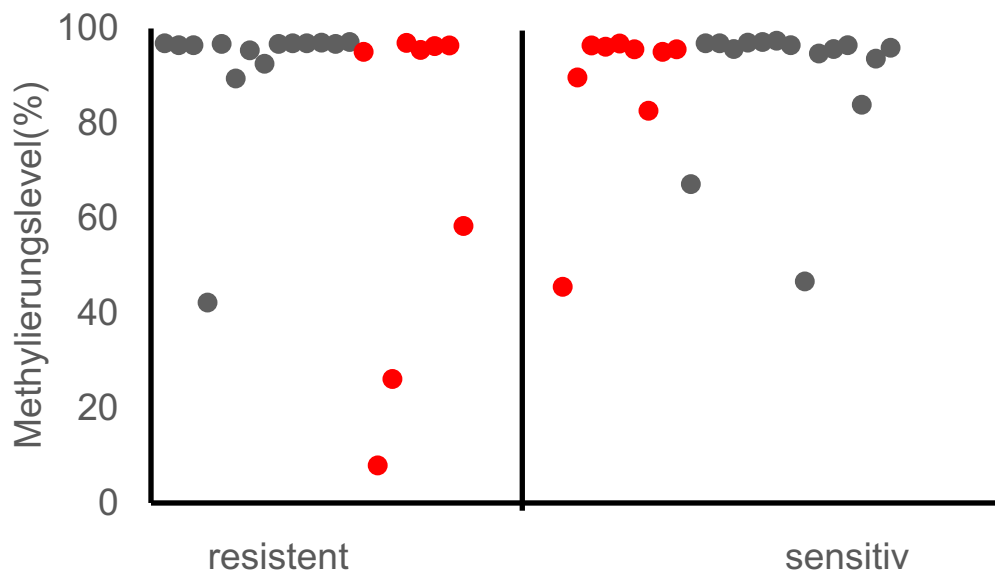


Abbildung 3.6: Einzelne Methylierungslevel der Tumore

4 resistente und 3 sensitive Tumore zeigen Methylierungslevel unter 70%. Die restlichen 39 Tumore zeigen Methylierungslevel über 80%. Rot markiert sind Tumore welche auch mittels 450k-Array gemessen wurden.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.8: 450k-Array und Pyrosequencing Methylierungslevel im Vergleich

Platin-resistente Tumore	Platin-sensitive Tumore
Tumornummer	Tumornummer
T167	T270_1
T463_2	T377_1
T649	T402
T663_2	T436
T717_1	T450_1
T860_1	T619
T865	T761
T1196_1	T813
	T848_1

3. Ergebnisse

3.5. Expressionsanalysen von *ATP11A* & *ATP11B* in Zelllinien unterschiedlicher Cisplatinresistenz sowie in 46 Ovariakarzinomen

Wie in **Kapitel 1.4** beschrieben vermuten wir bei Tumoren einen Zusammenhang zwischen vermehrter Expression von *ATP11A* sowie *ATP11B* und erhöhter Platinresistenz. Um zu untersuchen, ob die Expression von *ATP11A* & *ATP11B* einen Einfluss auf das Resistenzniveau von Tumorzellen gegen Platin hat, wurden zunächst Expressionsmuster von Zelllinien untersucht. Hierfür stellte uns Dr. Heiko van der Kuip vom Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart RNAs aus 10 verschiedenen Zelllinien zur Verfügung. Diese weisen alle ein unterschiedliches Level an Platinresistenz auf (siehe **Kapitel 2.2**). Nachdem die RNA mittels Agilent Bioanalyzer 2100 auf ihre einwandfreie Qualität untersucht wurde (siehe **Kapitel 2.3.5**), führten wir eine cDNA Synthese und eine anschließende qRT-PCR durch (siehe **Kapitel 2.5.2**). Zur Normalisierung wurde *GAPDH* und *β -Actin* verwendet. Alle Transkripte wurden in 3 unabhängigen Triplikaten gemessen.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob eine Diskrimination in der Expression von *ATP11A* und *ATP11B* zwischen platinresistenten und platinempfindlichen Tumoren sichtbar wird. Hierfür wurde die RNA aus 22 resistenten und 24 sensitiven high-grade-serösen Adenokarzinomen isoliert, deren Quantität und Qualität gemessen und daraufhin die RNA in cDNA umgeschrieben (siehe **Kapitel 2.3.1-2.3.6**). Mittels qRT-PCR wurden relative Expressionsmuster für *ATP11A* und *ATP11B* gemessen und mit qBase ausgewertet. Alle Transkripte wurden in drei unabhängigen Triplikaten gemessen. Zur Normalisierung wurde *GAPDH* sowie *PDH* verwendet (siehe **Kapitel 2.5.1-2.5.4**).

3.5.1. Expression von *ATP11A* und *ATP11B* in Zelllinien unterschiedlicher Cisplatinresistenz

Tabelle 3.9 dient der Übersicht über die 10 Zelllinien und zeigt die Sensibilität der Zelllinien auf Cisplatin (Induktion von Zelltod (%), je mehr Induktion, umso sensibler ist die Zelllinie auf Cisplatin), die RNA Integrity Number (RIN), die relative Expression von *ATP11A* & *ATP11B* sowie das Ursprungsgewebe der einzelnen Zelllinien.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.9: Übersicht über Sensibilität auf Platin; Qualität der RNA, relative Expression von ATP11B & ATP11A der 10 Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Induktion von Zelltod (%)	RIN	Expression ATP11B	Expression ATP11A
Calu6	wahr. Lunge	8	9,8	1,00	1,00
OVCAR8	Ovar	14	9,5	0,16	1,31
SKOV3	Ovar	15	10	4,10	3,44
A2780	Ovar	20	10	3,02	1,85
OVCAR5	Ovar	21	10	2,11	3,81
A549	Lunge	30	9,8	0,55	0,56
IGROV1	Ovar	32	10	1,07	1,78
TOV_112D	Ovar	50	10	0,01	1,65
OVCAR3	Ovar	52	9,2	1,67	1,51
OVCAR4	Ovar	55	10	1,93	5,55

Für *ATP11A* zeigt sich bei erhöhter Platin Sensitivität der Zelllinie ein schwacher Anstieg im Expressionslevel. Nachdem mittels SPSS die Ergebnisse auf Normalverteilung überprüft wurden, ergibt sich eine schwache Korrelation nach Pearson mit einem Koeffizienten von 0,285. Werden nur Zelllinien berücksichtigt, welche ursprünglich von Tumorgewebe aus Ovarialzellen entstammen, sinkt der ohnehin geringe Koeffizient nochmals auf 0,182. In

Abbildung 3.7 wird die relative Expression von *ATP11A* der einzelnen Zelllinien entsprechend ihres Resistenzlevels in einem Punkt/Streudiagramm aufgezeichnet. Je sensibler die Zelle, umso mehr Induktion von Zelltod findet bei Zugabe von Platin statt. Rot gezeichnete Zelllinien stammen ursprünglich aus Tumorgewebe des Ovars, schwarz gezeichnete Zelllinien aus Tumorgewebe der Lunge (siehe **Tabelle 3.9**). Die

3. Ergebnisse

rote Trendlinie bezieht sich nur auf Ovarialtumor Zelllinien, die schwarze Trendlinie auf alle Proben.

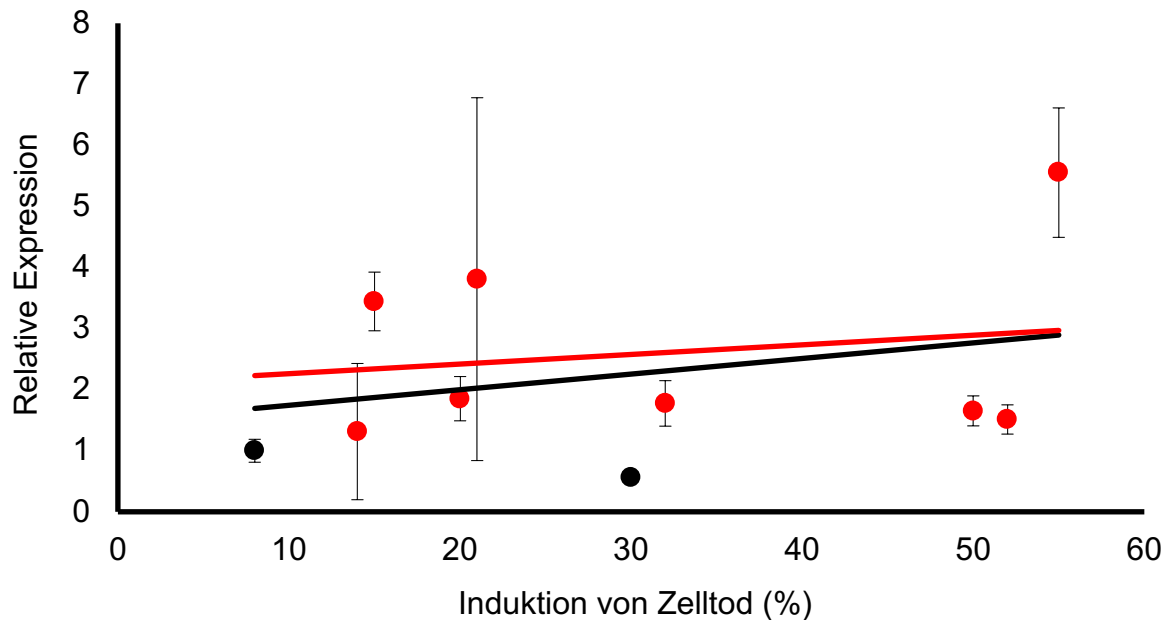


Abbildung 3.7: qRT-PCR von ATP11A in 10 Zelllinien mit unterschiedlicher Platinresistenz.

Die relative Expression von ATP11A in 10 Zelllinien wird in Bezug auf die Sensibilität der Zelllinie auf Platin aufgezeigt (3 unabhängige Replikate \pm SEM). Je mehr Induktion von Zelltod stattfindet, desto sensibler ist die Zelle auf platinhaltige Chemotherapie. Rot gezeichnete Zelllinien entstammen Tumoren aus Ovarialgewebe. Schwarz gezeichnete Zelllinien Tumoren aus Lungengewebe. Die rote Trendlinie bezieht sich nur auf Ovarialtumor Zelllinien (Pearson 0,285), die schwarze Trendlinie auf alle (Pearson 0,182). GAPDH und β -Actin wurden zur Normalisierung genutzt.

Für ATP11B zeigt sich bei erhöhter Platinsensitivität der Zelllinie ein schwacher Abfall der Expression. GAPDH und β -Actin wurden zur Normalisierung genutzt. Nachdem mittels SPSS die Ergebnisse auf Normalverteilung überprüft wurden, ergibt sich eine schwache negative Korrelation mit einem Koeffizienten nach Pearson von -0,218. Werden nur Zelllinien berücksichtigt, welche ursprünglich Tumorgewebe von Ovarialtumoren entstammen, verstärkt sich der Effekt (Korrelations Koeffizient nach Pearson -0,352). In **Abbildung 3.8** wird die relative Expression von ATP11B der einzelnen Zelllinien entsprechend ihres Resistenzlevels in einem Punkt/Streudiagramm aufgezeichnet. **Abbildung 3.8** ist entsprechend zu **Abbildung 3.7** aufgebaut.

3. Ergebnisse

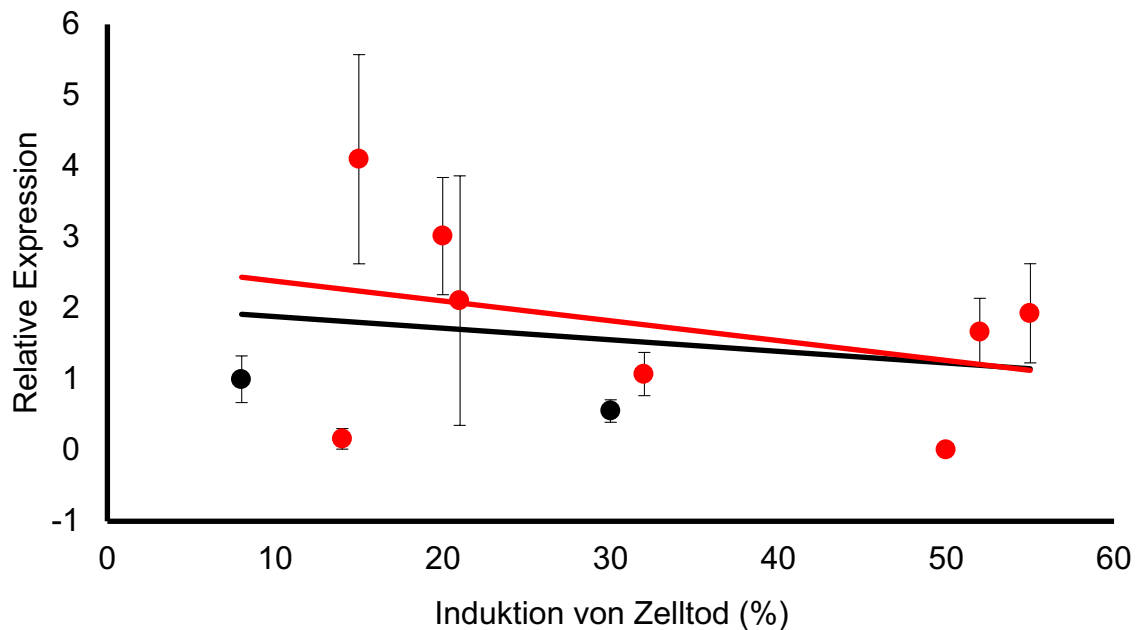


Abbildung 3.8: qRT-PCR von ATP11B in 10 Zelllinien mit unterschiedlicher Platinresistenz.

Die relative Expression von ATP11B in 10 Zelllinien wird in Bezug auf die Sensibilität der Zelllinie auf Platin aufgezeigt (3 unabhängige Replikate \pm SEM). Je mehr Induktion von Zelltod stattfindet, desto sensibler ist die Zelle auf platinhaltige Chemotherapie. Rot gezeichnete Zelllinien entstammen Tumoren aus Ovarialgewebe. Schwarz gezeichnete Zelllinien Tumoren aus Lungengewebe. Die rote Trendlinie bezieht sich nur auf Ovarialtumor Zelllinien (Pearson $-0,218$), die schwarze Trendlinie auf alle (Pearson $-0,352$). GAPDH und β -Actin wurden zur Normalisierung genutzt.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass sich bei Zelllinien, welche unterschiedliche Sensibilität für Cisplatin aufweisen, für ATP11A einen geringen Expressionsanstieg nachweisen lässt, je sensibler die Zellen auf Cisplatin reagieren, nicht jedoch für ATP11B.

3.5.2. Expression von ATP11A und ATP11B in platinresistenten versus platinsensitiven Tumoren

Tabelle 3.10 listet die relativen Expressionslevel der einzelnen Tumore für ATP11A und ATP11B auf.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.10: Expressionslevel ATP11A & ATP11B in 46 Ovarialkarzinomen

Platin-resistente Tumore			Platin-sensitive Tumore		
Tumornummer	Expression ATP11A	Expression ATP11B	Tumornummer	Expression ATP11A	Expression ATP11B
T1565	1,25	3,44	T270_1	0,71	0,52
T2081	1,04	1,30	T377_1	0,43	0,06
T2105	1,31	2,68	T402	0,80	0,22
T2339	1,44	0,92	T436	0,58	0,46
T2441	3,14	2,88	T450_1	0,58	0,09
T2443	2,24	1,49	T619	1,03	2,49
T2789	0,71	1,33	T761	3,82	1,47
T2792	0,36	0,86	T813	1,29	2,30
T2808	0,65	1,38	T848_1	0,39	0,89
T2926	0,75	0,74	T1743	0,73	0,85
T3063	1,63	1,97	T1861	0,41	8,04
T3349	2,44	0,94	T1920	1,95	2,63
T3363	0,77	5,57	T2001	0,49	0,83
T3764	0,46	0,98	T2069	1,92	2,83
T167	2,84	0,12	T2177	1,25	1,20
T463_2		0,37	T2291	0,68	0,59
T649	0,20	0,08	T2393	0,89	1,06
T663_2	1,05	0,80	T2445	2,02	1,82
T717_1	1,96	0,85	T2488	0,06	0,29
T860_1	1,97	1,29	T2511	2,84	1,73
T865	0,34	0,33	T3304	0,95	1,41
T1196_1	1,46	0,48	T3331	0,49	1,08
			T3488	1,08	0,70
			T3782	1,11	1,30
Mittelwert	1,33	1,40	Mittelwert	1,10	1,45

3. Ergebnisse

Betrachtet man die relative Expression von sensitiven versus resistenten Ovarialkarzinomen lässt sich folgender Trend erkennen: platinsensitive Tumore exprimieren *ATP11A* geringfügig weniger als platinresistente Tumore. **Abbildung 3.9D** zeigt als Balkendiagramm die Mittelwerte der platinsensitiven Tumore im Vergleich zu den platinresistenten. **Abbildung 3.9 C** veranschaulicht die Differenz zwischen platinresistenten und -sensitiven Tumoren als Boxplot. Tumor T463 (resistent) wurde dabei nicht in die Auswertung miteinbezogen, da der Lightcycler für diese Proben keine Daten berechnen konnte. Nachdem die relativen Expressionswerte der einzelnen Tumore logarithmisch transformiert wurden, zeigten die Daten eine Normalverteilung (Shapiro-Wilk 0,083; Kolmogorov-Smirnov^a 0,2). **Abbildung 3.9 A** stellt das zugehörige Histogramm dar und **Abbildung 3.9 B** das Q-Q-Diagramm für *logATP11A*. Aufgrund der Normalverteilung und der Intervallskalierung der Daten führten wir mittels SPSS einen T-Test für zwei unabhängige Stichproben durch, welcher keine Signifikanz bei ungleichen Varianzen zeigte ($p=0,314$). Auch der Mann-Whitney-U-Test konnte keine Signifikanz zeigen ($p=0,260$). Weiterführend wurde mittels G*Power die Effektgröße berechnet, welche für ein signifikantes Ergebnis bei unseren Kohorten Größe ($r=21n$; $s=24n$) benötigt wird ($d= 1,0880922$). Für einen signifikanten Unterschied mit der uns gegebenen Gruppenstärke müsste folglich eine sehr große Differenz zwischen platinresistenten und sensitiven Tumoren bestehen. Geringe Unterschiede können mit dieser Gruppenstärke nicht detektiert werden. Es bleibt zu diskutieren, ob eine Vergrößerung der Kohorte möglicherweise den sichtbaren Trend verstärken kann.

3. Ergebnisse

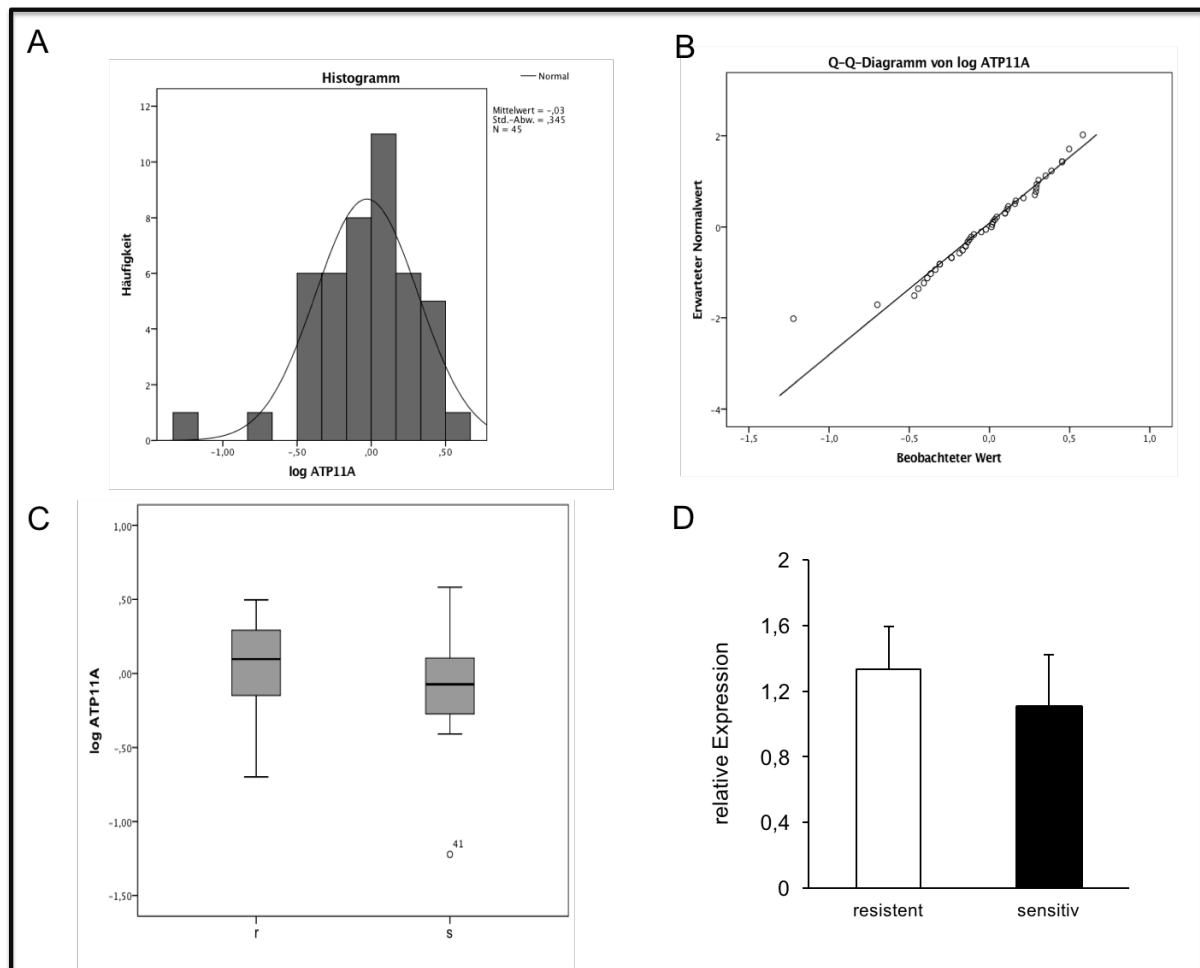


Abbildung 3.9: relative Expression von ATP11A in platinresistenten versus platinsensitiven high-grade-serösen Ovarialtumoren.

Analyse der ATP11A Expression in 22 platinresistenten versus 24 platinsensitiven Ovarialkarzinomen mittels qRT-PCR (3 unabhängige Replikate \pm SEM). GAPDH sowie PDH wurden zur Normalisierung verwendet. A zeigt das Histogramm mit Gausschverteilungskurve nach logarithmieren der relativen Expressionswerte von ATP11A. B zeigt Q-Q-Diagramm welches mittels der logarithmierten relativen Expressionswerte von ATP11A in SPSS erstellt wurde C zeigt Boxplot der logarithmierten relativen Expressionswerte von ATP11A bei platinresistenten versus platinsensitiven Ovarialkarzinomen. D zeigt die relative Expression von ATP11A bei platinresistenten versus platinsensitiven Ovarialkarzinomen im Balkendiagramm. Angegeben ist der Standardfehler mit Fortpflanzungsfehler.

In **Tabelle 3.11** wird eine deskriptive Statistik der relativen Expression von ATP11A dargestellt. Resistente (r) und sensitive (s) Tumore werden dabei getrennt voneinander dargestellt.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.11: Deskriptive Statistik von ATP11A bei platin sensitiven(s) versus platinresistenten(r) high-grade-serösen Ovarialkarzinom

Relative Expression von ATP11A bei sensitiven versus resistenten high-grade-serösen OvCa			Statistik	Standardfehler	
r	ATP11A	Mittelwert	1,3338	,18363	
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,9508	
			Obergrenze	1,7169	
		5% getrimmtes Mittel		1,2969	
		Median		1,2500	
		Varianz		,708	
		Standardabweichung		,84150	
		Minimum		,20	
		Maximum		3,14	
		Spannweite		2,94	
		Interquartilbereich		1,29	
		Schiefe		,642	,501
		Kurtosis		-,411	,972
		s	ATP11A	Mittelwert	1,1042
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze			,7396	
	Obergrenze			1,4688	
5% getrimmtes Mittel				1,0173	
Median				,8450	
Varianz				,746	
Standardabweichung				,86348	
Minimum				,06	
Maximum				3,82	
Spannweite				3,76	
Interquartilbereich				,77	
Schiefe				1,773	,472
Kurtosis				3,426	,918

3. Ergebnisse

Anders als in der Veröffentlichung von Moreno-Smith et al. (Moreno-Smith & Halder 2013) konnten wir hingegen für *ATP11B* keinerlei Diskrimination zwischen resistenten und sensitiven Ovarialkarzinomen detektieren. **Abbildung 3.10 D** zeigt im Balkendiagramm die Mittelwerte der platin sensitiven Tumore im Vergleich zu platinresistenten. **Abbildung 3.10 C** veranschaulicht die Differenz zwischen platinresistenten und -sensitiven Tumoren als Boxplot. Auch nachdem die relativen Expressionswerte der einzelnen Tumore logarithmisch transformiert wurden, zeigen die Daten keine Normalverteilung (Shapiro-Wilk 0,038; Kolmogorov-Smirnov^a 0,021). **Abbildung 3.10 A** stellt das zugehörige Histogramm dar und **Abbildung 3.10 B** das Q-Q-Diagramm für *logATP11B*. Da keine Normalverteilung der Daten vorliegt, diese jedoch intervallskaliert sind, führten wir mittels SPSS den Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben durch. Dieser ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,895$) zwischen resistenten und sensitiven Ovarialkarzinomen. Es bleibt zu diskutieren, welche Gründe es haben könnte, dass sich der Effekt welcher in der Veröffentlichung von Moreno-Smith et al. (2013) beschrieben wurde durch uns nicht bestätigt werden konnte.

3. Ergebnisse

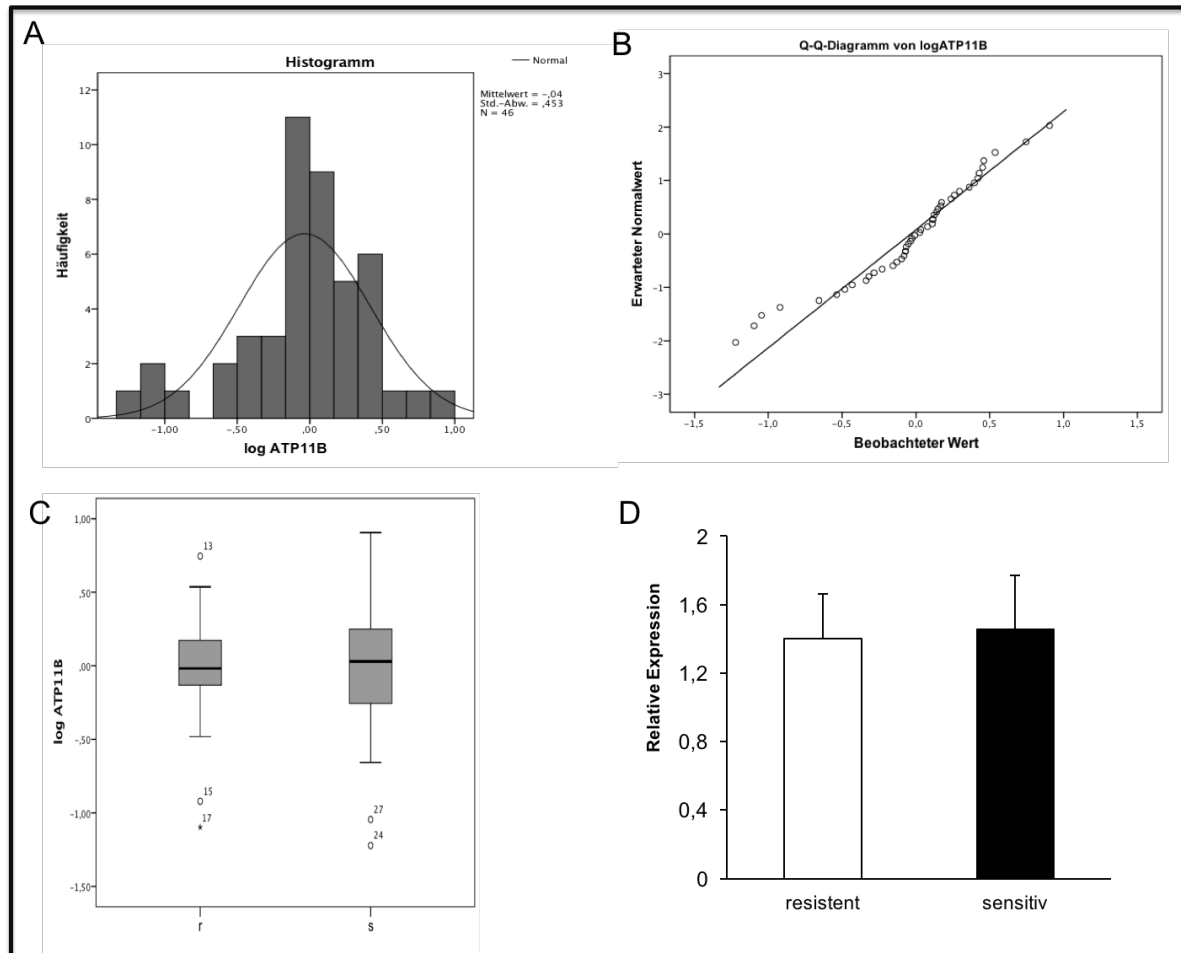


Abbildung 3.10: relative Expression von ATP11B in platinresistenten versus platin sensitiven high-grade-serösen Ovarialtumoren.

Analyse der ATP11B Expression in 22 platinresistenten versus 24 platin sensitiven Ovariakarzinomen mittels qRT-PCR (3 unabhängige Replikate \pm SEM). GAPDH sowie PDH wurden zur Normalisierung verwendet. A zeigt das Histogramm mit Gaußscher Verteilungskurve nach logarithmieren der relativen Expressionswerte von ATP11B. B zeigt Q-Q-Diagramm, welches mittels der logarithmierten relativen Expressionswerte von ATP11B in SPSS erstellt wurde C zeigt den Boxplot der logarithmierten relativen Expressionswerte von ATP11B bei platinresistenten versus platin sensitiven Ovariakarzinomen. D zeigt die relative Expression von ATP11B bei platinresistenten versus sensitiven Ovariakarzinomen im Balkendiagramm. Angegeben ist der Standardfehler mit Fortpflanzungsfehler.

In **Tabelle 3.12.** wird eine deskriptive Statistik der relativen Expression von ATP11B dargestellt. Resistente (r) und sensitive (s) Tumore werden dabei getrennt voneinander dargestellt.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.12. Deskriptive Statistik von ATP11B bei platin sensitiven(s) versus platinresistenten(r) high-grade-serösen Ovarialkarzinom

Relative Expression von ATP11B bei sensitiven versus resistenten high-grade-serösen OvCa		Statistik	Standardfehler	
R	ATP11B Mittelwert	1,4000	,27200	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,8343	
		Obergrenze	1,9657	
	5% getrimmtes Mittel	1,2522		
	Median	,9600		
	Varianz	1,628		
	Standardabweichung	1,27580		
	Minimum	,08		
	Maximum	5,57		
	Spannweite	5,49		
	Interquartilbereich	,93		
	Schiefe	1,966	,491	
	Kurtosis	4,579	,953	
	S	ATP11B Mittelwert	1,4525	,32960
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts		Untergrenze	,7707	
		Obergrenze	2,1343	
5% getrimmtes Mittel		1,2119		
Median		1,0700		
Varianz		2,607		
Standardabweichung		1,61468		
Minimum		,06		
Maximum		8,04		
Spannweite		7,98		
Interquartilbereich		1,26		
Schiefe		3,150	,472	
Kurtosis		12,387	,918	

4. Diskussion

4.1. Design und Ziele der Arbeit im aktuellen Kontext der Resistenzforschung von Ovarialkarzinomen

Das Wissen um die Mechanismen der Resistenzentwicklung von Ovarialkarzinomen auf platinhaltige Chemotherapie ist vielfältig. Es finden sich zahlreiche Publikationen zu Mechanismen der Platin-Resistenz. Hierzu zählen vermehrter Efflux (Samimi et al. 2004) und verringerter Influx von Platin (Lin et al. 2002), vermehrte DNA-Reparatur in der Tumorzelle (Stefanou et al. 2015), Gluthation, welches als Radikalfänger im Verdacht steht die Wirkung von Platin in der Tumorzelle abzuschwächen (Kasherman et al. 2009), sowie epigenetische Mechanismen (Flanagan et al., 2017). Bisher konnte jedoch kein einheitliches Bild der Resistenzentwicklung entworfen werden, und man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus (Shen et al. 2012). Diese Arbeit untersucht eine mögliche Verknüpfung von epigenetischer Modulation und vermehrtem Platinefflux als Ursache von Platinresistenz.

Eine mögliche Ursache dafür, dass noch keine therapielevanten Erfolge beim Verständnis der Resistenzentwicklung bei Ovarialtumoren gelungen sind, könnte darin liegen, dass erst 2004 das duale Tumorgenese-Konzept von Shih und Kurman publiziert wurde (Shih & Kurman 2004). Erst 2014 fand dieses Tumorgenese-Konzept in der WHO-Klassifikation Beachtung, welche nun seröse Ovarialkarzinome nur noch in high-grade und low-grade seröse Karzinome einteilt (Travis et al. 2004). Dass alle high-grade serösen Karzinome (pelvin, tubal und ovariell) im Fimbrientrichter der Tube entstehen (Drapkin et al., 2007) und sich in ihren genetischen Mutationen von low-grade serösen Ovarialkarzinomen grundlegend unterscheiden (Staebler & Diebold 2007) sind Erkenntnisse, die sich erst in den letzten 5 Jahren flächendeckend in der Tumorforschung des Ovars durchgesetzt haben. Für viele Studien wurden Typ1 und Typ2 Tumore in gemeinsamen Kohorten untersucht, was die Ergebnisse verwässert haben kann. In dieser Arbeit wurden ausschließlich high-grade seröse Ovarialkarzinome verwendet.

Wie bei anderen Tumoren auch, werden intrinsische und erworbene Platinresistenzen bei Ovarialkarzinompatienten beobachtet (Goldstein et al. 1989). Nach den RECIST-Leitlinien wird von einer Resistenz gesprochen, wenn ein Rezidiv innerhalb eines halben Jahres nach Beendigung der Chemotherapie auftritt (Eisenhauer et al. 2009;

4. Diskussion

Wagner, Harter, Hilpert, Mahner, Reuß, Du Bois, et al. 2013). Eine platinhaltige Chemotherapie bringt viele Nebenwirkungen mit sich, welche für die Patientin sehr belastend sein können (Sun et al. 2005). Spricht ein Tumor aufgrund von intrinsischer Platinresistenz überhaupt nicht auf die Therapie an, wird der Patientin mit der Therapie mehr Schaden zugefügt als Nutzen. Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit intrinsischer Resistenz und zeigt mögliche Targets für die Zukunft, welche vor einer geplanten Chemotherapie getestet werden können, um eine Aussage über die Wirkung der Therapie zu erzielen. Auch wurde der zeitliche Abstand von sensitiven Tumoren von einem halben Jahr auf 17 Monate verlängert um sicher zu stellen, dass es sich wirklich um zwei verschiedene Kohorten handelt. Die genaue Auswertung der Chemotherapie Protokolle der Patienten stellt sicher, dass die Patienten nicht aufgrund von zu geringer Dosis der Chemotherapie ein Rezidiv bekamen.

Wie weiter oben genannt, beschäftigt sich unsere Arbeit mit den P-Typ-ATPasen *ATP11A* und *ATP11B*, welche im Verdacht stehen, als Effluxtransporter für Platin in Ovarialkarzinomzellen zu fungieren. Unsere Arbeit zeigt eine mögliche Verknüpfung von Epigenetik und Effluxtransporter bei der Resistenzentstehung in Ovarialkarzinomen. In Bezug auf Effluxtransporter wurden bereits *ATP7A* und *ATP7B* intensiv beforscht (Samimi et al. 2004; Owatari et al. 2007; Kobayashi et al. 2008; Kalayda et al. 2008),. Mehrfach konnte nachgewiesen werden, dass diese P-Typ-ATPasen, als Effluxtransporter für Platin, eine Rolle bei Platinresistenz spielen. Eine Neuerung war die Publikation von Moreno-Smith und Kollegen, welche auch den *ATP11B*-Transporter (stammt aus der Familie der P-Typ-ATPasen) als ein partizipierendes Protein für die Resistenzentwicklung identifizieren konnte (Moreno-Smith & Halder 2013). Unsere Arbeit zieht nun *ATP11A*, eine weitere P-Typ-ATPase, als möglichen Effluxtransporter in Betracht und untersucht dabei epigenetische Variationen des *ATP11A*-Gens.

Einige epigenetische Analysen wurden zum Ovarialkarzinom publiziert. Earp und Cunningham konnten beispielsweise zeigen, dass sich Typ1 und Typ2 ovarial Tumore auch im Methylierungsmuster unterscheiden (Earp & Cunningham 2015) und Liao und Kollegen publizierten 2014, dass Hypomethylation in bestimmten Genen mit schlechter Prognose der Patientinnen einhergehen (Liao et al. 2014). Winham et al. zeigten, dass Methylierungsmuster im *BNC2*-Gen als möglicher Marker für eine

4. Diskussion

Frühdetektion von Ovarialkarzinomen in Frage kommen (Winham et al. 2014).

2011 wurde der neueste hochdichte Methylierungsarray von der Firma Illumina mit 450.000 CpG-Sites auf den Markt gebracht, welcher auch viele verschiedene Gene für eine mögliche Resistenzentwicklung und Überleben in Ovarialtumoren untersucht. Flanagan und Kollegen verwendeten in einer aktuellen Publikation dieses Array, um Blutproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu untersuchen (Flanagan et al. 2017). Hierfür verwendeten sie Blut der Patienten vom Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie vom Zeitpunkt des ersten Rezidivs. Sie identifizierten 9 Methylierungsstellen, welche zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs signifikant zwischen Patienten mit kurzem und langem Überleben diskriminierten. Flanagan regt hierbei an, dass Proben von Tumorgewebe von platinresistenten versus platinsensitiven Patienten mittels des 450k-Array untersucht werden sollten, was die Ergebnisse möglicherweise untermauern könnte. Mit einer geeigneten Kohorte führte unsere Arbeitsgruppe als eine der ersten den 450k-Array mit Tumorgewebe aus platinresistenten und sensitiven Tumorproben durch.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich unsere Arbeit mit Schlüsselfragen der heutigen Resistenzforschung auf platinhaltige Chemotherapie bei Ovarialkarzinomen beschäftigt. Das Studiendesign berücksichtigt die aktuellen Forschungsergebnisse und versucht dadurch, mögliche Störvariablen zu verhindern. Zusammenhänge zwischen den einzelnen schon publizierten Mechanismen der Resistenzentstehung zu untersuchen, scheint ein vielversprechender Weg für die Zukunft zu sein. So suchen wir einen Zusammenhang von Epigenetik und erhöhten Expressionsleveln von möglichen Effluxtransportern. Einen roten Faden in das multifaktorielle Geschehen der Resistenzenwicklung bei Ovarialkarzinomen zu spinnen, wird der erste Schritt sein, um in Zukunft Patientinnen, welche aufgrund von Platinresistenz in ihrer Therapie massiv limitiert sind, helfen zu können.

4.2. Expressionsanalysen von P-Typ ATPasen *ATP11A* und *ATP11B*

P-Typ ATPasen sind membranständige Proteine, welche eine lebenswichtige Rolle für unseren Organismus haben. Sie katalysieren den Transport von Teilchen (Ionen, kleine Moleküle, Proteine) in und aus der Zelle heraus (Panatala et al. 2015). In den

4. Diskussion

vergangenen Jahren zeigte sich, dass Fehlfunktionen in P-Typ-ATPasen zu schwerwiegenden Erkrankungen wie bsp. Herzversagen, Morbus Wilson oder Dystonie-Parkinsonismus mit rapidem Beginn führen können. Auch spielen P-Typ-ATPasen bei der Pathogenese vieler Tumore eine Rolle (Bublitz et al. 2011). Wie oben beschrieben stehen beim Ovarialkarzinom P-Typ-ATPasen im Verdacht, als Effluxtransporter für Platin zu fungieren und somit die Resistenzentwicklung voranzutreiben. Bisher publizierte P-Typ ATPasen sind *ATP7A*, *ATP7B* sowie *ATP11B*. Auch eine Rolle von *ATP11A* bei der Resistenzentwicklung auf platinhaltige Chemotherapie ist denkbar. Mark und Kollegen sehen *ATP11A* als partizipierendes Protein beim Vesikeltransport in Makrophagen (van der Mark et al. 2017) und Moreno-Smith zeigt das Schwesterprotein *ATP11B* in Zusammenhang mit Vesikeltransport von Platin vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Moreno-Smith & Halder 2013). Unsere Expressionsanalysen der Tumorproben zeigen eine vermehrte Expression von *ATP11A* in platinresistenten Tumorproben. Um einen signifikanten Unterschied bei unserer Kohortengröße zu sehen, müssten sich die Expressionslevel um $d=1$ unterscheiden. In Anbetracht dessen, dass RNA ein volatiles Produkt der Zelle ist, und dass kleine Expressionsunterschiede zu Änderung in der Biologie der Zelle führen können, würde eine Vergrößerung der Kohorte möglicherweise unsere These untermauern. In unseren Ergebnissen zeigt in Zelllinien *ATP11A* jedoch eine niedrigere Expression, je höher das Resistenzlevel für Cisplatin ist. Dies widerspricht den Ergebnissen der Tumorproben. Die Zelllinien könnten sich grundsätzlich von den Tumorproben unterscheiden, aufgrund von beispielsweise extrazellulären Vorgängen im menschlichen Körper, die nicht im Zelllinien-Modell nachgebildet werden können. Es könnte aber auch sein, dass sich die Effekte bei größerer Kohorten- sowie Zelllinien-Zahlen angleichen. Was wiederum dafür spricht, die Kohorten zu vergrößern.

ATP11B zeigt in unserer Arbeit, anders wie bei Moreno-Smith, kein Expressionsanstieg bei steigender Resistenz. Als mögliche Gründe hierfür sind wiederum die Heterogenität von Resistenz bei Ovarialkarzinomen zu nennen. Auch konnten wir in unserer Arbeit, aufgrund der kleinen Kohortengröße, kleine jedoch signifikante Expressionsunterschiede in den Kohorten eventuell nicht detektieren. Gegensätzlich zu den Tumorproben zeigen Zelllinien in der Expression einen Anstieg für *ATP11B*, je höher das Resistenzlevel für Cisplatin ist. Hier können unsere

4. Diskussion

Ergebnisse die von Moreno-Smith bestätigen. Dieser hatte in Zelllinien gleiche Effekte gesehen (Moreno-Smith & Halder 2013).

Technisch erreicht unsere Arbeit das Niveau, welches für die Durchführung von Real-Time-PCR gefordert wird (Mueller & Schroeder 2004). Die RIN-Werte für die RNA waren immer über 5, es wurde in Triplikaten gemessen und mit je 2 Houskeeping-Genen relativiert. Alles in allem zeigt dies, dass es schwierig ist, RNA als Marker für Resistenz heranzuziehen, da Unterschiede in diesen volatilen Produkten schwer detektierbar sind, dennoch scheint es nicht vollkommen abwegig.

Ein Aspekt, der die Expressionsanalysen zusätzlich beeinflussen kann, ist der intraoperative Entnahmeort der Tumorproben. In der Biobank des südwestdeutschen Tumorzentrums-CCC Tübingen-Stuttgart wird grob vermerkt, wo sich der Entnahmeort intraoperativ befand. Dabei wird klar, dass es keine einheitliche Regelung gibt. Man nimmt jedoch an, dass sich im Vergleich zum Primarius aggressiveres Tumorgewebe intraperitoneal befindet (Lengyel 2010). Deshalb ist es nicht unwahrscheinlich, dass sich die Expressionslevel für *ATP11A* innerhalb eines Situs auch unterscheidet. Würde man einheitliche Regelungen für die intraoperative Entnahme von Tumorgewebe für die Forschung aufstellen, so könnte man diese Störvariable minimieren.

Beim heutigen Stand sind wir noch weit davon entfernt, RNA als Biomarker für Resistenz einzusetzen. Eventuell könnten große Kohorten Gruppen für mehr Klarheit sorgen. Um größere Kohorten aufzustellen, darf die Qualität der Kohorten nicht reduziert werden. Bei genauer Analyse der Tumorproben in der Tumorprobenbank und der Patientenakten, fanden sich aus 2000 potentiellen Tumorproben nur 14 platinresistente und 15 platinsensitive, welche die Kriterien erfüllten. Ein Großteil der Tumorproben musste ausscheiden, da das Follow-up der Patienten nicht korrekt dokumentiert worden war. Vor allen Dingen gilt dies für mögliche platinresistente Patientinnen. An dieser Stellschraube muss in Zukunft gearbeitet werden. Klinisch tätige Ärzte sollten dafür sensibilisiert werden, dass Therapie und Verlauf so dokumentiert werden müssen, dass sie für die Forschung verwendbar sind. Ohne diese Daten kann es kein Progress in der Tumorforschung geben. Ein besseres Arbeiten Hand in Hand mit der Forschung wäre darum sinnvoll und notwendig.

4.3. Methylierungslevel von *ATP11A* im 450k-Array versus PyroMark-Sequenziermethode

In unserer Analyse mittels des 450k-Array zeigt sich für die *cg21570597*-Stelle eine 100% Diskrimination im Methylierungslevel zwischen den resistenten und sensitiven Tumoren. Die *cg21570597*-Stelle befindet sich in einem Intron des *ATP11A*-Gens. Es zeigen sich hohe Methylierungslevel bei sensitiven, niedrige bei resistenten Tumorproben. Diese Ergebnisse passen zur Beobachtung, dass in high-grade serösen Tumoren Hypomethylierung zu Resistenz auf Platin führt (Baker & El-osta, 2003). 2017 konnten Mark und Kollegen zeigen, dass es sich bei *ATP11A* um ein vesikelbildendes Molekül handelt (van der Mark et al. 2017). Auch Moreno-Smith geht davon aus, dass *ATP11B* am Vesikeltransport von Platin vom Golgiapparat zur Plasmamembran beteiligt ist (Moreno-Smith & Halder 2013). Hypomethylierung geht oftmals mit erhöhter Expression der Gene einher (Baker & El-Osta 2003). Wir können in unserer Arbeit zeigen, dass platinresistente Tumore eine erhöhte Expression für *ATP11A* aufweisen.

Die Ergebnisse des 450k-Arrays wurden mit der unabhängigen alternativen PyroMark-Sequenziermethode validiert. Wir können unsere Vorergebnisse jedoch nicht bestätigen. In der Pyromarksequenzierung können wir keinerlei Diskrepanz im Methylierungslevel zwischen platinresistenten und sensitiven Tumoren feststellen. Fast alle Tumorproben zeigen hier ein hohes Methylierungslevel, darunter sind auch resistente Tumorproben, welche im 450k-Array ein niedriges Methylierungslevel aufwiesen.

4.3.1. Qualitätsprüfung des humanen 450k Methylierungsarray von Illumina sowie der PyroMark Sequenziermethode

Welche Gründe diese Diskrepanz möglicherweise haben kann, soll im Folgenden diskutiert werden, dabei müssen beide Methoden auf mögliche Fehlerquellen untersucht werden.

Der dichteste humane Methylierungsarray von Illumina wurde schon in vielen Studien verwendet (s.o.). Er dient zur schnellen, einfachen und effizienten Detektion von CpG-Inseln, welche zwischen Kohorten diskriminieren könnten (Tang et al. 2015). Dass es sich bei unseren Ergebnissen zu *ATP11A* um zufällige Fehler des Arrays handelt, kann

4. Diskussion

nicht sicher ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang muss Marc Jan Bonder genannt werden, er ist Mitarbeiter von European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) und ist auf den 450k-Array und dessen Durchführung spezialisiert. Er veröffentlichte 2013 auf gitHub, bei welchen cg-Stellen die Primer von dem 450k-Array unsauber binden (Bonder 2013). Darunter findet sich auch die von uns untersuchte *cg21570597*-Stelle.

Bei der Diskussion der Ergebnisse muss auch beachtet werden, dass es sich bei unseren 450k-Array-Ergebnissen um sogenannte „batch“ Effekte handeln kann. Unter „batch“ Effekten versteht man, dass Messungen von den Konditionen des Labors, den Reagenzien und dem durchführenden Personal beeinflusst werden. Dies wird zum Problem, wenn „batch“ Effekte mit positiven Ergebnissen korrelieren und zu falschen Interpretationen der Ergebnisse führt (Leek et al. 2010) . Harper und Kollegen sehen „batch“ Effekte als einen führenden Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit des 450k-Array an (Harper et al. 2013). Ein anderer Aspekt wäre, das Vorliegen eines Kohorten Phänomens. Da wir jedoch für die PyroMark Sequenzierung die gleichen Tumorproben verwendet haben wie beim 450k-Array und sich hierbei Tumore mit hohen Methylierungslevel präsentieren, welche im 450k-Array niedrige aufwiesen, scheint dieser Punkt eher eine geringfügigere Rolle zu spielen. Sarah Dedeurwaerder veröffentlichte 2014 einen Artikel, in der sie die korrekte Normalisierung der Daten in den Fokus rückt (Dedeurwaerder et al. 2014). Sie sieht in der Normalisierung eine der großen Herausforderungen für die richtige Interpretation der Array Ergebnisse.

Was in der Literatur allerdings als eine der größten Störvariablen für die Interpretation von 450k-Array-Analysen diskutiert wird, sind single nucleotide polymorphism (SNPs). Unter SNPs versteht man Einzel-Basenpaar-Positionen in genomischer DNA, bei denen in Individuen verschiedene Sequenzalternativen (Allele) vorkommen. Das am wenigsten häufige Allel weist dabei eine Häufigkeit von 1% auf (Brookes 1999); (Risch 2000). Genetische Variationen an CpG-Stellen führen dazu, dass sie nicht für das Substrat von Methylierungsreaktionen empfänglich sind und somit der Methylierungsstatus an einer einzelnen CpG-Stelle drastisch verändert wird (Zhi et al. 2013). Autoren wie Chen oder Tang zeigen, dass SNPs ein häufiges Problem in der Auswertung von 450k-Array-Analysen sind (Chen et al. 2013; Tang et al. 2015).

Im **Kapitel 4.3.2** wird auf ein vorliegendes SNP für die *cg21570597*-Stelle näher eingegangen. Wir können nicht komplett ausschließen, dass dieser SNP oder einer

4. Diskussion

der anderen oben genannten Phänomene zu einem falschen Ergebnis des 450k-Arrays für die *cg21570597*-Stelle geführt hat, halten es jedoch für unwahrscheinlich.

Die Pyromark-Sequenzierung ist eine klassische Methode um Ergebnisse des 450k-Arrays zu validieren. So haben auch wir diese Methode genutzt, um die 100% Diskrimination im Methylierungslevel zwischen resistenten und sensitiven Ovarialkarzinomproben auf der *cg21570597*-Stelle im 450k-Array zu validieren. Um unsere PyroMark-Ergebnisse einordnen zu können müssen folgende Fragen gestellt und diskutiert werden:

1. Wird spezifisch sequenziert?
2. Wie exakt sind die Ergebnisse der mittels PyroMark gemessenen Methylierungslevel?
3. Sind die Ergebnisse reproduzierbar?
4. Was sind mögliche Störquellen und wie wurden diese kontrolliert?

zu 1.

Durch die Software des PyroMarks Q96 ID konnten wir durch verschiedenste Kontrollmechanismen überprüfen, ob die Sequenzierung adäquat und spezifisch für die *cg21570597*-Stelle stattfinden kann (siehe **Kapitel 2.4.8.** und **2.4.9.**). Die Software berechnet aufgrund der bekannten Sequenz wie hoch die jeweiligen Lichtpeaks ausfallen müssen. Bei unspezifischer Sequenzierung, beispielsweise durch Minusshift oder Restart, können die geforderten Lichtpeaks der einzelnen Reaktionen nicht erreicht werden. Somit stellt die Software fest, ob die Reaktion spezifisch abläuft. Zudem bestätigt uns der Technical-Support der Firma Qiagen, dass die Sequenzierung spezifisch verlaufen ist.

Auch die nicht bisulfitkonvertierten Tumorproben wurden innerhalb der vier Sequenzierungsdurchläufe gemessen. Wie erwartet, konnten diese Tumorproben nicht sequenziert werden. Dies zeigt sich daran, dass im Agarosegel keine Bande sichtbar war. Es wurde also lediglich Bisulfit-behandelte DNA sequenziert. Somit ist nahezu ausgeschlossen, dass Störungen im Methylierungslevel aufgrund von nicht bisulfitkonvertierter DNA auftreten. Auch zeigt dies, dass die Sequenzierung spezifisch stattfindet.

zu 2.

4. Diskussion

Um die Genauigkeit der PyroMark Methylierungsergebnisse zu überprüfen führten wir auf jeder Sequenzierplatte Proben mit, welche ein uns bekanntes Methylierungslevel aufwiesen (siehe **Kapitel 2.4.8.**). Die gemessenen Methylierungslevel entsprachen den berechneten (siehe **Kapitel 3.4.1.**).

zu 3.

Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen führten wir zwei unabhängige Bisulfitkonvertierungen durch und führten von diesen wiederum jeweils zwei unabhängige Sequenzierungen durch. So erhielten wir schlussendlich von jeder Tumorprobe 4 Methylierungslevel (siehe **Kapitel 3.4.**). Bei keiner der Proben zeigte sich eine große Abweichung zwischen den Werten, so dass wir von einer ausreichenden Reproduzierbarkeit unserer Daten ausgehen.

zu 4.

Eine mögliche Fehlerquelle wäre, dass die Bisulfitbehandlung der Tumorproben nicht vollständig erfolgte. Es wurde in jeder Sequenzierung eine Kontrolle programmiert, um die Proben auf vollständige Bisulfitkonvertierung zu überprüfen (siehe **Kapitel 2.4.8.**). In allen Tumorproben war die Bisulfitkonvertierung vollständig erfolgt. Somit können Abweichungen der Methylierungslevel aufgrund von unvollständiger Cytosin-nach-Thymin-Umwandlung weitgehend ausgeschlossen werden.

Des Weiteren können Fehler bei der Amplifizierung mittels der biotinylierten Primer entstehen. Wie in **Kapitel 2.4.2** beschrieben, ist die Sequenz schwierig zu amplifizieren. So zeigte sich trotz intensiver Modifizierung der Amplifizierung und speziell neu designter Primer der Firma Qiagen im Agarosegel Mehrfachbanden. Der Technical Support der Firma Qiagen sieht als wahrscheinlichste Ursache der Mehrfachbanden Homopolymere. Als Homopolymere werden wiederkehrende Sequenzen bezeichnet. Sie befinden sich, wie auch in unserem Fall, auf nicht kodierenden Bereichen und können unter anderem aktivierend oder hemmend in Promotorregionen einwirken (Koch & Thiele 1999; Zhou et al. 2004). Es gibt viele Publikationen, die beschreiben, dass die Amplifikation in hoch repetitiven Sequenzen schwierig ist (Müller & Strauss 2013; Davis et al. 2012). Mit großer Wahrscheinlichkeit kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der Homopolymere die von Qiagen designten Primer nicht einwandfrei spezifisch arbeiten konnten. Durch den Technical-Support der Firma Qiagen wurde uns bestätigt, dass unsere amplifizierten Bisulfit-behandelten Tumorproben verwendbar sind. Da die Sequenzierprimer spezifisch arbeiten, und die

4. Diskussion

Lichtpeaks im PyroMark Q24 wie berechnet auftreten, wurden die Amplifizierungsergebnisse toleriert.

Wie in **Kapitel 3.3.1** beschrieben, sind in einigen nicht Bisulfit-behandelten Kontrollen in der PCR Banden zu sehen. Diese Banden lassen sich auch sequenzieren und zeigen jeweils eine vollständige Bisulfitbehandlung in den Bisulfit-Kontrollen, sowie ein immer hohes Methylierungslevel mit über 90%. Dass es sich deshalb beim beschriebenen Phänomen um eine Kontamination mit Bisulfit-behandelter DNA handelt, ist möglich. Aufgrund dieser Vermutung wurden in verschiedenen PCR-Amplifizierungen verschiedene PCR-Kits verwendet. Trotzdem konnte kein Amplifikationsdurchlauf ohne das beschriebene Phänomen generiert werden. Dabei kam es nie in allen nicht-Bisulfit-behandelten Kontrollen zu Banden. Auch fällt auf, dass sich bei den nicht-Bisulfit-behandelten Kontrollproben niemals Mehrfachbanden, sondern nur ein Produkt mit 200bp im Agarosegel zeigen. 200bp ist die Länge des gewünschten Produktes. Da von jeder Tumorprobe je vier PyroMark Sequenzierungen durchgeführt wurden, kann nahezu ausgeschlossen werden, dass die Kontamination (die nur bei manchen Amplifizierungen vorliegt) eine Auswirkung auf das Methylierungslevel hat. Dies wurde uns wiederum von dem Technical Support der Firma Qiagen bestätigt (siehe **Kapitel 3.4.1**). Ob es sich beim oben beschriebenen Phänomen wirklich um eine Kontamination handelt oder andere Gründe ursächlich sind, konnte weder von unserer Arbeitsgruppe noch vom Special Tech Service der Firma Qiagen abschließend geklärt werden.

4.3.2. SNP für die *cg21570597*-Stelle: eine mögliche Diskrimination zwischen platinresistenten und sensitiven Patienten

Die meisten SNPs sind stille SNPs mit keiner weiteren Funktion für ein Gen. Seit der Jahrhundertwende wandelt sich der Blick auf SNPs jedoch. So spielen sie heute eine immer größere Rolle bei Forensik, Medikamentenentwicklung, genetischen Erkrankungen und auch Tumorentstehung (Brookes 1999). Bei der Tumorentstehung werden SNPs beispielsweise im Zusammenhang mit prognostischen Informationen für das Patientenüberleben oder das Ansprechen auf Medikamente beforscht (Erichsen & Chanock 2004). 2009 publizierten Song und Kollegen eine Studie, in der sie SNPs identifizierten, welche mit erhöhtem Ovarialkarzinomrisiko einhergehen (Song et al. 2009). Bisher verhält es sich bei der Forschung zu SNPs im Zusammenhang mit

4. Diskussion

Ovarialkarzinomen jedoch ähnlich, wie es sich insgesamt mit der Ovarialkarzinomforschung verhält: viele Ergebnisse sind inkonsistent. So konnten beispielsweise Rasmus und Kollegen in einer Metaanalyse keine der 7 SNP-Kandidaten, welche in früheren Studien in Assoziation mit Ovarialkarzinom gebracht wurden, bestätigen (Ramus et al. 2008).

Es existieren Datenbanken für den Illumina 450k-Array, auf denen interagierende SNPs publiziert werden (Price et al. 2013). So fand sich auch für unsere *cg21570597*-Stelle ein SNP. Nun stellte sich die Frage, ob unsere Proben diese diskriminierende Variante tragen und sich das Ergebnis des Arrays dadurch erklären lässt. Zur Validation führten wir wiederum eine PyroMark Sequenzierung durch. Jedoch bestätigte sich unser Verdacht nicht. Wir konnten keine Diskrimination zwischen resistenten und sensitiven Proben aufgrund des SNPs feststellen. Somit mussten wir unsere Hypothese verwerfen, dass dieser SNP zwischen platinresistenten und sensitiven Tumoren unterscheiden kann.

4.3.3. Bewertung der Methylierungsergebnisse

Dass die letztlich ursächliche Variation für die hundertprozentige Diskrimination zwischen platinresistenten und sensitiven Ovarialkarzinomproben, welche sich in der 450k-Arrayanalyse zeigt, nicht von uns gefunden wurde, bleibt anzunehmen. Denn dass sich die Ergebnisse aufgrund von zufälligen Fehlern des 450k-Arrays ergeben haben, ist möglich, erscheint jedoch höchst unwahrscheinlich. Dass die PyroMark-Sequenzier-Methode falsche Methylierungslevel für die *cg21570597*-Site lieferte, ist aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und den vielen integrierten Kontrollen nicht erkennbar. Jedoch gibt es Aspekte, wie die Mehrfachbanden im Agarosegel, die sporadischen Banden in nicht-Bisulfit-behandelten Kontrollgruppen, oder die Schwierigkeit des Special-Tech Service der Firma Qiagen, spezifische Primer zu generieren, die vermuten lassen, dass sich auf genetischer oder epigenetischer Ebene uns nicht bekannte Prozesse abspielen. Vielleicht sind es gerade diese Prozesse, die die Diskrepanz auf dem 450k-Array ausmachen. Möglicherweise, kann man mit ihnen auch das schlechte Binden der Primer im 450k-Array an der *cg21570597*-Site erklären, wie von Marc Jan Bonder beschrieben wurde (Bonder 2013). Weitere Untersuchungen in diese Richtung wären sicherlich sinnvoll. So erscheint es vielversprechend, *ATP11A* als ein mögliches Protein für die

4. Diskussion

Resistenzentwicklung weiter zu beforschen. Eine erneute Untersuchung mittels der neu entwickelten Next Generation Sequenzierung nach Bisulfitbehandlung, sowie Expressionsanalysen mit einer vergrößerten Kohorte könnten möglicherweise einen entscheidenden Hinweis liefern.

5. Zusammenfassung

In Deutschland liegt derzeit das Lebenszeitrisiko für Ovarialtumoren bei etwa einer auf 71 Frauen mit sinkender Tendenz. Obwohl Eierstockkrebs nur an achter Stelle der Neuerkrankungen steht, stellt er in der entwickelten Welt die fünfthäufigste Todesursache unter Krebserkrankungen bei Frauen dar. Unter den gynäkologischen Krebserkrankungen ist er der tödlichste (Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2017).

Therapie der Wahl ist eine radikale Debulking Operation und eine darauffolgende adjuvante Chemotherapie. Aktuell wird standardmäßig Carboplatin bei frühen Ovarialkarzinomen, bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen in Kombination mit Paclitaxel verabreicht. Der Erfolg der Chemotherapie wird oftmals durch eine intrinsische oder erworbene Resistenz des Tumors auf Platin limitiert. Die Resistenzentwicklung scheint ein Zusammenspiel von verringertem Influx von Cisplatin, vermehrtem Efflux, vermehrter DNA-Reparatur, erhöhter Expression von Glutathion (GSH), epigenetischen Veränderungen und vielen weiteren Mechanismen in der Tumorzelle zu sein (Cornelison, 2017). Daher sind die Mechanismen der Platin-Resistenz bei Ovarialkarzinomen Gegenstand aktueller Forschung (Samimi et al., 2004; Flanagan et al., 2017; Reedijk, & Jaehde, 2008; Kobayashi et al., 2008; Owatari et al., 2007; Samimi et al., 2004; Moreno-Smith & Halder, 2013).

2012 konnte unsere Arbeitsgruppe mittels des dichtesten humanen Methylierungsarrays mit mehr als 450.000 CpG-Inseln (450k-Array) eine neue Methylierungsposition (cg21570597-Site) detektieren, die zu 100% zwischen resistenten und sensitiven Ovarialkarzinom-Proben diskriminiert. Bei genauerer Analyse der Methylierungsposition zeigte sich, dass sie in einem Intron-Bereich des *ATP11A*-Gens liegt. *ATP11A* gehört zur Familie der P-Typ-ATPasen. Es wurde bereits gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von den verwandten P-Typ-ATP-asen *ATP7 A/B* sowie *ATP11B* und der Resistenzentwicklung von Ovarialtumoren besteht (Li et al. 2018; Moreno-Smith & Halder 2013). In unserer 450K-Array-Analyse zeigen sich hohe Methylierungslevel bei sensitiven und niedrige bei resistenten Patientenproben. Es wurde bereits gezeigt, dass high-grade-seröse Tumore oftmals bei Resistenzentwicklung eine Hypomethylierung zeigen, und dass Hypomethylierung im Zusammenhang mit vermehrter Expression von Genen steht

5. Zusammenfassung

(Baker & El-Osta 2003).

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die bisherigen Ergebnisse mittels eines erweiterten Probensatzes und weiterer Methoden zu validieren und funktionell zu untersuchen. Hierfür wurde die Kohortengruppe auf insgesamt 48 Proben vergrößert. Anhand von geeignetem Kryogewebe wurde DNA und RNA isoliert. Nachdem die Proben auf Quantität und Qualität untersucht worden waren, wurden die DNA-Proben Bisulphit-behandelt und die Sequenz von Interesse mittels eines PyroMARK Q24 Sequenzierungsgerät charakterisiert. Von der RNA wurden Expressionsanalysen von *ATP11A* und *ATP11B* mittels qPCR angefertigt. Zusätzlich wurden für die Expressionsanalysen RNA von zahlreichen Cisplatin-resistenten Zelllinien verwendet.

Unsere Expressionsanalysen der Tumorproben zeigen eine vermehrte Expression von *ATP11A* auf mRNA-Ebene in platinresistenten Tumorproben. *ATP11A* zeigt jedoch in Zelllinien in unseren Ergebnissen eine niedrigere Expression je höher das Resistenzlevel für Cisplatin ist. *ATP11B* zeigt in unserer Arbeit, kein Expressionsanstieg bei resistenten Tumoren. Zelllinien allerdings zeigen einen Anstieg in der Expression von *ATP11B*, je höher das Resistenzlevel für Cisplatin ist. Vorarbeiten von Moren-Smith et al. hatten eine höhere Expression in resistenten Tumorproben gezeigt. Um diese Diskrepanz aufzuklären, sollte die Kohorte vergrößert werden.

In der PyroMark-Sequenzierung können wir keinerlei Diskrepanz im Methylierungslevel zwischen platinresistenten und sensitiven Tumoren feststellen. Fast alle Tumorproben zeigen hier ein hohes Methylierungslevel, darunter sind auch resistente Tumorproben, welche im 450k-Array ein niedriges Methylierungslevel aufwiesen. Die Ergebnisse sind reproduzierbar und zeigen bei genauer Prüfung keinen Anhalt für fehlerhafte Sequenzier-Vorgänge.

Um die Diskrepanz dieser Ergebnisse mit den Array-Daten aufzuklären, haben wir mögliche Störvariablen des 450k-Arrays untersucht. Hierbei spielen vor allem single nucleotide polymorphism (SNPs) (Chen et al. 2013) eine Rolle. Auch für die *cg21570597*-Stelle existiert ein SNP. Bei der Validierung mittels PyroMark-Sequenzierung, ob dieser SNP zwischen platinresistenten und sensitiven Tumoren unterscheiden kann, konnten wir jedoch keine Diskriminierung detektieren.

5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse des 450k-Array konnten also nicht bestätigt werden. *ATP11A* erscheint aber weiterhin als vielversprechendes Target bei der Erforschung von Platinresistenz von Ovarialkarzinomen. Eine erneute Untersuchung mittels des 450k-Array von Illumina sowie Expressionsanalysen mit einer vergrößerten Kohorte sollten daher durchgeführt werden, da Platinresistenz für vom Ovarialkarzinom betroffene Frauen weiterhin ein lebensbedrohendes Problem darstellt.

6. Literatur

- Aktories, K., Förstermann, U. & Hofmann, F.B., 2009. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*,
- Alderden, R.A., Hall, M.D. & Hambley, T.W., 2006. The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education*, 83(5), p.728. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed083p728>.
- Anon, 2014. No Title. , 2014, pp.1–2.
- Baker, E.K. & El-Osta, A., 2003. The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer. *Experimental Cell Research*, 290(2), pp.177–194.
- Balch, C. et al., 2004. The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191(5), pp.1552–1572.
- Beral, V. et al., 2008. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*, 371(9609), pp.303–14.
- Binkhathlan, Z. & Lavasanifar, A., 2013. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*, 12(3), pp.326–346.
- Bonder, J.M., 2013. 450K_DataProcessing. *gitHub*. Available at: [https://github.com/Bonder-MJ/450K_DataProcessing/blob/master/ADDITIONAL_INFO/ProbeFiltering/Probe sBindingNonOptimal/Source%26BSPProbesMappingMultipleTimesOrNotBothToBSandNormalGenome.txt%0D%0A](https://github.com/Bonder-MJ/450K_DataProcessing/blob/master/ADDITIONAL_INFO/ProbeFiltering/Probe%20BindingNonOptimal/Source%26BSPProbesMappingMultipleTimesOrNotBothToBSandNormalGenome.txt%0D%0A) [Accessed April 5, 2018].
- Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), pp.177–186.
- Bublitz, M., Morth, J.P. & Nissen, P., 2011. P-type ATPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(22), pp.3917–3917. Available at: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.102921>.
- Cetin, I., Cozzi, V. & Antonazzo, P., 2008. Infertility as a Cancer Risk Factor - A Review. *Placenta*, 29(SUPPL.2), pp.169–177.
- Chang, X. et al., 2010. Identification of hypermethylated genes associated with

6. Literatur

- cisplatin resistance in human cancers. *Cancer Research*, 70(7), pp.2870–2879.
- Chen, Y.A. et al., 2013. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*, 8(2), pp.203–209.
- Cibula, D. et al., 2011. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: Review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 17(1), pp.55–67.
- Cornelison, R., Llana, D. & Landen, C., 2017. Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), p.2171. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2171>.
- Davis, C. et al., 2012. Variants observed for STR locus SE33: A concordance study. *Forensic Science International: Genetics*, 6(4), pp.494–497. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.12.002>.
- Dedeurwaerder, S. et al., 2014. A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing. *Briefings in bioinformatics*, 15(6), pp.929–941.
- Earp, M.A. & Cunningham, J.M., 2015. DNA methylation changes in epithelial ovarian cancer histotypes. *Genomics*, 106(6), pp.311–321. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.09.001>.
- Eastman, A., 1987. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology and Therapeutics*, 34(2), pp.155–166.
- Eisenhauer, E.A. et al., 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 45(2), pp.228–247. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>.
- Erichsen, H.C. & Chanock, S.J., 2004. SNPs in cancer research and treatment. *British Journal of Cancer*, 90(4), pp.747–751.
- Feeley, K.M. & Wells, M., 2001. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*, 38(2), pp.87–95. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/11207821/>.
- Flanagan, J.M. et al., 2017. Platinum-based chemotherapy induces methylation

6. Literatur

- changes in blood DNA associated with overall survival in patients with ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(9), pp.2213–2222.
- Gately, D.P. & Howell, S.B., 1993. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *British Journal of Cancer*, 67(6), pp.1171–1176.
- Goldstein, L.J. et al., 1989. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 81(2), pp.116–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2562856>.
- Gore, M.E. et al., 1989. Cisplatin/carboplatin cross-resistance in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 60(5), pp.767–769.
- Gospodarowicz, M.K. et al., 2004. The Process for Continuous Improvement of the TNM Classification. *Cancer*, 100(1), pp.1–5.
- Gvozdeva, O. V. et al., 2014. 42- and 63-bp anti-MDR1-siRNAs bearing 2'-OMe modifications in nuclease-sensitive sites induce specific and potent gene silencing. *FEBS Letters*, 588(6), pp.1037–1043. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.015>.
- Harper, K.N., Peters, B.A. & Gamble, M. V., 2013. Batch effects and pathway analysis: Two potential perils in cancer studies involving DNA methylation array analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 22(6), pp.1052–1060.
- Ishida, S. et al., 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), pp.14298–14302. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.162491399>.
- Jaenisch, R. & Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33, pp.245–254. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ng1089>.
- Jayson, G.C. et al., 2014. Ovarian cancer. *The Lancet*, 384(9951), pp.1376–1388. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62146-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62146-7).
- Jazaeri, A.A., 2005. Gene Expression Profiles Associated with Response to Chemotherapy in Epithelial Ovarian Cancers. *Clinical Cancer Research*, 11(17), pp.6300–6310. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-04-2682>.

6. Literatur

- Kalayda, G. V. et al., 2008. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*, 8, pp.1–12.
- Kasherman, Y., Sturup, S. & Gibson, D., 2009. Is Glutathione the Major Cellular Target of Cisplatin? A Study of the Interactions of Cisplatin with Cancer Cell Extracts. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(14), pp.4319–4328. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm900138u>.
- Kelland, L.R., 2000. Preclinical Perspectives on Platinum Resistance. *Drugs*, 59(Supplement 4), pp.1–8. Available at: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200059004-00001>.
- Kobayashi, H. et al., 2008. A randomized study of screening for ovarian cancer: A multicenter study in Japan. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18(3), pp.414–420.
- Koch, K.A. & Thiele, D.J., 1999. Functional analysis of a homopolymeric (dA-dT) element that provides nucleosomal access to yeast and mammalian transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), pp.23752–23760.
- Komatsu, M. et al., 2000. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Research*, 60(5), pp.1312–1316.
- Lalande, M. & Calciano, M.A., 2007. Molecular epigenetics of Angelman syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7–8), pp.947–960. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6460-0>.
- Leek, J.T. et al., 2010. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nature Reviews Genetics*, 11(10), pp.733–739. Available at: <http://www.nature.com/articles/nrg2825>.
- Lengyel, E., 2010. Ovarian cancer development and metastasis. *American Journal of Pathology*, 177(3), pp.1053–1064. Available at: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100105>.
- Li, Y.Q. et al., 2018. Copper efflux transporters ATP7A and ATP7B: Novel biomarkers for platinum drug resistance and targets for therapy. *IUBMB Life*, 70(3), pp.183–191.

6. Literatur

- Liao, Y. et al., 2014. Hypomethylation signature of tumor-initiating cells predicts poor prognosis of ovarian cancer patients. *Human molecular genetics*, 23(291), pp.1894–906. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24256813>.
- Lin, X. et al., 2002. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular pharmacology*, 62(5), pp.1154–1159.
- van der Mark, V.A. et al., 2017. Phospholipid flippases attenuate LPS-induced TLR4 signaling by mediating endocytic retrieval of Toll-like receptor 4. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), pp.715–730. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2360-5>.
- McCluggage, W.G., 2008. My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. *Journal of Clinical Pathology*, 61(2), pp.152–163.
- Mellor, D.P., 1943. The stereochemistry of square complexes. *Chemical Reviews*, 33(2), pp.137–183.
- Mørch, L.S., 2009. Hormone Therapy and Ovarian Cancer. *JAMA*, 302(3), p.298. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2009.1052>.
- Moreno-Smith, M. & Halder, J., 2013. ATP11B mediates platinum resistance in ovarian cancer. *The Journal of clinical Investigation*, 123(5). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3635722/>.
- Mueller, O. & Schroeder, A., 2004. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application. *Agilent application note*, pp.1–8.
- Müller, D. & Strauss, S., 2013. METHOD OF AMPLIFICATION OF A SHORT TANDEMI REPEAT LOCUS. , 1(19).
- Owatari, S. et al., 2007. Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer. *Cancer Research*, 67(10), pp.4860–4868. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/10/4860.abstract>.
- Ozols, R.F., 1991. Ovarian cancer: new clinical approaches. *Cancer Treatment Reviews*, 18(SUPPL. A), pp.77–83.
- Panatala, R., Hennrich, H. & Holthuis, J.C.M., 2015. Inner workings and biological impact of phospholipid flippases. *Journal of Cell Science*, 128(11), pp.2021–2032.

6. Literatur

Available at: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.102715>.

Plumb, J.A. et al., 2000. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2[prime]-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res.*, 60, pp.6039–6044.

Prat, J. & FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2015. Staging Classification for Cancer of the Ovary, Fallopian Tube, and Peritoneum: Abridged Republication of Guidelines From the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). *Obstetrics and gynecology*, 126(1), pp.171–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26241270>.

Price, M.E. et al., 2013. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics and Chromatin*, 6(1), pp.1–15.

Ramus, S.J. et al., 2008. Consortium analysis of 7 candidate SNPs for ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, 123(2), pp.380–388. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.23448>.

Risch, N.J., 2000. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405(6788), pp.847–856. Available at: <http://www.nature.com/articles/35015718>.

Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2017. Krebs in Deutschland für 2013/2014. , (11), p.154. Available at: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile.

Rosenberg, B., Van Camp, L. & Krigas, T., 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode [17]. *Nature*, 205(4972), pp.698–699.

Samimi, G. et al., 2004. Increased Expression of the Copper Efflux Transporter ATP7A Mediates Resistance to Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin in Ovarian Cancer Cells Increased Expression of the Copper Efflux Transporter ATP7A Mediates Resistance to Cisplatin, Carboplatin. *Clinical Cancer Research*, 10(14), pp.4661–4669. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/14/4661.abstract>.

Sedláková, I. et al., 2015. Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp,

6. Literatur

- MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 25(2), pp.236–243. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00009577-201502000-00009>.
- Seeber, L.M.S. & Van Diest, P.J., 2012. Epigenetics in ovarian cancer. *Methods in Molecular Biology*, 863(April), pp.253–269. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcan.2017.08.003>.
- Shen, D.-W. et al., 2012. Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews*, 64(3), pp.706–721. Available at: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.111.005637>.
- Shih, I.-M. & Kurman, R.J., 2004. Ovarian Tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*, 164(5), pp.1511–1518. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000294401063708X>.
- Siddik, Z.H., 2003. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47 REV. ISS. 6), pp.7265–7279.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A., 2015. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1), pp.5–29. Available at: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21254>.
- Singer, G. et al., 2003. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(6), pp.484–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644542>.
- Singer, G. et al., 2005. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: A mutational analysis with immunohistochemical correlation. *American Journal of Surgical Pathology*, 29(2), pp.218–224.
- Song, H. et al., 2009. A genome-wide association study identifies a new ovarian cancer susceptibility locus on 9p22.2. *Nature Genetics*, 41(9), pp.996–1000.
- Spivakov, M. & Fisher, A.G., 2007. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), pp.263–271. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2046>.

6. Literatur

- Staebler, A. & Diebold, J., 2007. Molekularpathologie der epithelialen Ovarialneoplasien. *Der Pathologe*, 28(3), pp.180–186. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00292-007-0910-1>.
- Stefanou, D.T. et al., 2015. Aberrant dna damage response pathways may predict the outcome of platinum chemotherapy in ovarian cancer. *PLoS ONE*, 10(2), pp.1–19.
- Sun, C.C. et al., 2005. Rankings and symptom assessments of side effects from chemotherapy: Insights from experienced patients with ovarian cancer. *Supportive Care in Cancer*, 13(4), pp.219–227. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00520-004-0710-6>.
- Taberlay, P.C. & Jones, P.A., 2011. DNA methylation and cancer. *Progress in Drug Research*, 67, pp.1–23.
- Tang, J. et al., 2015. Global DNA methylation profiling technologies and the ovarian cancer methylome. In M. Verma, ed. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, pp. 653–675. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_34.
- Tang, X. et al., 1996. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5267), pp.1495–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8633245>.
- ThermoScientific, 2011. NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals*, pp.1–2. Available at: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>.
- Travis, W.D., Brambilla, E. & Harris, C.C., 2004. World Health Organization Classification of Tumours. *Thymus and Heart Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*, 978, pp.92–832.
- Wagner, U., Harter, P., Hilpert, F., Mahner, S., Reuß, A., du Bois, A., et al., 2013. S3-Guideline on Diagnostics, Therapy and Follow-up of Malignant Ovarian Tumours. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 73(09), pp.874–889. Available at: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>.
- Wagner, U., Harter, P., Hilpert, F., Mahner, S., Reuß, A., Du Bois, A., et al., 2013. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 73(9), pp.874–889.

6. Literatur

- Winham, S.J. et al., 2014. Genome-Wide Investigation of Regional Blood-Based DNA Methylation Adjusted for Complete Blood Counts Implicates BNC2 in Ovarian Cancer. *Genetic Epidemiology*, 38(5), pp.457–466.
- Zhi, D. et al., 2013. SNPs located at CpG sites modulate genome-epigenome interaction. *Epigenetics*, 8(8), pp.802–806.
- Zhou, Y., Bizzaro, J.W. & Marx, K.A., 2004. Homopolymer tract length dependent enrichments in functional regions of 27 eukaryotes and their novel dependence on the organism DNA (G+C)% composition. *BMC Genomics*, 5, pp.1–16.

7. Abbildungen

ABBILDUNG 1.1: DIGNITÄTSGRADE VON SERÖSEN NEOPLASIEEN DES OVARS.....	2
ABBILDUNG 1.2: TUMORE DES OVARS.....	3
ABBILDUNG 1.3: GENETISCHE VARIATION ZWISCHEN HIGH- UND LOW-GRADE OVARIALKARZINOMEN.....	7
ABBILDUNG 1.4: WIRKUNG VON CISPLATIN IN TUMORZELLEN	11
ABBILDUNG 1.5: SIGNALKASKADE AUSGELÖST DURCH CISPLATIN,	12
ABBILDUNG 1.6: RESISTENZENTWICKLUNG AUF CISPLATIN IN TUMORZELLEN	13
ABBILDUNG 1.7: WIRKUNGSWEISE VON ATP11B IN PLATINRESISTENTEN TUMORZELLEN	15
ABBILDUNG 1.8: METHYLIERUNGSLEVEL AN DER CG21570597-SITE IM INTRON DES ATP11A-GENS AUF PLATIN RESISTENTE UND SENSITIVE OVARIALKARZINOME.....	19
ABBILDUNG 1.9: FLUSSDIAGRAMM ARBEITSSCHRITTE.....	20
ABBILDUNG 2.1: UNTERSCHIEDLICHE RESISTENZLEVEL AUF CISPLATIN BEI 16 ZELLINIEN	24
ABBILDUNG 2.2: ABLAUF EINER BISLUFITKONVERTIERUNG..	31
ABBILDUNG 2.3: GEZEIGT WIRD EINE ANALYSE DES GENOME BROWSERS.	33
ABBILDUNG 2.4: PYROGRAMM MIT „RESTART“ UND „MINUS SHIFT“ PHÄNOMEN AUFGRUND UNSPEZIFISCH BINDENDER PRIMER.....	34
ABBILDUNG 2.5: HISTOGRAMM ENTWORFEN VOM DEM 'ASSAY-SETUP' DER PYROMARK Q96 ID SOFTWARE.....	38
ABBILDUNG 2.6: SCHEMATISCHE ZEICHNUNG DER VACUUM WORKSTATION.....	41
ABBILDUNG 2.7: PYROMARK Q96 CARTRIDGE KORREKT BEFÜLLT.....	43
ABBILDUNG 2.8: BEIM ENZYMATISCHEN NUKLEOTIDEINBAU ENTSTEHT PYROPHOSPHAT IM ÄQUIMOLAREN VERHÄLTNISS ZUR IN DIE DNA EINGEBAUTE NUKLEOTIDMENGE	44
ABBILDUNG 2.9: KATALYSE DER SULFURYLASE UND LUCIFERASE ZUR SIGNALGENERIERUNG.....	44
ABBILDUNG 2.10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CONTROL-OLIG DER FIRMA QIAGEN	46
ABBILDUNG 2.11: SCREENSHOT DES ‚CpG‘-SETUP DER "PYROMARKQ96 ID"- SOFTWARE NACH ERFOLGTER SEQUENZIERUNG.....	48
ABBILDUNG 2.12: SCHMELZKURVENANALYSE FÜR PRIMER ETABLIERUNG VON ATP11B MITTELS STANDARDKURVE.	53
ABBILDUNG 2.13: STANDARDKURVE VON ATP11B MIT EINER BERECHNETEN EFFIZIENZ VON 2,152.	54
ABBILDUNG 3.1: BEISPIELHAFT GEZEIGTE H&E-FÄRBUNGEN VON HIGH-GRADE SERÖSEN TUMORPROBEN.....	61
ABBILDUNG 3.2: NANODROP- & AGILENT-MESSUNGEN ZUR QUALITÄT UND QUANTITÄTSSICHERUNG.....	65
ABBILDUNG 3.3: 2%AGAROSEGELE VON TUMORPROBEN NACH AMPLIFIZIERUNG MITTELS BIOTINYLIERTEN PRIMERN	68
ABBILDUNG 3.4: BEISPIELHAFTHE HISTOGRAMME DER PYROMARK SEQUENZIERUNG.....	72
ABBILDUNG 3.5: METHYLIERUNGSLEVEL VON PLATINSENSITIVEN VERSUS PLATINRESISTENTEN PROBEN	74
ABBILDUNG 3.6: EINZELNE METHYLIERUNGSLEVEL DER TUMORE	77
ABBILDUNG 3.7: qRT-PCR VON ATP11A IN 10 ZELLINIEN MIT UNTERSCHIEDLICHER PLATINRESISTENZ.	81
ABBILDUNG 3.8: qRT-PCR VON ATP11B IN 10 ZELLINIEN MIT UNTERSCHIEDLICHER PLATINRESISTENZ.....	82
ABBILDUNG 3.9: RELATIVE EXPRESSION VON ATP11A IN PLATINRESISTENTEN VERSUS PLATINSENSITIVEN HIGH-GRADE- SERÖSEN OVARIALTUMOREN.	85
ABBILDUNG 3.10: RELATIVE EXPRESSION VON ATP11B IN PLATINRESISTENTEN VERSUS PLATINSENSITIVEN HIGH-GRADE- SERÖSEN OVARIALTUMOREN.	88

7. Abbildungen

8. Tabellen

8. Tabellen

TABELLE 1.1: TNM- UND FIGO-KLASSIFIKATION VON OVARIALTUMOREN	5
TABELLE 2.1: DURCHFÜHRUNG DER HÄMATOXILLIN & EOSIN FÄRBUNG	26
TABELLE 2.2: DURCHFÜHRUNG DER RNA/DNA ISOLATION	27
TABELLE 2.3: DURCHFÜHRUNG DER CDNA SYNTHESE	30
TABELLE 2.4: BISULFITKONVERTIERUNG MITTELS EZ-DNA METHYLATION KIT VON ZYMO RESEARCH	32
TABELLE 2.5: PRIMERSEQUENZEN	35
TABELLE 2.6: ZUSAMMENSETZUNG DES MASTERMIX	35
TABELLE 2.7: PCR-PROTOKOLL NACH PYROMARK PCRKIT MITTELS DES BIORAD T100 THERMAL CYCLER.....	36
TABELLE 2.8: HERSTELLUNG VON 10XTBE PUFFER	37
TABELLE 2.9: HERSTELLUNG 10X AGAROSE BLAUPUFFER.....	37
TABELLE 2.10: HERSTELLUNG DER BINDUNGS-LÖSUNG	39
TABELLE 2.11: HERSTELLUNG DER ANNEALING-LÖSUNG	40
TABELLE 2.12: PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR PYROMARK Q96 VACUUM WORKSTATION DER FIRMA QIAGEN	40
TABELLE 2.13: DURCHFÜHRUNG DER ISOLATION DES BIOTINYLIERTEN DNA-STRANGS MITTELS VACUUM-WORKSTATION	42
TABELLE 2.14: PRIMERSEQUENZEN DER VERWENDETEN GENE FÜR DIE QRT-PCR.....	50
TABELLE 2.15: PIPETTIERSCHEMA MASTERMIX BEI QRT-PCR	51
TABELLE 2.16: QRT-PCR PROGRAMM	51
TABELLE 3.1: TUMORKOLLEKTIV DER PLATINRESISTENTEN TUMOREN	57
TABELLE 3.2: TUMORKOLLEKTIV DER PLATINSENSITIVEN TUMORE	58
TABELLE 3.3: QUALITÄT- UND QUANTITÄTMERKMALE DER 22 PLATINRESISTENTEN TUMORPROBEN	63
TABELLE 3.4: QUALITÄT UND QUANTITÄTMERKMALE DER 24 PLATINSENSITIVEN TUMORE	64
TABELLE 3.5: POSITIONIERUNG DER TUMORPROBEN IM 2% AGAROSEGEL	68
TABELLE 3.6: DESKRIPTIVE STATISTIK VON METHYLIERUNGSLEVELN [%] BEI PLATINRESISTENTEN UND PLATINSENSITIVEN TUMOREN	73
TABELLE 3.7: METHYLIERUNGSLEVEL DER EINZELNEN TUMORE	76
TABELLE 3.8: 450K-ARRAY UND PYROSEQUENCING METHYLIERUNGSLEVEL IM VERGLEICH.....	78
TABELLE 3.9: ÜBERSICHT ÜBER SENSIBILITÄT AUF PLATIN; QUALITÄT DER RNA, RELATIVE EXPRESSION VON ATP11B & ATP11A DER 10 ZELLINIEN.....	80
TABELLE 3.10: EXPRESSIONSLEVEL ATP11A & ATP11B IN 46 OVARIALKARZINOMEN.....	83
TABELLE 3.11: DESKRIPTIVE STATISTIK VON ATP11A BEI PLATINSENSITIVEN(S) VERSUS PLATINRESISTENTEN(R) HIGH-GRADE-SERÖSEN OVARIALKARZINOM	86
TABELLE 3.12: DESKRIPTIVE STATISTIK VON ATP11B BEI PLATINSENSITIVEN(S) VERSUS PLATINRESISTENTEN(R) HIGH-GRADE-SERÖSEN OVARIALKARZINOM	89

9. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik, unter der Leitung von Prof. Dr. Olaf Rieß durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Michael Bonin und mich. Die Zusammenstellung der Kohorten Gruppen erfolgte durch mich.

Die Durchführung der Methylierungsanalysen mittels des humanen 450k-Array von Illumina und seine Auswertung erfolgte durch Dr. Michael Walter, AG Bonin, Medizinische Genetik.

Die RNA Qualitätskontrollen mittels des Bioanalyzer 2100 der Firma Agilent Technologies wurden von Vanessa Vosseler und Sven Poths, Core Facility für NGS und Microarrays, Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik durchgeführt. Sämtliche weitere Versuche wurden nach Einarbeitung durch Karin Schäferhoff, Sven Poths und Vanessa Vosseler sowie verschiedener weiterer Labormitglieder von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.



Tübingen den 24.10.2018

10. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Mentor und Betreuer Dr. Michael Bonin danken, der mich in die medizinische Grundlagenforschung eingeführt und von Anfang an exzellent betreut, beraten und gefördert hat.

Ein großer Dank geht an meinen Doktorvater Prof.Dr. Olaf Rieß, welcher diese Arbeit ermöglicht hat.

Darüber hinaus möchte ich insbesondere Karin Schäferhoff und Sven Poths sowie Vanessa Vosseler für die Einführung in zahlreiche Methoden und die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit danken. Mein Dank gilt ebenfalls allen weiteren Mitgliedern der Forschungseinheit des Instituts für Medizinische Genetik und angewandte Genomik für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ich danke Prof. Dr. Wallwiener, Prof. Dr. Brucker sowie Prof. Dr. Fend für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Tumorproben sowie Einblick in die Patientenakten.

Ein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stähler, welche nicht nur eine professionelle Validierung der histopathologischen Schnitte durchführte, sondern mich auch exzellent in allen aktuellen Neuerungen der histopathologischen Entwicklungen der Ovarialkarzinome beraten und eingeführt hat.

Schließlich danke ich dem IZKF-Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät Tübingen, insbesondere Prof. Dr. Knipper, welche mir viele Hürden dieser Arbeit genommen und mich tatkräftig in finanzieller sowie wissenschaftlicher Hinsicht unterstützt haben.

Diese Arbeit wäre nicht ohne die unglaublich große Unterstützung meiner Familie entstanden. Danke Henry für das beständige Mitdenken, Beraten und Ermuntern weiter zu machen. Die vielen Stunden, welche meine Eltern und Schwiegereltern die Fäden zuhause fest in der Hand hielten, damit ich diese Arbeit verfassen konnte, lassen sich nicht zählen. Einen riesengroßen Dank dafür. Und schlussendlich Danke an Merle und Peer, die mich jeden Tag daran erinnern, was das Leben lebenswert macht.