

**Identifizierung neuer Biomarker für das Ovarialkarzinom –  
Primärtumorbasierte Analysen und blutbasierte  
*„Real-Time-Liquid-Biopsy“***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
der Fakultät für Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Jan Dominik Kuhlmann  
aus Essen

Dezember 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: **Herr Prof. Dr. Michael Ehrmann**

1. Gutachter: **Frau Prof. Dr. rer. nat. Sabine Kasimir-Bauer**
2. Gutachter: **Herr Prof. Dr. rer. nat. Ralf Küppers**
3. Gutachter: **Herr Prof. Dr. med. Stephan Hahn**

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2013

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
1.1	Das Ovarialkarzinom .....	10
1.2	Tumorzelldisseminierung .....	12
1.3	“Loss of Heterozygosity“ (LOH).....	16
1.4	Zirkulierende DNA .....	19
1.5	microRNA.....	21
1.6	Zielsetzung.....	26
2	Patientinnen, Material und Methoden.....	27
2.1	Patientinnen .....	27
2.2	Material .....	28
2.3	Methoden .....	31
3	Ergebnisse .....	55
3.1	LOH-Analyse im Primärtumorgewebe .....	55
3.2	LOH-Analyse im Blut.....	60
3.3	microRNA-Analyse im Blut.....	66
3.4	Molekulare Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen .....	87
4	Diskussion .....	97
4.1	LOH-Analyse im Primärtumorgewebe .....	97
4.2	LOH-Analyse im Blut.....	100
4.3	microRNA-Analyse im Blut.....	105
4.4	Nachweis und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen .....	113
5	Zusammenfassung.....	117
6	Literaturverzeichnis .....	119
7	Anhang.....	138
7.1	Eigene Publikationen.....	138
7.2	Danksagung .....	141
7.3	Lebenslauf.....	142
7.4	Eidesstattliche Erklärung.....	144

# Abkürzungsverzeichnis

ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
°C	Grad Celsius
AUC	area under the curve
bp	Basenpaare
BRCA	Breast Cancer Early Onset
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans
CA 125	carbohydrate antigen 125
cDNA	complementary DNA
CI	confidence interval
Ct	cycle threshold
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTZ	disseminierte Tumorzellen
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ERCC1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FFPET	formalin fixed paraffin embedded tissue
FFT	fresh frozen tissue
FIGO	International Federation of Obstetricians and Gynaecologists
h	Stunde
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEX	Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein

HMF	hochmolekulare Fraktion
ISHAGE	International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
kb	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
kV	Kilovolt
LOH	loss of heterozygosity
M	mol/l
M6P/IGF2R	Mannose-6-Phosphat/Insulin-Like-Growth Factor II Receptor
min	Minute
miRNA	microRNA
MNZ	mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
MUC-1	Mucin-1
neg	negativ
NER	nucleotide excision repair
nm	Nanometer
NMF	niedermolekulare Fraktion
nt	Nukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
OS	overall survival, Gesamtüberleben
OSE	ovarian surface epithelium
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFS	progressionsfreies Überleben
pos	positiv

pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RISC-Komplex	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNU2-1f	U2 small nuclear RNA fragments
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROX	Carboxy-X-Rhodamin
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
Taq	Thermus aquaticus
Tm	Schmelztemperatur
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
TMARA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
U	Unit
XPF	Xeroderma pigmentosum group A
zirDNA	zirkulierende DNA
ZTZ	zirkulierende Tumorzellen

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Konzept der Tumorzellmetastasierung .....	14
Abbildung 1-2: Prinzip eines Heterozygotieverlustes (LOH) .....	16
Abbildung 1-3: Ursprung und mögliche Alterationen zirkulierender DNA .....	20
Abbildung 1-4: Prozessierung und Wirkungsweise von microRNA.....	22
Abbildung 1-5: microRNA und die Pathogenese des Ovarialkarzinoms .....	24
Abbildung 2-1: Säulenbasierte DNA-Isolation.....	31
Abbildung 2-2: Workflow zur LOH-Analyse.....	35
Abbildung 2-3: Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.....	39
Abbildung 2-4: Workflow zur miRNA-Microarrayanalyse .....	42
Abbildung 2-5: Darstellung des Agilent Bioanalyzer 2100 .....	44
Abbildung 2-6: Prinzip des miScript-Assays .....	47
Abbildung 2-7: Temperaturzyklus und Amplifikationskurven der qRT-PCR.....	48
Abbildung 2-8: Prinzip zur Aufreinigung und Charakterisierung von ZTZ .....	50
Abbildung 2-9: Workflow zur Anreicherung und Detektion von ZTZ .....	51
Abbildung 3-1: Prinzip der LOH-Detektion.....	56
Abbildung 3-2: LOH-Inzidenz im primären Ovarialkarzinomgewebe .....	57
Abbildung 3-3: Korrelation der LOH-Inzidenz mit DTZ im Knochenmark.....	59
Abbildung 3-4: Quantifizierung zirkulierender DNA im Serum .....	62
Abbildung 3-5: LOH-Inzidenz in fraktionierter zirkulierender DNA .....	63
Abbildung 3-6: LOH proximal zum M6P/IGF2R und das OS .....	65
Abbildung 3-7: Elektropherogramm zirkulierender RNA .....	67
Abbildung 3-8: miR-16 Signal in Abhängigkeit zur RNA-Aufkonzentrierung.....	69
Abbildung 3-9: Repräsentative Dissoziationskurven der miRNA-Kandidaten.....	71
Abbildung 3-10: Fragmentanalyse nach Amplifikation von Biomarkerkandidaten .....	72
Abbildung 3-11: Thermostabilität syn-cel-miR-54 .....	75
Abbildung 3-12: „Proof-of-Principle“ für das Spike-In Konzept .....	76
Abbildung 3-13: Sequenzanalyse des miR-1246 Amplikons .....	77
Abbildung 3-14: Fragmentanalyse nach miR-1246 Amplifikation .....	78
Abbildung 3-15: Expression zirkulierender RNU2-1f im Serum .....	80
Abbildung 3-16: ROC-Analyse (RNU2-1f) zum Zeitpunkt der Primärdiagnose.....	81
Abbildung 3-17: Subgruppenanalyse zur RNU2-1f-Expressionsdynamik.....	82

Abbildung 3-18: RNU2-1f Expressionsdynamik und das OS .....	82
Abbildung 3-19: RNU2-1f Expressionsdynamik und das DFS .....	83
Abbildung 3-20: RNU2-1f Proteasesensitivitätstest .....	84
Abbildung 3-21: RNU2-1f im primären Ovarialkarzinomgewebe (FFT) .....	85
Abbildung 3-22: RNU2-1f im primären Ovarialkarzinomgewebe (FFPE) .....	86
Abbildung 3-23: Präsenz von ZTZ gemäß <i>AdnaTest OvarianCancer</i> .....	88
Abbildung 3-24: ROC-Analyse zur ERCC1-Expression.....	88
Abbildung 3-25: Darstellung der ERCC1-Positivität .....	89
Abbildung 3-26: ERCC1-Positivität und der ZTZ-Status.....	90
Abbildung 3-27: Subgruppenanalyse zur ERCC1-Expressionsdynamik.....	90
Abbildung 3-28: ZTZ-Präsenz vor Operation und das OS .....	91
Abbildung 3-29: ZTZ-Präsenz nach Chemotherapie und das DFS.....	91
Abbildung 3-30: ZTZ-Präsenz nach Chemotherapie und das OS.....	92
Abbildung 3-31: ERCC1-Expressionsdynamik und das DFS.....	93
Abbildung 3-32: ERCC1-Expressionsdynamik und das OS .....	93
Abbildung 3-33: Expression von EMT- bzw. Stammzellmarkern .....	95
Abbildung 3-34: ZTZ-Status und Expression von EMT- bzw. Stammzellmarkern ....	96

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: FIGO-Klassifikation.....	10
Tabelle 1-2: Antikörpertherapien für das Ovarialkarzinom.....	12
Tabelle 1-3: Mikrosatellitenmarker für die LOH-Analyse .....	18
Tabelle 2-1: Klinische Daten der Ovarialkarzinompatientinnen .....	27
Tabelle 2-2: Berechnung des Allel-Verhältnisses .....	37
Tabelle 2-3: Versuchsvorschrift für den Proteaseverdau.....	49
Tabelle 2-4: Reaktionsansatz für die ERCC1-Analyse .....	53
Tabelle 2-5: Temperaturzyklus die ERCC1-Analyse .....	53
Tabelle 3-1: Patientinnenkollektiv für die LOH-Analyse im Primärtumor .....	55
Tabelle 3-2: Klinische Relevanz der LOH im Primärtumor .....	58
Tabelle 3-3: Patientinnenkollektiv für die LOH-Analyse im Blut.....	61
Tabelle 3-4. Klinische Signifikanz zirkulierender LOH .....	64
Tabelle 3-5: Schema zur Einkonzentrierung von RNA aus Serum .....	68
Tabelle 3-6: Differentiell exprimierte miRNA-Kandidaten im Serum .....	70
Tabelle 3-7: Ansatz zur Überprüfung der Thermostabilität .....	74
Tabelle 3-8: Simulation unterschiedlicher RNA- Aufreinigungseffizienz .....	76
Tabelle 3-9: Patientinnenkollektiv für die RNU2-1f Analyse .....	79
Tabelle 3-10: Patientinnenkollektiv für die ERCC1-Analyse .....	87
Tabelle 3-11: ERCC1 und Platinresistenz .....	92
Tabelle 3-12: ZTZ-Status und DTZ-Präsenz .....	94
Tabelle 3-13: Expression von EMT- bzw. Stammzellmarkern .....	95

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Ovarialkarzinom

Der Begriff Ovarialkarzinom beschreibt eine maligne Entartung der Eierstöcke und wird sowohl in den vereinigten Staaten (Cannistra, 1993), als auch in Europa (Black et al., 1997) als führende Todesursache gynäkologischen Malignome angesehen. In Deutschland erkranken jährlich etwa 9000 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 65 Jahren an dieser Tumorentität. Das Ovarialkarzinom wird postoperativ mit Hilfe histopathologischer sowie pathologisch-anatomischer Kriterien durch die FIGO-Klassifikation eingeteilt (Tabelle 1-1). Bleibt der Tumor auf die Ovarien begrenzt, so wird er dem Stadium FIGO I zugeordnet. Wird zusätzlich ein Befall des Beckens festgestellt, handelt es sich um eine Erkrankung des Stadiums FIGO II. Bei einem zusätzlichen Befall des Peritoneums wird FIGO III diagnostiziert und bei der Inzidenz von Fernmetastasen (ausgenommen Peritonealmetastasen) liegt eine Erkrankung des Stadiums FIGO IV vor. In frühen Stadien ist diese Krankheit asymptomatisch, so dass im Schnitt mehr als 70% der Primärdiagnosen erst in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III und IV) gestellt werden können. Die Fünfjahres-Überlebensrate im Stadium FIGO III beträgt 25 – 40%, im Stadium FIGO IV jedoch nur noch 11%. Das Konzept Ovarialkarzinom umfasst eine sehr große und heterogene Gruppe von Tumoren mit unterschiedlichem Ursprung und unterschiedlicher Biologie.

Tabelle 1-1: FIGO-Klassifikation

<b>FIGO I</b>	der Tumor befällt ein oder beide Eierstöcke
<b>FIGO II</b>	der Tumor breitet sich in das Becken aus
<b>FIGO III</b>	der Tumor breitet sich in der Bauchhöhle aus (peritoneale Metastasierung) oder befällt die Lymphknoten
<b>FIGO IV</b>	der Tumor breitet sich über die Bauchhöhle hinaus aus (Fernmetastasierung)

Die Mehrzahl der Ovarialkarzinome ist epithelialen Ursprungs (85 - 90%), wohingegen Keimzelltumoren, Stromatumoren oder Sarkome eine eher untergeordnete Prävalenz aufweisen (Chan et al., 2006). Innerhalb der Gruppe der epithelialen Ovarialkarzinome kann auf Grund der histomorphologischen Differenzierung eine weitere Unterteilung in seröse, muzinöse, endometrioid sowie klarzellige Karzinome vorgenommen werden (Seidman and Kurman, 2003). Das Standard Therapiekonzept eines Ovarialkarzinoms umfasst zunächst eine radikale Operation, die auf eine makroskopische Kompletresektion abzielt, gefolgt von Platin- bzw. Paclitaxel-haltiger systemischer Chemotherapie (Neijt et al., 1997; du Bois et al., 1999; du Bois et al., 2005). Der postoperative Rest wird bislang als wichtigster Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms angesehen (du Bois et al., 2009). Sowohl eine gesteigerte Radikalität des Primäreingriffes, als auch eine Platin- bzw. Paclitaxel-haltige Kombinationschemotherapie konnten bisher bei einem Teil der Patientinnen die Prognose verbessern (du Bois et al., 1999). Ebenso konnten neben diesem Standardkonzept der Behandlung innovative und multimodale Ansätze im Sinne einer individualisierten zielgerichteten Therapie entwickelt werden. So gilt die ergänzende Verwendung von Antikörpern, die therapeutische Antigene ovarieller Tumoren abzielen, als weitere Option für eine Therapieoptimierung (Tabelle 1-2). Trotz fortgeschrittener Behandlung beträgt die Rezidivrate etwa 50% (Martin and Schilder, 2009), wobei generell 15 - 20% der Patientinnen platinresistent sind (Bookman, 1999), was bisher jedoch nur retrospektiv erkannt wird. Somit ist dem Ovarialkarzinom eine sehr schlechte Prognose zuzuordnen und die Etablierung neuer Biomarkerkonzepte wäre äußerst wünschenswert. Daher ist es von großem Interesse, innovative primärtumor- bzw. blutbasierte Biomarkerkonzepte zu entwickeln, die uns Aufschluss über Prognose, Rezidiventwicklung bzw. Therapieansprechen liefern oder im Sinne eines Therapiemonitoring genutzt werden können.

Tabelle 1-2: Antikörpertherapien für das Ovarialkarzinom

Antikörper	Zielantigen	Spezifität	Referenz
<b>Bevacizumab</b>	VEGF	monospezifisch	(Burger et al., 2007)
<b>Oregomovab</b>	CA-125	monospezifisch	(Noujaim et al., 2001; Ehlen et al., 2005; Berek et al., 2009)
<b>Abagovomab</b>	CA-125 Surrogat- Antigen	monospezifisch	(Pfisterer et al., 2006)
<b>HEA125</b>	EpCAMxCD3	bispezifisch	(Marme et al., 2002)
<b>Catumaxumab</b>	EpCAMxCD3	bispezifisch, trifunktional	(Borges et al., 2007; Wimberger et al., 2009)

## 1.2 Tumorzelldisseminierung

Abbildung 1-1 zeigt das allgemeine Konzept der Metastasierung epithelialer Tumoren (Pantel et al., 2009). Gemäß diesem Modell verlassen Tumorzellen schon in frühen Stadien die Primärtumorkläsion und gelangen über die Blutbahn in sekundäre Organe, bevorzugt z.B. in das Knochenmark (KM). Hier organisieren sich diese entweder in Form einzelner disseminierter Tumorzellen (DTZ), oder in Form von Zellclustern, den Mikrometastasen. Es wird vermutet, dass DTZ meist in einer Art Ruhezustand, der sogenannten „*Dormancy*“ persistieren. Auf der Ebene der einzelnen DTZ beschreibt die *Dormancy* einen ruhenden, nicht proliferativen Zustand (Tumorzell-*Dormancy*), wohingegen *Dormancy* auf der Ebene der Mikrometastase als ein Gleichgewichtszustand zwischen Proliferation und Apoptose verstanden wird (Tumor-Mass-*Dormancy*). Für die Entstehung einer *Dormancy* gibt es bislang verschiedene mögliche Erklärungsmodelle: 1. DTZ invasiver Karzinome antworten mit Stresssignalen auf die Disseminierung bzw. auf einen wachstumshinhibierenden Einfluss des extrazellulären Milieus im Zielorgan und induzieren *Dormancy*, 2. Stressfaktoren im Tumor (z.B. Hypoxie) wirken auf primäre Tumorzellen und programmieren neuerlich disseminierende Tumorzellen schon im Vorfeld auf den Zustand der *Dormancy*, 3. eine

frühe Tumorzell dissemination bedingt eine DTZ-Population, die noch unfähig für ein metastatisches Wachstum ist und somit in einem „Arrestzustand“ verharrt und erst weitere genetische Veränderungen für eine klonale Expansion erwerben muss (Bragado et al., 2012). Aus dem Zustand der *Dormancy* können jederzeit wieder Zellen in die Zirkulation eintreten und eine Metastase bzw. ein Lokalrezidiv induzieren. Die unterschiedliche Farbkennzeichnung in der schematischen Abbildung soll verdeutlichen, dass die DTZ-Population sehr heterogen ist und dass nur DTZ mit stammzellähnlichen Eigenschaften die Fähigkeit besitzen, eine Metastase zu formieren (Abraham et al., 2005; Aguirre-Ghiso, 2007; Reuben et al., 2011) (rote Kennzeichnung). Es bleibt jedoch weitestgehend ungeklärt, welche Faktoren dazu beitragen, dass DTZ von der *Dormancy* wieder in einen proliferativen Zustand übergehen und ein progressives Tumorstadium (*Escape*) bedingen. So werden Faktoren aus der extrazellulären Matrix, wie etwa Fibronectin diskutiert, welche ruhende DTZ beispielsweise über einen Integrin- $\beta 1$  vermittelten Signalweg wieder zur Proliferation anregen können (Barkan et al., 2008).

### **1.2.1 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark**

Bei einer Vielzahl von Ovarialkarzinompatientinnen entwickelt sich trotz makroskopischer Komplettresektion ein Rezidiv. Dies geschieht meist im Sinne einer peritonealen Karzinose, aber im weiteren Verlauf auch in Form einer hämatogenen Metastasierung. Die Rezidiventwicklung ist möglicherweise auf eine frühzeitige bzw. unerkannte hämatogene Streuung und die Präsenz von DTZ im KM zurückzuführen. Eine Skelettmetastasierung ist bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom sehr selten, dennoch können DTZ bei etwa 30 – 47% der Patientinnen detektiert werden (Ross et al., 1995; Braun et al., 2001; Fehm et al., 2006), was darauf hinweist, dass DTZ im KM möglicherweise nur temporär verweilen. DTZ im KM gelten für das Mammakarzinom als prognostisch signifikant, mittlerweile konnte die prognostische Relevanz der DTZ auch für das Ovarialkarzinom gezeigt werden (Braun et al., 2001; Schindlbeck et al., 2007; Wimberger et al., 2007; Banys et al., 2009). Da es sich bei der Detektion von DTZ jedoch um eine invasive Prozedur handelt, die oftmals von Patientinnen nicht erwünscht ist, wäre es erstrebenswert, die KM-Aspiration durch eine Blutanalyse zu ersetzen.

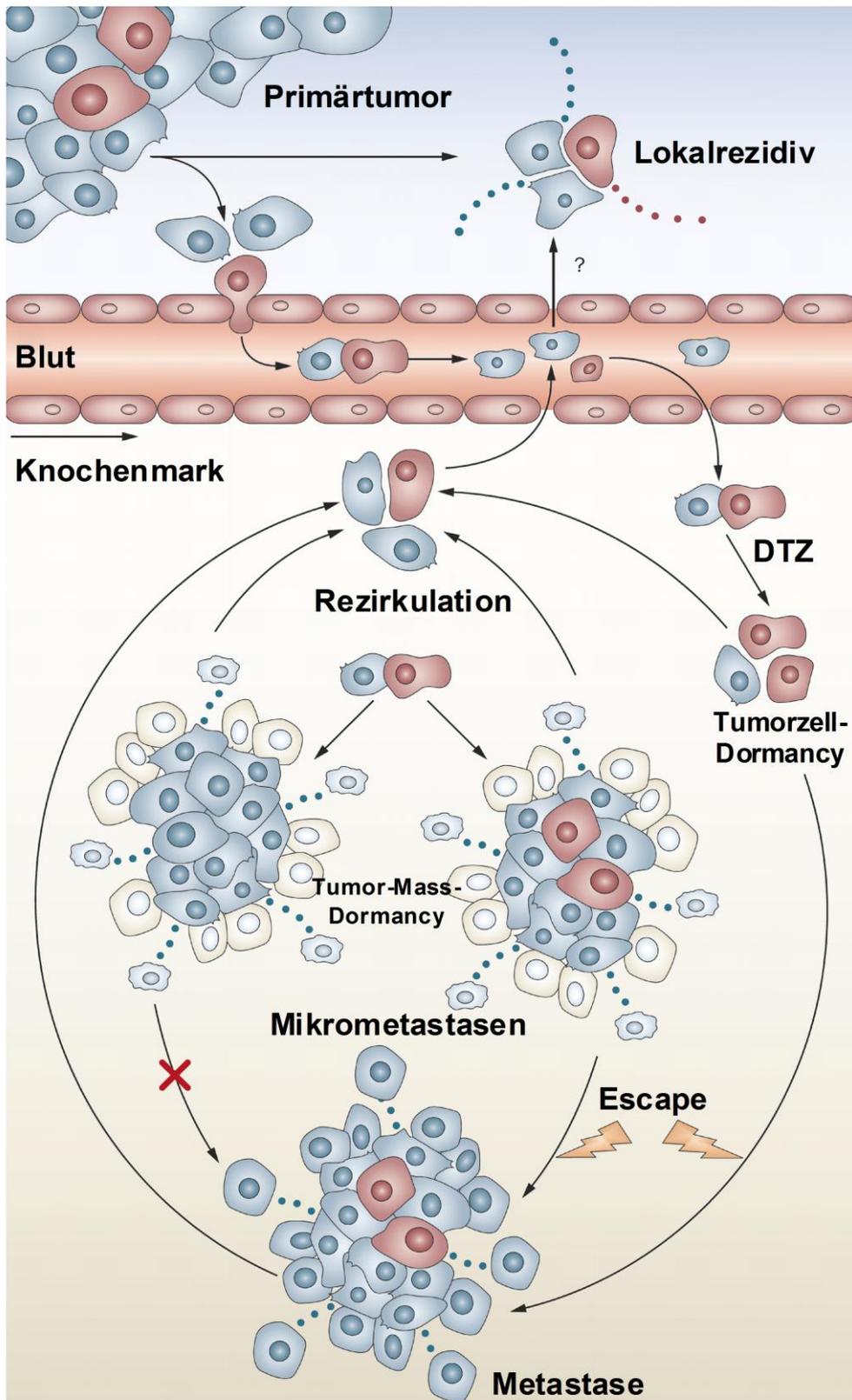


Abbildung 1-1: Konzept der Tumorzellmetastasierung nach Pantel et al., 2009 (Nat. Rev. Clin. Oncol. 6(6):339-51, modifiziert)

### 1.2.2 Zirkulierende Tumorzellen im Blut

Bislang ist wenig über die Biologie und die prognostische Bedeutung zirkulierender Tumorzellen (ZTZ) im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen bekannt. Im Gegensatz zur Detektion von DTZ im KM gibt es hier noch keine „Goldstandardmethode“, was eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien erschwert. Bisherige Ansätze zur Anreicherung dieser Zellen beruhen auf physikalischen (Größe, Deformierbarkeit, elektrische Ladung) oder biologischen Eigenschaften der ZTZ, wie beispielsweise der Expression von Oberflächenantigenen (Lianidou and Markou, 2012). In einer aktuellen Studie konnten zum Zeitpunkt der Primärdiagnose ZTZ bei 19% untersuchter Ovarialkarzinompatientinnen nachgewiesen werden, wohingegen die Positivitätsrate nach Chemotherapie 27% betrug. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von ZTZ in der Blutbahn von Ovarialkarzinompatientinnen einen prädiktiven Faktor für ein verkürztes Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) darstellt (Aktas et al., 2011). Eine Veränderung epithelialer Tumorzellen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp, auch Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) genannt, gilt als eine der möglichen Voraussetzungen für die Metastasierung (Kalluri and Weinberg, 2009). In diesem Zusammenhang konnte bereits für das Mammakarzinom gezeigt werden, dass eine Subgruppe von Patientinnen ZTZ im Blut aufweisen, in denen EMT-assoziierte Transkripte, wie etwa Twist 1, Akt-2 oder PI3K $\alpha$  detektierbar sind (Kasimir-Bauer et al., 2012). Des Weiteren wird vermutet, dass Rezidiventwicklung und Therapieversagen im Allgemeinen auf Tumorzellen mit Stammzellcharakteristika zurückzuführen sein könnte. In diesem Kontext wurde beobachtet, dass ZTZ von Mammakarzinompatientinnen ALDH1, einen Marker für Stammzelleigenschaft, exprimieren können (Mani et al., 2008; Aktas et al., 2009; Kasimir-Bauer et al., 2012; Sampieri and Fodde, 2012). Für das Ovarialkarzinom gibt es bisher jedoch keine Daten in Bezug auf die Inzidenz von EMT- bzw. stammzellassozierten ZTZ und deren klinische Relevanz.

## 1.3 “Loss of Heterozygosity“ (LOH)

### 1.3.1 LOH und das Ovarialkarzinom

Der menschliche Körper ist ein diploider Organismus, d.h., jedes einzelne Gen liegt in Form von zwei Kopien bzw. Allelen vor. Im Normalfall sollte die Kopienzahl paternalen sowie maternalen Transkripte eines jeden exprimierten Gens im Gleichgewicht sein (1:1 Verhältnis). In malignen Zellen kommt es jedoch nicht selten vor, dass dieses Verhältnis gestört ist. Der Begriff „*Loss of Heterozygosity*“ (LOH) wird allgemein als ein vollständiger Verlust eines von zwei Allelen in Bezug auf einen definierten chromosomalen Locus verstanden und gilt als wichtiger Mechanismus zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Abbildung 1-2). Das Auftreten von LOH an unterschiedlichen chromosomalen Loci konnte bislang in einer Vielzahl von epithelialen Tumoren beobachtet werden. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein primärtumorassoziiertes Auftreten von LOH beim Kolonkarzinom (Wang et al., 2010), beim Zervixkarzinom (Kozlowski et al., 2006) sowie beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (Carpagnano et al., 2009) prognostisch signifikant ist. Auch für das Ovarialkarzinom konnte experimentell belegt werden, dass z.B. LOH im Bereich der chromosomalen Bande 9p22-31 ein sehr frühes Ereignis der ovariellen Tumorgenese darstellt (Byrom et al., 2004), wohingegen LOH im Bereich des Chromosoms 17 gehäuft in hochgradigen bzw. fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen detektiert wurde (Foulkes et al., 1993). Weitere Untersuchungen in diesem Kontext zeigten, dass Ovarialkarzinompatientinnen mit LOH am X-Chromosom ein verkürztes Überleben aufweisen (Hogdall et al., 2004).

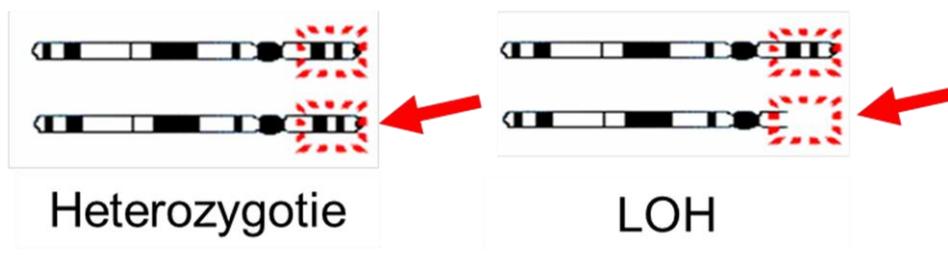


Abbildung 1-2: Prinzip eines Heterozygotieverlustes (LOH)

### 1.3.2 Mikrosatellitenmarker und Tumorsuppressorgen-Loki

Grundlage bzw. „Werkzeug“ der experimentellen LOH-Detektion ist die Amplifikation spezifischer genomischer DNA-Sequenzen, den sogenannten „Mikrosatelliten“. Hierbei handelt es sich um kurze, ca. 2-6 bp lange DNA-Sequenzen, die in repetitiver Form im menschlichen Genom vorliegen und 10-100 Mal nacheinander wiederholt werden. In humanen Zellen setzen sich Mikrosatelliten meist aus einer Dinukleotidwiederholung von Cytosin und Adenin (CA)<sub>n</sub> zusammen. Für die LOH-Analyse nutzt man das Auftreten eines Sequenzlängenpolymorphismus: Unterscheiden sich väterliches und mütterliches Allel eines Mikrosatellitenmarkers in Bezug auf die Sequenzlänge, d.h. die Anzahl der Dinukleotidwiederholungen, liegt Heterozygotie vor und man spricht von einem informativen genetischen Mikrosatellitenmarker. Der Vergleich von Allelen in Tumor-DNA und normaler genomischer DNA des gleichen Patienten erlaubt somit die Detektion von LOH an einem ausgewählten chromosomalen Locus. Nachfolgend sind Mikrosatellitenmarker aufgeführt, die für das Ovarialkarzinom bereits als tumorbiologisch relevant beschrieben werden konnten.

Der Mikrosatellitenmarker **D10S1765** ist 10q23.3 lokalisiert und mit dem Gen *Phosphatase and Tensin Homologue* (PTEN) assoziiert (Tabelle 1-3). Das PTEN-Protein umfasst 403 Aminosäuren und beinhaltet zwei funktionelle Domänen (Phosphatase-Domäne und C2-Domäne) sowie drei weitere, strukturassoziierte Domänen (Lee et al., 1999). Es ist bekannt, dass PTEN durch seine in diesem Zusammenhang nicht redundante Phosphataseaktivität, zur Antagonisierung eines der wichtigsten tumorpromovierenden Signalwege, dem Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt Signalweg beiträgt (Zhang and Yu, 2010). LOH am PTEN-Locus konnte in zahlreichen sporadischen Tumoren, wie etwa dem Glioblastom oder dem Prostatakarzinom, als häufiges Ereignis beobachtet werden (Li et al., 1997). Die Tumorsuppressoraktivität von PTEN kann durch die Präsenz von zwei somatischen Mutationen in der Phosphatase-Domäne unterbrochen werden: einer C124S Mutation, sowie einer G129E Mutation (Liaw et al., 1997). Des Weiteren konnte in aktuellen Studien gezeigt werden, dass PTEN in einer Vielfalt zellulärer Funktionen, wie etwa der Regulation genomischer Stabilität, der Stammzellerneuerung sowie der Metastasierung involviert ist (Zhang and Yu, 2010). Auch für das Ovarialkarzinom ist PTEN von essentieller Bedeutung. In diesem Zusammenhang konnte beschrieben werden, dass PTEN an der Modulation von Platinresistenz beteiligt ist (Yang et al., 2008).

Die Mikrosatellitenmarker **D13S218** und **D17S855** sind 13q12-13 bzw. 17q21 lokalisiert und mit den Genen „*Breast Cancer Gene, Early Onset 1* bzw. *2*“ (BRCA1 bzw. BRCA2) assoziiert (Tabelle 1-3). Die BRCA-Gene werden zur Klasse der Tumorsuppressorgene gezählt und als Mammakarzinom- bzw. Ovarialkarzinom-Suszeptibilitätsgene verstanden, da die Mehrzahl der Patientinnen mit hereditären Mamma- bzw. Ovarialkarzinom Keimbahnmutationen im BRCA1- oder BRCA2-Gen aufweisen (Hall et al., 1990; Hofmann and Schlag, 2000; Paakkonen et al., 2001). Die BRCA-Proteine stellen wichtige Komponenten molekularer Signalwege dar und sind in DNA-Reparaturmechanismen, wie etwa die homologe Rekombination im Rahmen der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert (Powell and Kachnic, 2003). Ein Funktionsverlust von BRCA1 bedingt einen Defekt des S-Phase Checkpoints sowie der G<sub>2</sub>/M Transition, was zusätzlich auf eine Zellzyklusregulatorische Funktion dieser Proteine hinweist (Powell and Kachnic, 2003). Tumorbioologisch relevante Inaktivierung der BRCA-Loki, wie etwa durch Mutation, LOH oder Hypermethylierung, konnte nicht nur bei hereditären sondern auch bei sporadischen Ovarialkarzinomen beschrieben werden (Weberpals et al., 2008). Des Weiteren gilt BRCA1 bei sporadischen Ovarialkarzinomen als Modulator therapeutischer Sensitivität (Husain et al., 1998).

Tabelle 1-3: Mikrosatellitenmarker für die LOH-Analyse

<b>Mikrosatellitenmarker</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>
<b>D6S1581</b>	6q25.1	M6P/IGF2R (proximal)	Inhibition von Tumorzellwachstum und Angiogenese, Platinresistenz
<b>D10S1765</b>	10q23.3	PTEN	Zellzyklus, Platinresistenz
<b>D13S218</b>	13q12-13	BRCA2	DNA-Reparatur, Zellzyklus
<b>D17S855</b>	17q21	BRCA1	DNA-Reparatur, Zellzyklus

Der Mikrosatellitenmarker **D6S1581** ist auf Chromosom 6q, Bande 25.1 lokalisiert und liegt etwa 25 kb proximal zu dem Mannose-6-Phosphat/Insulin-Like-Wachstumsfaktor II Rezeptor (M6P/IGF2R) (Makhija et al., 2003) (Tabelle 1-3). Dieser Rezeptor trägt zur Antagonisierung des IGF-Signalweges bei, indem er das potente Mitogen IGF2 internalisiert und dessen Degradation vermittelt (Brown et al., 2008). Im Rahmen von Untersuchungen zum Mammakarzinom wurde dieser Rezeptor als Tumorsuppressor beschrieben (Lee et al., 1998; Oates et al., 1998; Wood et al., 2000), da er einen negativ regulatorischen Einfluss auf Invasivität und Metastasierungspotential von Tumorzellen zeigte. Des Weiteren konnte LOH am M6P/IGF2R-Lokus bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom als häufiges Ereignis beschrieben werden (Rey et al., 2000). Eine geringe D6S1581 Kopienzahl in ovariellen Primärtumoren assoziierte mit der Platinresistenz der entsprechenden Patientinnen (Makhija et al., 2003).

## **1.4 Zirkulierende DNA**

### **1.4.1 Grundlage**

Im Jahre 1948 konnte erstmalig gezeigt werden, dass DNA nicht nur im Zellkern vorkommt, sondern auch zellfrei im peripheren Blut zirkuliert. Zirkulierende DNA (zirDNA) ist mit einer mittleren Größe von etwa 70 - 200 bp in der Regel stark fragmentiert, jedoch konnten auch größere Fragmente bis zu einer Größe von etwa 21 kb beobachtet werden (Mandel and Metais, 1948; Jahr et al., 2001; Schwarzenbach et al., 2011). Basierend auf weiteren Erkenntnissen, z.B. dass Tumorpatienten höhere Konzentrationen an zirDNA im Blut aufweisen als Normalspender (Leon et al., 1977), wurde bereits in den 80er Jahren angenommen, dass zirDNA im Blut von Tumorpatienten zu einem gewissen Anteil auch aus malignen Zellen stammt (Stroun et al., 1987; Stroun et al., 1989). Jedoch beschränkt sich ein Anstieg des Gehaltes an zirDNA im Blut nicht nur auf die Inzidenz eines malignen Tumors, sondern wurde auch im Zuge gutartiger Läsionen, inflammatorischer Erkrankungen sowie Gewebe-Traumata beschrieben (Fleischhacker and Schmidt, 2007). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte in zirDNA eine Vielzahl tumorassoziierter genetischer Alterationen wie z.B. zirkulierende B-RAF V600E Mutationen (Shinozaki et al., 2007) oder Tumorsuppressorgen Hypermethylierungen (Sharma et al., 2010) nachgewiesen werden (Abbildung 1-3). Des Weiteren ist bekannt, dass zirDNA nicht nur frei, sondern auch in Form von Nukleosomen im Blut zirkuliert (Roth et al., 2011). Bislang gibt es ver-

schiedene funktionelle Erklärungsmodelle für die Inzidenz von zirDNA im Blut von Tumorpatienten. Zum einen wird vermutet, dass apoptotische bzw. nekrotische Tumorzellen eine wesentliche Quelle für zirDNA darstellen (Abbildung 1-3) (Schwarzenbach et al., 2011). Diese Tumorzellen werden in der Regel von Makrophagen phagozytiert, die in Folge dessen Tumor-DNA aufnehmen und sie in verdauter bzw. fragmentierter Form wieder in den extrazellulären Raum abgeben (Choi et al., 2005). Zum anderen gibt es Anhaltspunkte, dass aktive Mechanismen zur DNA-Abgabe in das Blut beitragen, die aber bislang nur unvollständig verstanden sind (Stroun et al., 2000; Gahan and Swaminathan, 2008). Eine interessante Schätzung in diesem Zusammenhang ergab, dass ein 100 g schwerer Tumor, entsprechend einer zellulären Masse von  $3 \times 10^{10}$  Zellen, täglich etwa 3,3% seiner Tumor-DNA in die Zirkulation abgibt (Diehl et al., 2005).

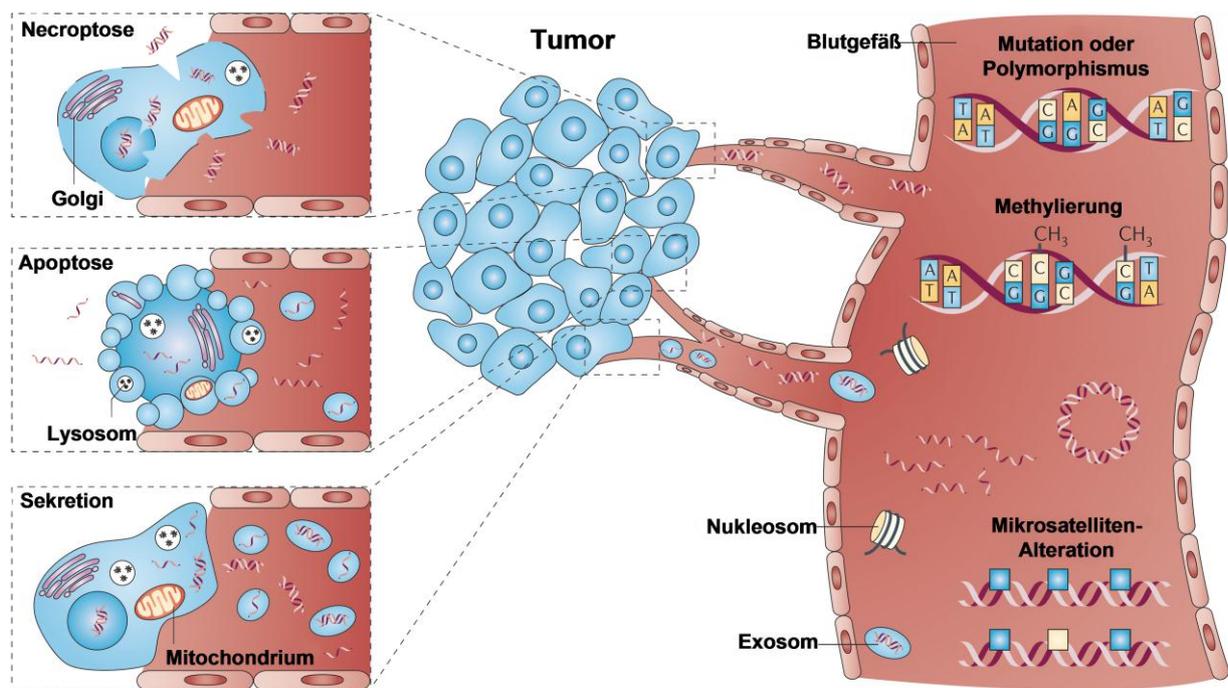


Abbildung 1-3: Ursprung und mögliche Alterationen zirkulierender DNA nach Schwarzenbach et al., 2011 (Nat. Rev. Cancer (6):426-37, modifiziert)

Die funktionelle Relevanz der zirDNA im Blut ist noch größtenteils ungeklärt. Eine Hypothese in diesem Kontext postuliert einen horizontalen Transfer zellfreier Tumor-DNA. Es konnte in diesem Zusammenhang belegt werden, dass eine Fibroblastenzelllinie (NIH-3T3) durch Plasma-DNA von Patienten mit kolorektalem Karzinom transformiert werden kann, so dass diese Zelllinie befähigt wird, nach Transplantati-

on in eine immundefiziente Maus ein invasives Karzinom zu bilden (Garcia-Olmo et al., 2010).

#### **1.4.2 Mikrosatellitenanalyse und zirkulierende DNA**

LOH an tumorbiologisch relevanten chromosomalen Loci ist nicht nur im Rahmen einer Primärtumoranalyse möglich, sondern kann auch in zirDNA im Blut von Tumorpatienten detektiert werden (Silva et al., 2002; Schwarzenbach et al., 2009; Sunami et al., 2009). Trotz einheitlicher PCR-basierter Methodik wurde jedoch eine große Variabilität in Bezug auf die LOH-Detektionsrate im Blut beobachtet und nicht selten zeigten sich Diskrepanzen bezüglich des LOH-Status in Primärtumor und Blut eines Patienten (Chen et al., 1996; Anker et al., 1997; Anker et al., 1999; Coulet et al., 2000; Wang et al., 2003; Bremnes et al., 2005; Schwarzenbach et al., 2007; Schwarzenbach et al., 2009). Dieses Phänomen wird auf die Präsenz von Normal-DNA in der Zirkulation zurückgeführt, welche tumorspezifisches LOH maskiert (Kopreski et al., 1997; Hibi et al., 1998; Muller et al., 2008). In einer Pilotstudie konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Fraktionierung der zirDNA in hochmolekulare Fraktion (HMF) und niedermolekulare Fraktion (NMF), die Allelverluste zu einem überwiegenden Teil in der NMF nachweisbar sind und somit durch Fraktionierung die Sensitivität der LOH-Detektion verbessert werden kann. In diesem Zusammenhang wurde eine präliminäre Hypothese formuliert, dass Tumor-DNA in der Zirkulation überwiegend einen fragmentierten niedermolekularen Charakter aufweist (Muller et al., 2008). Für das Ovarialkarzinom gibt es bislang jedoch keine Daten in Bezug auf die Inzidenz von LOH in zirDNA.

### **1.5 microRNA**

#### **1.5.1 Funktion und Biogenese**

MicroRNA (miRNA) sind endogene, einzelsträngige Ribonukleinsäuremoleküle mit einer Länge von etwa 19-25 nt (Boren et al., 2009). Die erste miRNA, lin-4, wurde im Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt und im Zusammenhang mit der Genregulation beschrieben (Lee et al., 1993). Heute ist bekannt, dass miRNA in zahlreichen Organismen, einschließlich mancher Viren und Pflanzen exprimiert sind (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Reinhart et al., 2002). MiRNA Sequenzen kodieren nicht proteinogen und sind als negative Genregulatoren an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Hierzu zählen neben embryonalen

Entwicklungsprozessen (Visvanathan et al., 2007) auch weitere komplexe Mechanismen, wie Zelldifferenzierung, Proliferation oder Apoptose (Ambros et al., 2003). Abbildung 1-4 zeigt eine schematische Darstellung der zellulären miRNA Prozessierung (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Kuhlmann et al., 2012). Die Biogenese einer miRNA ist ein komplexer und mehrstufiger Vorgang:

Initiales Ereignis findet im Nukleus statt. Hier vermittelt die RNA-Polymerase II die Transkription eines Vorläufermoleküls, der sogenannten „*primary-miRNA*“ (pri-miRNA). Die pri-miRNA weist eine charakteristische Länge > 1 kb auf und verfügt analog zur gewöhnlichen *messengerRNA* (mRNA) über einen 5' 7-Methyl-Guanosin-Cap und einen 3' poly(A)-Schwanz (Zeng, 2006). Die Sequenzbeschaffenheit einer

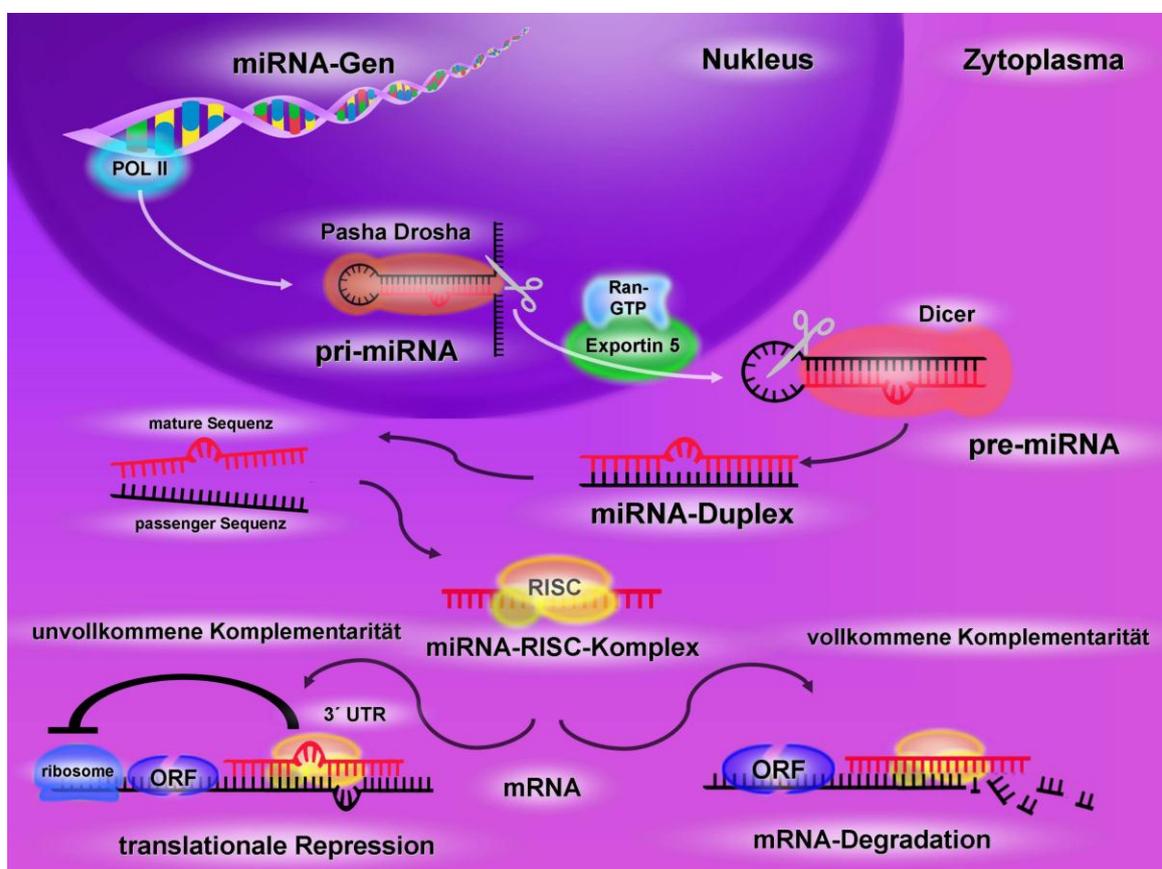


Abbildung 1-4: Prozessierung und Wirkungsweise von microRNA nach Kuhlmann et al., 2012. (Clin. Chem. Lab. Med. (4):601-15, modifiziert)

pri-miRNA erlaubt die Ausbildung intramolekularer Wechselwirkungen, so dass eine charakteristische „Haarnadelstruktur“ mit einem terminalen Loop, einem doppelsträngigen Stamm und flankierenden einzelsträngigen Bereichen entstehen kann (Abbildung 1-4). Die weiterführende Prozessierung erfolgt durch das Protein

DROSHA und seiner regulatorischen Untereinheit PASHA. Diese Endonuklease des Typus RNase III spaltet flankierende RNA-Sequenzen der pri-miRNA und es entsteht ein weiteres, nun wesentlich kürzeres Vorläufermolekül, die „*precursor-miRNA*“ (pre-miRNA). Alle folgenden Reifungsschritte finden erst nach einer Translokation der pre-miRNA in das Zytoplasma statt. Hier kommt die Endonuklease DICER zum Einsatz und katalysiert die Entfernung der Loop-Sequenz aus der Haarnadelstruktur (Billy et al., 2001). Es entsteht eine etwa 22 nt lange doppelsträngige RNA. Ein Strang dieses Moleküls wird im Zuge der Biogenese als mature miRNA-Sequenz ausgewählt und geht eine stabilisierende Interaktion mit einem Ribonukleoprotein-komplex, dem *RNA-induced-silencing-complex* (RISC-Komplex) ein. Der entsprechende Gegenstrang, die sogenannte „*passenger-Sequenz*“ wird degradiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine asymmetrische thermodynamische Stabilität an den Enden des vorliegenden miRNA-Duplex einen maßgeblichen Faktor für die Entscheidung darstellt, welcher Strang des Duplex eine Interaktion mit dem RISC-Komplex eingeht (Ding et al., 2007).

### **1.5.2 Konzept der negativen Genregulation**

Grundlage für das Konzept der negativen Genregulation ist eine Interaktion der miRNA mit der 3'UTR-Sequenz der mRNA eines spezifischen Zielgenes nach dem Gesetz der komplementären Basenpaarung. Funktionell betrachtet verfügt der RISC-Komplex über drei verschiedene Möglichkeiten, die Translation der mRNA in ein Protein zu inhibieren. Der Grad an Komplementarität zwischen miRNA und dem 3'UTR der Ziel mRNA hat einen entscheidenden Einfluss auf die Inhibitionsmodalität. Je höher die Komplementarität, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass der RISC-Komplex die Ziel mRNA degradiert. Bei einer unvollkommenen Komplementarität kommt es ohne ein direktes Degradationsereignis zur negativen Genregulation, indem der RISC Komplex an der mRNA gebunden bleibt und sterisch die Translation des Zielproteins supprimiert (Esquela-Kerscher and Slack, 2006). Im Falle einer unvollkommenen Komplementarität kann es alternativ auch zu einer Deadenylierung der mRNA kommen, die sich ebenfalls negativ auf die Expression des Zielproteins auswirkt (Wu et al., 2006). Durch die Toleranz einer unvollkommenen komplementären Interaktion zwischen einer maturen miRNA Sequenz und dem 3'UTR der Ziel mRNA ist eine einzige miRNA befähigt, ein ganzes Kollektiv von Zielgenen negativ zu regulieren, was die Komplexität dieses Systems enorm erhöht.

### 1.5.3 microRNA und das Ovarialkarzinom

Es konnte gezeigt werden, dass miRNA funktionell als Onkogene oder Tumorsuppressorgene fungieren können und eine tumorbiologische Relevanz für das Ovarialkarzinom aufweisen (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Kuhlmann et al., 2012). Eine Untersuchung primärer Ovarialkarzinomen zeigte, dass miR-200a, miR-141, miR-200c und miR-200b im Vergleich zu gesundem Ovargewebe signifikant überexprimiert werden, wohingegen miR-199a, miR-140, miR-145 und miR-125b1 herunterreguliert sind (Iorio et al., 2007). Des Weiteren konnte belegt werden, dass das Expressionsprofil von miRNA im Primärtumor des Ovarialkarzinoms prognostisch relevant ist. So wurde bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom eine dysregulierte let-7i Expression mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben und Platinresistenz assoziiert (Yang et al., 2008). MiR-200a, miR-200b und miR-429 konnten ferner als prädiktiv für die Rezidiventwicklung sowie für ein verkürztes OS identifiziert werden (Hu et al., 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass

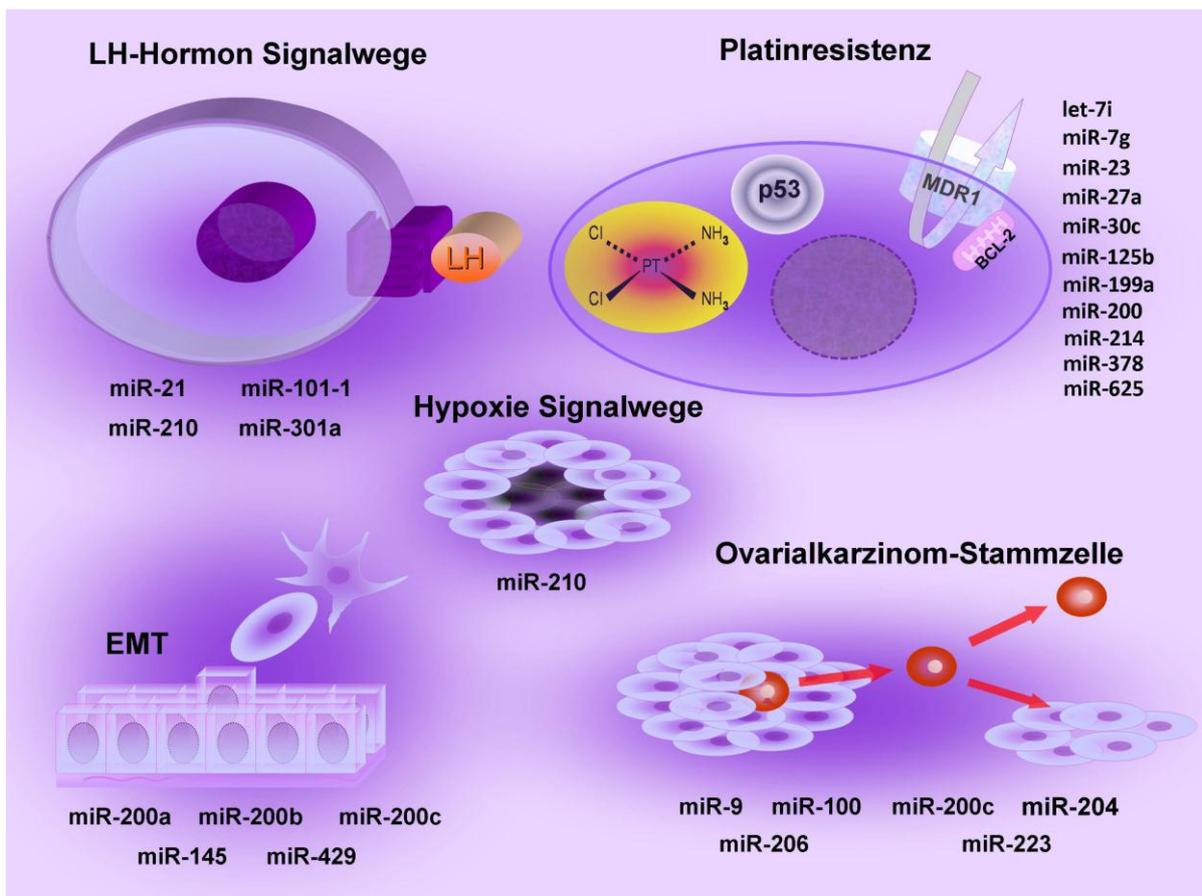


Abbildung 1-5: microRNA und die Pathogenese des Ovarialkarzinoms nach Kuhlmann et al., 2012. (Clin. Chem. Lab. Med. (4):601-15, modifiziert) LH: Luteinisierendes Hormon, EMT: Epithelial-Mesenchymale Transition

miRNA noch weitere, ovarialkarzinomrelevante Prozesse modulieren, wie etwa Hypoxie-Signalwege, EMT sowie die Regulation eines Stammzellcharakters (Abbildung 1-5) (Kuhlmann et al., 2012).

#### **1.5.4 Zirkulierende microRNA**

Nicht nur im Gewebe solider ovarieller Tumoren, sondern auch im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen – d.h. in einem zellfreien Kontext – konnten miRNA nachgewiesen werden. Trotz hoher endogener RNase Aktivität im Humanserum liegen zirkulierende miRNA in stabiler Form vor (Tsui et al., 2002; Mitchell et al., 2008) und werden als blutbasierte Biomarker diskutiert (Qu et al., 2011). Die hohe endogene Stabilität der miRNA in der Zirkulation wird auf eine Assoziation mit RISC-assoziierten Proteinen (z.B. Argonaut-2) oder auf eine Inklusion in protektive vesikuläre Strukturen, wie z.B. Exosomen zurückgeführt (Arroyo et al., 2011). In Bezug auf das Ovarialkarzinom gibt es bisher nur wenige Ansätze, die sich auf zirkulierende miRNA dieser Patientinnen fokussieren. In einer Pilotstudie wurden EpCAM-positive Exosomen aus dem Serum von Ovarialkarzinompatientinnen immunomagnetisch aufgereinigt und anschließend auf ihr miRNA-Expressionsprofil hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die miRNA-Expression im exosomalen Kompartiment tendenziell das Expressionsprofil des Primärtumors widerspiegelt (Taylor and Gercel-Taylor, 2008). In einer weiteren Studie wurde zirkulierende miRNA direkt aus dem Serum von Ovarialkarzinompatientinnen isoliert und mit dem miRNA Profil aus Normalspenderseren verglichen. Hier konnten miR-21, miR-29a, miR-92, miR-93 und miR-126 in der Zirkulation als hochreguliert bzw. miR-127, miR-155 sowie miR-99b als herunterreguliert identifiziert werden (Resnick et al., 2009). Interessanterweise wurde die Überexpression der genannten miRNA-Kandidaten auch im Serum von Patientinnen beobachtet, die unauffällige CA 125 Tumormarkerwerte aufwiesen, was in diesem präliminären Kontext die mögliche klinische Relevanz von zirkulierenden miRNA für das Ovarialkarzinom impliziert.

## 1.6 Zielsetzung

Trotz Fortschritten in der Behandlung des Ovarialkarzinoms erleiden derzeit mehr als 50% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom ein Rezidiv, wobei generell 15 - 20% Fälle platinresistent sind, was bisher jedoch nur retrospektiv erkannt wird. In diesem Sinne ist die Etablierung neuer Biomarkerkonzepte äußerst wünschenswert, um eine Risikostratifizierung der Patientinnen zu ermöglichen und ihre Prognose zu verbessern. In der vorliegenden Dissertation sollen daher folgende Zielsetzungen bearbeitet werden:

1) Durchführung einer primärtumorbasierten LOH-Analyse an tumorbiologisch relevanten chromosomalen Regionen zur Identifizierung eines prädiktiven Biomarkers im Hinblick auf Platinresistenz und Prognose.

2) Da der Primärtumor ausschließlich zum Zeitpunkt der Primärdiagnose zur Verfügung steht, sollen nachfolgend experimentelle Strategien zur Biomarkeridentifikation auf ein blutbasiertes System übertragen werden. Durch folgende Untersuchungen soll geprüft werden, inwieweit das Blut der Patientinnen im Sinne einer „*Real-Time-Liquid-Biopsy*“, z.B. für ein Therapiemonitoring, genutzt werden könnte:

2a) Übertragung der primärtumorbasierten LOH-Analyse auf zellfreie zirDNA im peripheren Blut und Validierung einer DNA-Fraktionierungsmethodik zur Optimierung der LOH-Detektion, bzw. zur gezielten Analyse tumorassoziierter DNA in der Zirkulation.

2b) Untersuchung der Expression zirkulierender miRNA im peripheren Blut von Patientinnen im Hinblick auf die Identifikation eines weiteren diagnostischen Biomarkers für das Ovarialkarzinom.

2c) Immunomagnetische Anreicherung von ZTZ aus dem Blut und molekulare Charakterisierung dieser Zellen im Hinblick auf deren Expression platinresistenzassoziierter, epithelspezifischer, bzw. stammzelloassoziierter Gentranskripte.

## 2 Patientinnen, Material und Methoden

### 2.1 Patientinnen

Die vorliegende Studie wurde in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Insgesamt wurden 201 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom untersucht. Die Erstdiagnose dieser Patientinnen ereignete sich in einem Zeitfenster von Mai 1999 bis November 2010. Die Mehrzahl der Patientinnen wies zum Zeitpunkt der Primärdiagnose bereits ein fortgeschrittenes Stadium

Tabelle 2-1: Klinische Daten der Ovarialkarzinompatientinnen

Anzahl Patientinnen: <b>201</b>	
mittleres Alter: <b>59</b> Jahre (Range: <b>18 - 89</b> Jahre)	
<b>FIGO-Stadium</b>	
FIGO I-II	47 (23%)
FIGO III	109 (54%)
FIGO VI	45 (22%)
<b>Lymphknotenstatus</b>	
N <sub>0</sub>	72 (36%)
N <sub>1</sub>	70 (35%)
N <sub>x</sub>	59 (29%)
<b>Grading</b>	
1-2	97 (48%)
3-4	101 (50%)
<b>Histologie</b>	
serös-papillär	146 (73%)
müzinös	16 (8%)
andere	39 (19%)
<b>Tumorrest</b>	
positiv	90 (45%)
negativ	108 (54%)
<b>DTZ vor Operation</b>	
positiv	64 (42%)
negativ	88 (58%)
<b>DTZ nach Chemotherapie</b>	
positiv	31 (37%)
negativ	53 (63%)

(FIGOIII-IV) mit serös-papillärer Histologie auf. Für die geplanten Untersuchungen am Patientinnenmaterial lag ein positives Gutachten der lokalen Ethikkommission vor (05/2856). Alle Eingriffe erfolgten nach vorausgegangener schriftlicher Einwilligung der Patientinnen. Tabelle 2-1 zeigt eine Zusammenfassung der klinischen Daten un-

tersuchter Ovarialkarzinompatientinnen. Patientinnen mit einem therapiefreien Intervall < 5 Monate galten als platinresistent.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Reagenzien und Lösungen

2-Mercaptoethanol	Roth
AmpliTaq Gold® (5U / µl)	Applied Biosystems
Chloroform	Roth
Deoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Applied Science
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen
Ethanol (100%)	Roth
Ficoll-Paque™ PLUS	Sigma Aldrich
GeneScan™-500 ROX™ Standard	Applied Biosystems
Guanidinthiocyanat	Roth
Heparin-Natrium-250000	Ratiopharm
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems
Kaisers Glyceringelatine	Merck
Performance Optimized Polymer 4 (POP-4™)	Applied Biosystems
Proteinase K	Qiagen
Recombinant RNAsin (Ribonuclease Inhibitor)	Promega
RNAse freies Wasser	Qiagen
TMAC	Roth
Tris-EDTA Puffer	Sigma Aldrich
Türks Lösung	Merck
Xylol	Sigma Aldrich

### 2.2.2 Kits

Adna Test, <i>EMT1-StemCell Select</i> Kit	AdnaGen
Adna Test, <i>EMT1-StemCell Detect</i> Kit	AdnaGen
Adna Test, <i>OvarianCancer Select</i> Kit	AdnaGen
Adna Test, <i>OvarianCancer Select</i> Kit	AdnaGen
DNA 1000 Kit (Bioanalyzer)	Agilent
EPiMET <sup>®</sup> Epithelial Cell Detection Kit	AS Diagnostik
HotStar Taq Master Mix Kit	Qiagen
miRNA Complete Labeling and Hyb Kit	Agilent
miRNeasy Mini Kit	Qiagen
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen
miRVana Paris Kit	Ambion
miScript II RT Kit	Qiagen
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
RNA 6000 Kit (Bioanalyzer)	Agilent
SensiScript Reverse Transcription Kit	Qiagen
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega

### 2.2.3 Geräte

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent
Ariol SL-50	Leica
Heiz-Thermo-Mixer, HTMR-133	HLC BioTech
IKA Vortex Mixer	Agilent
Magna Lyser System	Roche

Mastercycler Gradient	Eppendorf
Microarray Scanner (G2505B)	Agilent
Nanodrop	PeqLab
Vakuumpumpensystem MD 4C (Speedvac-System)	Vacuubrand GmbH & Co KG
UNIVAPO 100H (Rotortyp 72-11) (Speedvac-System)	LTF Labortechnik GmbH & Co KG
Vortexer, REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus

## 2.2.4 Software

310 GeneScan Software Version 3.1.2.	Applied Biosystems
ABI Sequence Detection Software Version 1.2.3.	Applied Biosystems
Extraction Image Analysis Software Version A.10.7.3.1	Agilent
GenSpring GX Software Package Version 11.5.1	Agilent
Graph Pad Prism Version 5.03	GraphPad Software, Inc.
SPSS für Windows Version 13.0	SPSS Inc.

## 2.2.5 PCR-Primer

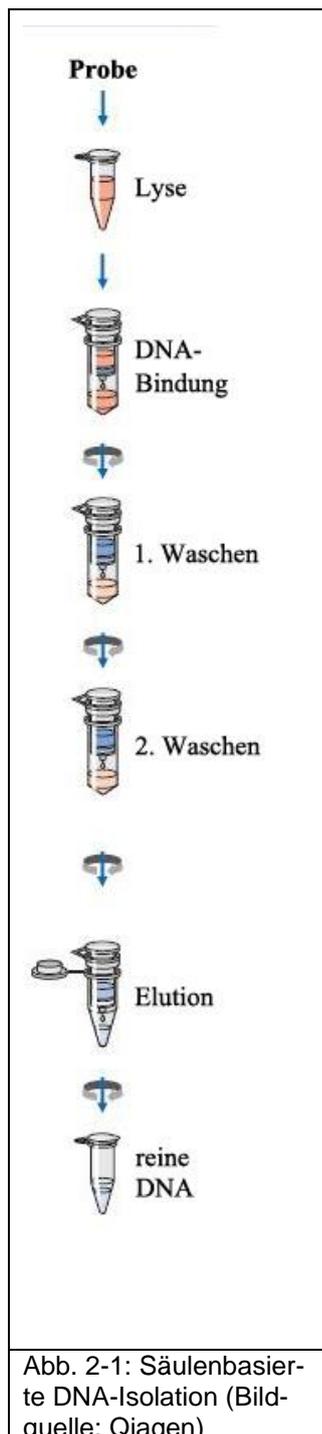
<b>D10S1765</b>	forward: <b>FAM</b> -5'ACA CTT ACA TAG TGC TTT CTG CG-3'	Genosys
	reverse: 5'CAG CCT CCC AAA GTT GC-3'	Genosys
<b>D13S218</b>	forward: <b>HEX</b> -5'GAT TTG AAA ATG AGC AGT CC-3'	Genosys
	reverse: 5'GTC GGG CAC TAC GTT TAT CT-3'	Genosys
<b>D17S855</b>	forward: <b>FAM</b> -5'GGA TGG CCT TTT AGA AAG TGG-3'	Genosys
	reverse: 5'-ACA CAG ACT TGT CCT ACT GCC-3'	Genosys
<b>D6S1581</b>	forward: <b>TMARA</b> -5'-AGG CTC ATC CAT GTT TCTG-3'	Genosys
	reverse: 5'-TGC ATT CCC ACA TTT ACTG-3'	Genosys
<b>hsa-miR-1246</b>	kommerzieller miScript Primer Assay: MS00014224	Qiagen
<b>pre-miR-1246</b>	kommerzieller miScript Primer Assay: MP00000399	Qiagen
<b>hsa-miR-16</b>	kommerzieller miScript Primer Assay: MS00006517	Qiagen
<b>cel-miR-54</b>	kommerzieller miScript Primer Assay: MS00019894	Qiagen
<b>SNOR-44</b>	kommerzieller miScript Primer Assay: MS00007518	Qiagen

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Minidisektion von paraffiniertem Tumorgewebe

Für die vorliegenden Experimente wurde primäres Ovarialkarzinomgewebe, welches im Rahmen einer Operation gewonnen wurde, verwendet. Dieses wurde direkt nach Exzision am Institut für Pathologie aufbereitet, d.h. in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Für die LOH-Analysen wurden Hämatoxylin-Eosin (HE)

Schnitte angefertigt und durch einen Pathologen des Uniklinikums Essen wurden Gewebeareale mit maximal möglichem Tumoranteil abgrenzend gekennzeichnet. Es folgte die Anfertigung einer 3 mm Stanze aus dem markierten Bereich. In den meisten Fällen betrug der Anteil an Tumorzellen in dem gestanzten Areal in Relation zu kontaminierendem Tumorstroma etwa 60% oder mehr. Die Tumorstanzen wurden ein weiteres Mal in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden für die Isolation von Tumor-DNA sechs konsekutive Schnitte mit einer Schichtdicke von je 10-20 µm angefertigt. Als Quelle für genomische Referenz-DNA stand Paraffinmaterial aus Lymphknoten zur Verfügung. Die Herstellung von 3 mm Stanzen aus diesem Material sowie das Anfertigen konsekutiver Schnitte für die DNA-Isolation erfolgten analog zu dem oben beschriebenen Verfahren. Durch Mitarbeit eines Pathologen konnte bestätigt werden, dass alle verwendeten Lymphknoten tumorfrei waren.



### 2.3.2 DNA-Isolation aus Gewebe und Serum

#### 2.3.2.1 Isolation genomischer DNA aus Paraffingewebe

Aus dem minidissektioniertem Paraffin-Tumorgewebe, sowie dem Referenzmaterial aus tumorfreien Lymphknoten, wurde im Folgenden genomische DNA isoliert. Voraussetzung hierfür war die Entparaffinierung der Proben, die durch Zugaben von 1000 µl Xylol und kräftiger Durchmischung realisiert wurde. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 56 °C und 650

rpm auf einem Heiz-Thermo-Mixer inkubiert und danach für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 20000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Pellet in 1000 µl Ethanol resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation (20000xg, RT) und der Überstand wurde erneut abgesaugt. Anschließend wurden die Proben für mindestens 5 min mit offenem Deckel bei 56 °C auf einem Heiz-Thermo-Mixer inkubiert, um residuellen Alkohol zu entfernen. Die Isolation genomischer DNA aus den angefertigten Tumorstanzen wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen realisiert (Abbildung 2-1). Das Verfahren erfolgte mit leichter Modifikation des Werksprotokolls. Zunächst wurde das Pellet in 200 µl ATL-Lysepuffer und 20 µl Proteinase K aufgenommen und kräftig durchmischt, um die Zellen aus ihrem Gewebeverband zu lösen und aufzuschließen. Dieser Vorgang wurde durch Inkubation bei 70 °C für 10 min beschleunigt. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde das Reaktionsgemisch auf eine QIAamp Mini Spin Säule geladen und für 1 min bei 6000xg zentrifugiert. In diesem Schritt bindet genomische DNA selektiv an den Filter der Säule, während alle anderen Komponenten des Lysats ungebunden passieren können. Durch anschließendes zweimaliges Waschen (je 500 µl Puffer AW1 bzw. AW2 und je 1 min Zentrifugation bei 6000xg) wurde die an den Säulenfilter gebundene DNA gereinigt. Eine nachfolgende Trockenzentrifugation bei 20000xg für 1 min garantierte die vollständige Entfernung von Waschpufferresten. Danach wurde die genomische DNA, je nach gewünschter Konzentration, in 100 bis 200 µl AE-Puffer eluiert.

### **2.3.2.2 Fraktionierte Isolation zirkulierender DNA aus Serum**

#### **2.3.2.2.1 Isolation der hochmolekularen DNA-Fraktion**

Die Isolation hochmolekularer DNA aus Patientinnenserum erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen mit einigen Modifikationen des Werksprotokolls. Zu Beginn erfolgte eine Zentrifugation des Patientinnenserums für 5 min bei 2600 rpm, um mögliche Kontamination mit Zellbestandteilen bzw. Schwebepartikeln zu beseitigen. Für die fraktionierte Aufreinigung der zirDNA wurden nach der Zentrifugation 500 -1000 µl Serum in ein neues Tube überführt und mit 1/10 Volumen Proteinase K und 1 Volumen Lysepuffer AL vermischt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 56 °C, erfolgte die Zugabe von 1 Volumen 100% Ethanol. Nach einem kräftigen Durchmischen des Ansatzes wurde das Gemisch (in Einzelportionen bis max. 620 µl) auf eine QIAamp Mini Spin Säule geladen und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

In diesem ersten Schritt wurde bewirkt, dass die hochmolekulare zirDNA-Fraktion aus dem Serum an den Filter der Säule binden kann, wohingegen die niedermolekulare Fraktion ungehindert passiert und sich noch im Durchfluss befindet. Der Durchfluss wurde aufgefangen, bei 4 °C gelagert und diente im Zuge eines separaten Ansatzes der Aufreinigung niedermolekularer DNA (vgl. 2.3.2.2.2). Anschließend erfolgte (analog zur Aufreinigung von DNA aus Gewebe) ein mehrschrittiger Waschvorgang (je 700 µl Puffer AW1 und AW2, Zentrifugation 13.000 rpm für 1 min) und eine Trockenzentrifugation (13000 rpm, 3 min) zum vollständigen Trocknen der Säulenmembran. Schließlich wurde die hochmolekulare DNA-Fraktion durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer AE eluiert (5 min Inkubation nach Zugabe AE, dann Zentrifugation 8000 rpm, 1 min).

#### **2.3.2.2.2 Isolation der niedermolekularen DNA-Fraktion**

Die Isolation der niedermolekularen DNA Fraktion erfolgte aus dem zuvor gewonnenen Säulendurchfluss mit Hilfe des *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega). Das Werksprotokoll wurde modifiziert. Zu Beginn des Verfahrens wurden 1000 µl Durchfluss verwendet, mit 2 Volumen Guanidinthiocyanat versetzt, kräftig durchmischt und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde (in Einzelportionen bis max. 750 µl) auf eine Promega-MiniColumn geladen und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die im Durchfluss befindliche niedermolekulare DNA konnte dadurch an die Filtermembran der Wizard Plus Säule binden. Es folgte ein zweimaliges Waschen der Säule mit je 750 µl Waschpuffer (13000 rpm, 1 min) und eine Trockenzentrifugation (13000 rpm, 3 min). Schließlich wurde die niedermolekulare DNA-Fraktion durch Zugabe von 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert (5 min Inkubation nach Zugabe des Wassers, dann Zentrifugation 13000 rpm, 1 min). In diesem Zusammenhang konnte die Aufreinigungseffizienz durch wiederholtes Beladen der Säulen mit dem Eluat bzw. wiederholter Zentrifugation („*Reload*“) gesteigert werden.

#### **2.3.2.3 Spektrophotometrische Beurteilung isolierter DNA**

Nukleinsäuren weisen auf Grund der Purin- bzw. Pyrimidinbasen, welche aromatische Ringsysteme enthalten, ein Absorptionsmaximum von 260 nm auf. Diese Eigenschaft nutzt man für die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA. In diesem Zusammenhang verwendet man folgende Formel:

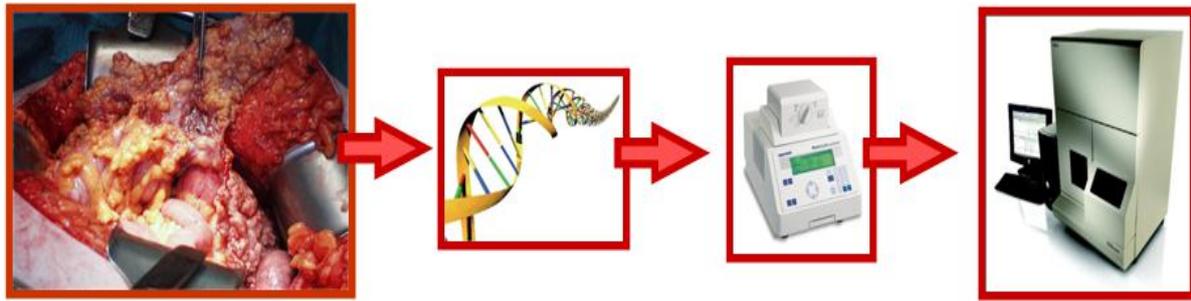
$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Konversionsfaktor } (\mu\text{g/ml}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$A_{260}$  = gemessene Absorption bei 260 nm

Diese besagt, dass eine Nukleinsäurelösung mit einer optischen Dichte von 1 eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  besitzt. Die spektrophotometrische Beurteilung der isolierten DNA aus Paraffingewebe bzw. Patientinnenserum erfolgte mittels Nano Drop Photometer von PeqLab in einem Volumen von 1-2  $\mu\text{l}$  unverdünnter DNA-Lösung. Die Reinheit der isolierten DNA konnte mit Hilfe des 260/280 Verhältnisses (Quotient der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm) ermittelt werden. Diese Werte sollten in einem Bereich von 1,8 bis 2 liegen. Proteine weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf, somit gilt die 260/280 Ratio als Maß für eine potentielle Verunreinigung mit Proteinen. Das 260/230 Verhältnis stellt den Quotienten der Absorptionswerte bei 260 und 230 nm dar, sollte im Bereich 2,0 bis 2,2 liegen und gibt Aufschluss über eine Kontaminationen mit Komponenten, die ein Absorptionsmaximum bei 230 nm aufweisen. Dies können z.B. Salze aus den verwendeten Waschpufferlösungen sein.

### 2.3.3 Bestimmung des LOH-Status in Gewebe und Serum

Die LOH-Detektion wurde durch ein mehrschrittiges Verfahren realisiert, welches in Abbildung 2-2 zusammenfassend dargestellt ist. Nach der Aufreinigung genomischer DNA aus Primärtumorgewebe und Serum wurde eine fluoreszenzbasierte Mikrosatelliten-PCR durchgeführt, gefolgt von einer kapillarelektrophoretischen Fragmentanalyse. Anschließend wurde das Verhältnis der beiden Allele in der Tumorprobe bestimmt und durch das Verhältnis der beiden Allele in der entsprechenden Referenz-DNA korrigiert (Tabelle 2-2). Im Rahmen der Berechnung dieses Allelverhältnisses wurde festgestellt, ob in der entsprechenden Patientinnenprobe ein LOH vorliegt.

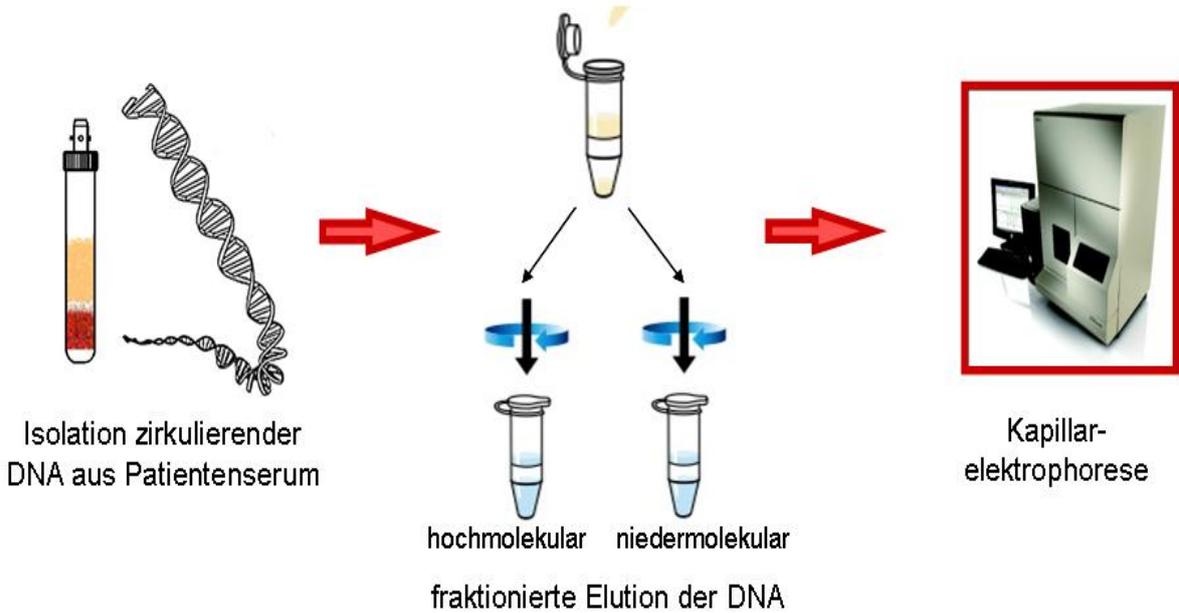


Operative Entfernung des Primärtumors

DNA-Extraktion aus FFPE-Tumorgewebe

Fluoreszenz-basierte Mikrosatelliten-PCR

Kapillarelektrophorese



Isolation zirkulierender DNA aus Patientenserum

hochmolekular niedermolekular  
fraktionierte Elution der DNA

Kapillarelektrophorese

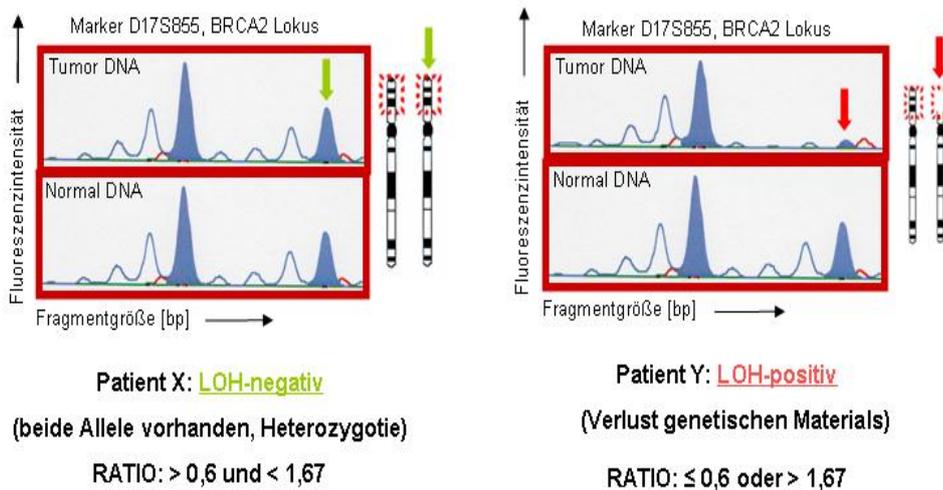


Abbildung 2-2: Workflow zur LOH-Analyse

### 2.3.3.1 Fluoreszenzbasierte Mikrosatelliten-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beschreibt ein molekularbiologisches Verfahren, das die selektive Amplifikation gewünschter DNA-Abschnitte erlaubt. Für die LOH-Analyse in Primärtumor und Serum sollten ausgewählte polymorphe Mikrosatellitenmarker (Tabelle 1-3) amplifiziert und kapillarelektrophoretisch analysiert werden. Hierfür wurde eine fluoreszenzbasierte Mikrosatelliten-PCR verwendet. Besonderheit dieses Systems ist, dass die eingesetzten *forward*-Primer eine Fluoreszenzmarkierung am 5' Ende aufweisen, welche die Detektion der entstandenen PCR-Produkte ermöglicht. Hierzu wurde jeweils ein Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 10 µl hergestellt, der sich aus 10x PCR-Puffer (1 µl), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (1 µl), 2 mM dNTP (1 µl), 20 µM 5'-*forward*-Fluoreszenzprimer (0,1 µl), 20 µM 3'-*reverse*-Primer (0,1 µl), AmpliTaqGold DNA-Polymerase (5 U/µl) (0,1 µl), nukelasefreiem H<sub>2</sub>O (ad 10 µl) und 10 ng gDNA-Template zusammensetzte. Die Reaktion beginnt mit einer Inkubation von 95 °C für 10 min. Dieser Schritt dient der Aktivierung der DNA-Polymerase. Der folgende PCR-Zyklus besteht aus Denaturierung der DNA (25 sec, 95 °C), Anlagerung der Primer bei primer-spezifischer Annealingtemperatur (30 sec) und der Synthese der PCR-Produkte (Elongation, 30 sec, 72°C). Der PCR-Zyklus wird 40 Mal wiederholt. Zum Schluss der PCR erfolgt eine Inkubation bei 72 °C für 7 min, um die Elongation zu vervollständigen und das Verfahren zu beenden. Die Annealingtemperaturen für die verwendeten Primer betragen 57°C (D10S1765), 56°C (D13S218), 54°C (D17S855) sowie 60°C (D6S1581). Für die Verbesserung der Amplifikationsbedingung niedermolekularer DNA aus dem Serum wurde Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) in einer Konzentration von 0,1 mM dem PCR-Reaktionsansatz zugegeben.

### 2.3.3.2 Kapillarelektrophorese

Die Analyse der fluoreszenzbasierten Mikrosatelliten-PCR erfolgte mittels 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (Abbildung 2-2). Durch den Einsatz von 5' fluoreszenzmarkierten *forward* Primern (Fluoreszenzfarbstoffe: TAMRA, FAM oder HEX) können die entstandenen Fragmente nach einer kapillarelektrophoretischen Auftrennung durch die Intensität des entsprechenden Fluoreszenzsignals quantifiziert werden. Das hohe Auflösungsvermögen des Genetic Analyzer Detektionssystems ermöglicht es, Allele zu diskriminieren, die sich nur um wenige Basenpaare in ihrer

Länge unterscheiden. Für die Analyse der PCR-Produkte, die DNA im einzelsträngigen Zustand erfordert, wurde die DNA zunächst denaturiert. Hierzu wurden 0,5 µl PCR-Produkt mit 40 µl HiDi™ Formamid und 0,2 µl internem Größenstandard (500-ROX, Applied Biosystems) vermischt. Es erfolgte eine Inkubation bei 94 °C für 2 min. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Proben im Genetic Analyzer erfolgte bei 15 kV, 0,9 mA und 60 °C.

### 2.3.3.3 Evaluation des LOH-Status

Die Analyse der Fragmentlänge sowie die Fluoreszenzintensität der untersuchten PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der GeneScan™ Software (Applied Biosystems). Für die Bestimmung des LOH-Status einer Patientinnenprobe wurde ein Verhältnis aus den Signalintensitäten der beiden Allele im Tumor bzw. im Serum gebildet und durch das entsprechende Verhältnis der Allele in der Normalreferenz (DNA aus tumorfreien Lymphknoten) korrigiert. Eine entsprechende Patientinnenprobe wurde als „LOH-positiv“ gewertet, sobald der finale Quotient einen Wert  $\leq 0,6$  oder  $> 1,67$  anzeigte (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Berechnung des Allel-Verhältnisses

	Fluoreszenzintensität „rechter Peak“ (Referenz-DNA)
	-----
	Fluoreszenzintensität „linker Peak“ (Referenz-DNA)
<b>Allel-Verhältnis =</b>	-----
	Fluoreszenzintensität „rechter Peak“ (Tumor-DNA)
	-----
	Fluoreszenzintensität „linker Peak“ (Tumor-DNA)

Homozygote Proben (d.h. Proben mit nicht polymorpher Mikrosatellitensequenz), sowie Proben mit nicht analysierbaren Peaks wurden als „nicht informativ“ gewertet.

### 2.3.3.4 Statistische Auswertung der LOH Analyse

Die statistische Auswertung der LOH-Analyse im Primärtumor sowie im Serum der Ovarialkarzinompatientinnen erfolgte mit dem SPSS Software Paket (Version 18.0, SPSS Inc. Chicago, IL). Der *Chi-Quadrat*, der *Two-Tailed Fischer's Exact Test* und der Test auf univariate binäre logistische Regression wurden genutzt, um Assoziationen zwischen der LOH-Inzidenz im Primärtumor bzw. in zirDNA und den klinischen

Parametern der Patientinnen zu identifizieren. Zusätzlich wurde der *Mann-Whitney-U Test* und der *Wilcoxon-W Test* für den nicht parametrischen Vergleich von zwei unabhängigen bzw. zwei abhängigen Variablen genutzt. Die Analyse einer prognostischen Signifikanz von LOH wurde mit Hilfe einer Kaplan-Meier Analyse realisiert. Der *Log-Rank (Mantel-Cox) Test* wurde für die statistische Analyse verwendet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

#### **2.3.4 Detektion disseminierter Tumorzellen**

Die Detektion von DTZ im KM der Ovarialkarzinompatientinnen erfolgte routinemäßig durch Mitarbeiter des wissenschaftlichen Laboratoriums der Unifrauenklinik Essen. Die gewonnenen Daten wurden für diese Dissertation verwendet. Das Verfahren ist in Abbildung 2-3 schematisch dargestellt und besteht aus einer Dichtegradientenzentrifugation, einer Isolation der mononukleären Zellen (MNZ) und dem immunzytochemischen Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen innerhalb der MNZ-Fraktion (Micro-met Kit). Hierzu wurden zum Zeitpunkt der Primärdiagnose bzw. nach Chemotherapie je 5 – 10 ml KM aus beiden Beckenkämmen aspiriert und heparinisiert (5000 U/ml KM). Diese Prozedur erfolgte unter Lokalanästhesie mittels Mepivacain und das gewonnene KM wurde innerhalb der nächsten 24 h weiter prozessiert. Das Verfahren zur Isolation und Detektion von DTZ wurde, gemäß den Richtlinien der „*German Consensus Group of Senology*“, durchgeführt (Fehm et al., 2006). Insgesamt wurden  $8 \times 10^6$  MNZ pro Patientin analysiert. Die Färbung Zytokeratin-positiver Zellen erfolgte mit Hilfe des murinen monoklonalen Antikörpers A45-B/B3, der ein gemeinsames Epitop einer Vielzahl von Zytokeratin-Polypeptiden, inklusive der Zytokeratin Heterodimere 8/18 und 8/19, erkennt (Borgen et al., 1999; Fehm et al., 2006). Die mikroskopische Analyse der Zytospin-Präparate wurde mit Hilfe eines ARIOL-Systems der Firma Leica gemäß der Evaluationskriterien der „*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE)*“ und dem DTZ-Konsensus durchgeführt (Borgen et al., 1999; Fehm et al., 2006). Das ARIOL-System ist eine Auswertereinheit und besteht aus einem Slide-Loader, einer Kamera und einem Computer. Mit Hilfe dieser Apparatur ist ein automatisiertes Scannen der angefertigten Objektträger möglich. Die aufgenommenen Einzelbilder wurden durch die interne Software gemäß der Parameter Farbe, Färbungsintensität, Größe, Färbungsmuster und Gestalt analysiert.

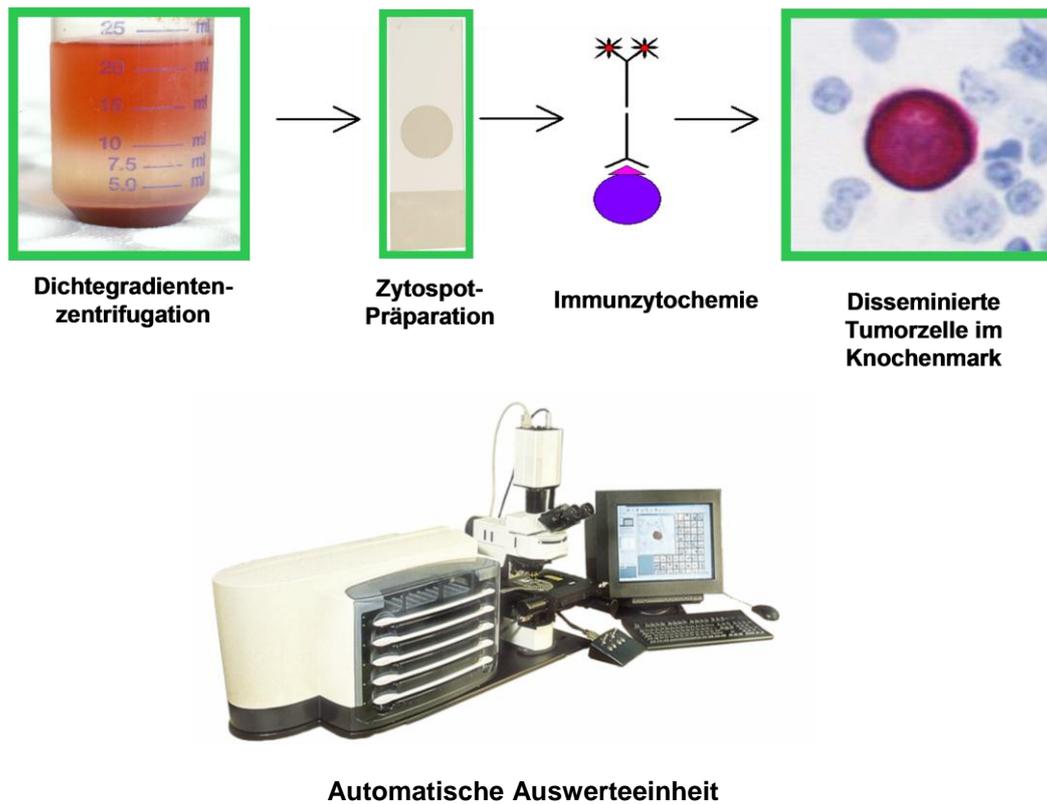


Abbildung 2-3: Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

## 2.3.5 microRNA-Analyse

### 2.3.5.1 Isolation zirkulierender microRNA aus Serum

Für die miRNA Untersuchung im Rahmen der Microarrayanalyse, sowie der Einzelbestimmung im Serum der Ovarialkarzinompatientinnen, wurde zirkulierende RNA (inklusive miRNA-Fraktion) mit Hilfe des miRVana Kit (Ambion) isoliert. Alle Schritte wurden gemäß Werksprotokoll durchgeführt. Das Serum wurde auf Eis aufgetaut und es folgte eine Denaturierung der Serumprobe mit 1 Volumen Denaturierungslösung und einer kräftigen Durchmischung des Ansatzes für 15 Sekunden. Im Folgenden wurde in den denaturierten Serumansatz 5  $\mu$ l einer 5 fmol/ $\mu$ l syn-cel-miR-54 Spike-In Lösung / 400  $\mu$ l Serum hinzugegeben und die Probe für 5 min auf Eis inkubiert. Im Rahmen der organischen Extraktion wurden im Folgenden 1 Volumen saure Phenol-Chloroform Lösung hinzugegeben, die Probe kräftig durchmischt und für 15 min bei 13000xg und RT zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu begünstigen. Danach wurde die obere aquatische Phase abgenommen, mit 1,25 Volumen 100% Ethanol

versetzt und gemischt, so dass ein homogenes Lysat-Ethanol-Gemisch entstand, welches anschließend auf die Membran einer Filtersäule gegeben wurde. Durch Zentrifugation bei 12000xg für 1 min konnte das Lysat den Filter passieren, wobei die in der Lösung befindliche RNA (inklusive miRNA-Fraktion) an die Filtermembran bindet. Anschließend wurde die Säule mit 700 µl Waschlösung 1 bzw. 2 x 500 µl Waschlösung 2 gereinigt und trocken zentrifugiert (10000xg, 1 min, RT). Zum Schluss wurde die RNA in 100 µl RNase freiem Wasser eluiert und bei -80°C bis zur nachfolgenden Analyse aufbewahrt.

### **2.3.5.2 microRNA-Isolation aus FFT**

Für die miRNA Bestimmung im primären Ovarialkarzinomgewebe wurde Gesamt-RNA (inkl. miRNA-Fraktion) aus kryokonserviertem Frischgewebe (*fresh frozen tissue*, FFT) sowie aus Paraffin eingebettetem, formalinfixiertem Gewebe (*formalin fixed paraffin embedded tissue*, FFPET) isoliert, welche im Rahmen einer operativen Intervention gewonnen wurde. Die miRNA Isolierung aus Frischgewebe erfolgte mit Hilfe des miRNeasy Mini Kit von Qiagen. Alle Schritte wurden gemäß Werksprotokoll durchgeführt. Etwa 30 mg Frischgewebe wurden noch im gefrorenen Zustand in 700 µl phenolhaltiges Qiazol-Lysereagenz überführt und durch ein Magna-Lyser System vollständig aufgeschlossen bzw. homogenisiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 140 µl Chloroform hinzugegeben und der Ansatz für 15 sec kräftig durchmischt, bzw. für 2-3 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (15 min, 12000xg, 4 °C), um eine Phasentrennung zu erleichtern. Die obere aquatische Phase wurde in ein separates Tube überführt, mit 1,5 Volumen 100% Ethanol versetzt, kräftig durchmischt, auf die Membran einer Filtersäule pipettiert und zentrifugiert (8000xg, 15 sec, RT). Der Durchfluss wurde verworfen. Ferner wurde die Filtersäule 1 x mit Puffer RWT (700 µl) und 2 x mit Puffer RPE (500 µl) gewaschen (8000xg, 15 sec, RT) und für 1 min bei 12000xg trocken zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert (8000xg, 1min, RT).

### **2.3.5.3 microRNA-Isolation aus FFPE**

Die Isolation von miRNA aus Paraffingewebe wurde mit Hilfe des miRNeasy FFPE Kit von Qiagen realisiert. Auch hier erfolgten alle Schritte gemäß Herstellerprotokoll. Für die vorliegenden Experimente wurde primäres Ovarialkarzinomgewebe bzw. gesundes Ovargewebe, welches im Rahmen einer operativen Intervention gewonnen

wurde, verwendet. Dieses wurde direkt nach Exzision am Institut für Pathologie aufbereitet, d.h. in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Für die miRNA Analysen wurden HE-Schnitte angefertigt und es wurden durch einen Pathologen des Uniklinikums Essen Gewebeareale mit maximal möglichem Tumoranteil bzw. Gewebeareale aus gesunden Ovarien abgrenzend gekennzeichnet. In den meisten Fällen betrug der Anteil an Tumorzellen im gekennzeichneten Tumorgewebe, in Relation zu kontaminierendem Tumorstroma etwa 60% oder mehr. Es folgte die Anfertigung von drei 0,6 mm Stenzen aus den markierten Bereichen. Für die Entparaffinierung wurden je drei Stenzen pro Ansatz unter kräftigem Schütteln (650 rpm) in einer Xylol-Lösung inkubiert (5 min, 56 °C). Es folgte eine Zentrifugation (12000xg, 2 min) und das Pellet wurde einmal in 100% Ethanol gewaschen (1 ml, 12000xg, 2 min). Anschließend wurde das Pellet getrocknet (Inkubation 10 min, 56 °C) und für einen proteolytischen Verdau mit 240 µl Puffer PKD bzw. 20 µl Proteinase K versetzt. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes auf dem Thermoschüttler bei 56 °C und 200 rpm über Nacht. Nach den ersten zwei Stunden Inkubation sowie am Folgetag wurden noch einmal je 20 µl Proteinase K hinzugegeben, um einen vollständigen Aufschluss des Gewebes zu gewährleisten. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 80 °C bzw. 3 min auf Eis und eine Zentrifugation bei 20000xg für 15 min. Der Überstand wurde in ein separates Tube überführt und DNase I verdaut (Zugabe von 25 µl DNase-I-Booster-Puffer und 10 ml DNase I, Inkubation 15 min bei RT), um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Im Folgenden wurde 500 µl RBC-Puffer und 1750 µl 100% Ethanol hinzugegeben und der Ansatz kräftig durchmischt. Der Ansatz wurde nun analog zu der Aufarbeitung von Frischgewebe, durch eine Filtersäule zentrifugiert (2 min, 10000xg) und die Filtermembran zweimal mit RPE-Puffer gewaschen (500 µl, 2 min, 10000xg). Anschließend wurde der Ansatz Trockenzentrifugiert (12000xg, 5 min) und RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

#### **2.3.5.4 Array-basiertes microRNA-Profilung**

Die Identifikation differentiell exprimierter miRNA im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen im Vergleich zu Normalspenderseren erfolgte mit Hilfe eines miRNA Microarrays (G4471A Human, Amadid 29297, Sanger 14, Agilent), welcher die globale Analyse der miRNA-Expression erlaubte. Für die Microarrayanalyse wurde Gesamt-RNA (inkl. miRNA-Fraktion) aus je 600 µl Serum aufgereinigt und in 100 µl

RNAse-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Hilfe eines Speed-Vac Systems vollständig lyophilisiert und in 2 µl RNAse-freiem Wasser resuspendiert. Alle weiteren Schritte wurden gemäß Werksprotokoll durchgeführt (Abbildung 2-4).



**Isolation zirkulierender  
microRNA aus Serum**

**Labeling / Hybridisierung**

**Array-Scan**

Abbildung 2-4: Workflow zur miRNA-Microarrayanalyse

#### 2.3.5.4.1 Dephosphorylierung und Labeling

Für die Detektion im Rahmen des Arraysystems wurde die isolierte Gesamt-RNA Fraktion (inkl. miRNA-Fraktion) zunächst dephosphoryliert und mit Cyanine3-pCP, einem Fluoreszenzfarbstoff, gelabelt. Hierzu wurde jeweils ein Dephosphorylierungsansatz in einem Gesamtvolumen von 4 µl hergestellt (auf Eis), der sich aus 10x Calf-Intestine-Phosphatase-Puffer (0,4 µl), Labeling-Spike-In (1,1 µl), Calf Intestine Phosphatase (0,5 µl) und Template-RNA (2 µl) zusammensetzte. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 30 min bei 37 °C inkubiert und es erfolgte eine Denaturierung der RNA, um mögliche Sekundärstrukturen aufzulösen. Hierzu wurden 2,8 µl 100% Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben, der Ansatz für 6 min bei 100 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Es folgte das Labeling der RNA mit Cyanine3-pCP. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei 16 °C inkubiert und anschließend mit einem SpeedVac System bei 45 - 55 °C vollständig lyophilisiert. Anschließen wurde für das Cyanine3-pCP-Labeling ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 15,8 µl hergestellt, der sich aus 10x T4-RNA-Ligase-Puffer (1 µl), Cyanine3-pCP (3,0 µl), T4-RNA-Ligase (0,5 µl) und dephosphorylierter Template-RNA (11,3 µl) zusammensetzte. Die Labeling-Reaktion wurde unter Verwendung einer Labeling Spi-

ke-In-Oligonukleotidsequenz durchgeführt, so dass im weiteren Verlauf des Verfahrens eine Überprüfung der Labeling-Effizienz möglich war.

#### **2.3.5.4.2 Hybridisierung und Scanning**

Nachdem die zu analysierende RNA dephosphoryliert, denaturiert und Cyanine3-pCP gelabelt wurde, erfolgte die Hybridisierung auf dem Microarray. Es wurde jeweils ein Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 45 µl hergestellt, der sich aus RNase-freiem H<sub>2</sub>O (17 µl), Hybridisierungs-Spike-In (1 µl), 10x GE-Blocking-Agent (4,5 µl) und 2x Hi-RPM-Hybridisierungspuffer (22,5 µl) zusammensetzte. Auch hier wurde eine Spike-In Oligonukleotidsequenz definierter Menge verwendet, um die Hybridisierungseffizienz im Nachhinein überprüfen zu können. Der Ansatz wurde anschließend vorsichtig durchmischt, für 5 min bei 100 °C inkubiert und danach direkt auf Eis gestellt. Ein Array-Slide enthält vier bis acht individuelle Microarray-Felder. Auf den Arrayfeldern sind jeweils synthetische Oligonukleotide gespottet, die komplementär zu spezifischen microRNA Sequenzen sind. Bei der Hybridisierung binden die miRNA aus dem Serum an komplementäre Oligonukleotide auf dem Array, nicht gebundene Sequenzen werden durch nachfolgende Waschschriffe entfernt. Die Applikation der Hybridisierungsansätze auf die Array-Felder wurde mit Hilfe eines Gasket-Slides realisiert (Abbildung 2-4). Dieses ist mit acht Dichtungsringen ausgestattet, welche eine exakte Platzierung der Hybridisierungslösung auf die Array-Felder ermöglicht. Array-Slide und Gasket-Slide bilden eine feste Einheit für den Hybridisierungsvorgang, der für 20 h bei 55°C und 20 rpm inkubiert wird. Nach der Inkubation wurde der Hybridisierungsansatz in eine Küvette mit Puffer GE1 getaucht, und das Gasket-Slide wurde entfernt, so dass restliche, nicht an den Array gebundene RNA in die umgebene Pufferlösung entweichen konnte. Es folgte ein Waschen des Array-Slides für 5 min in Pufferlösung GE1, für 5 min in Pufferlösung GE2 (zuvor auf 37 °C temperiert) und für 30 sec in Acetonitril. Durch diesen mehrschrittigen Waschvorgang wurde sichergestellt, dass alle ungebundenen RNA-Moleküle aus dem Hybridisierungsansatz von dem Microarray entfernt werden. Zum Schluss erfolgte eine Fluoreszenzmessung mit Hilfe des Agilent Array Scanners.

### 2.3.5.5 Elektrophoretische „On-Chip“-Analyse von Nukleinsäuren

Die Fragmentanalyse im Rahmen der molekularen Charakterisierung von ZTZ sowie die qualitative Analyse zirkulierender RNA aus dem Serum wurde mit Hilfe des 2100 Bioanalyser (Agilent) realisiert. Dieses System ermöglicht durch einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff die kapillarelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren auf einer Chip-Apparatur (Abbildung 2-5). Für die Analyse der PCR-Produkte aus ZTZ-Lysaten (vgl. 2.3.6) wurde das DNA 1000 Kit der Firma Agilent verwendet, wohingegen für die Qualitätsbeurteilung zirkulierender RNA (vgl. 2.3.5) das RNA 6000 Nano Kit zur Verfügung stand. Alle Messungen wurden gemäß Werksprotokoll durchgeführt. In der „Chip-Priming-Station“ erfolgte zunächst die Beladung des Chips mit 3 x 9 µl Gel-Farbstoff-Gemisch. Die Verteilung des Gemisches im Kapillarsystem erfolgte über eine Applikationsspritze. Im Folgenden wurden je 5 µl RNA 6000 bzw. DNA 1000 Marker sowie je 1 µl RNA-Größenstandard auf den Chip geladen. Danach erfolgte die Applikation der zu analysierenden Proben (je 1 µl) und eine Durchmischung der Ansätze auf dem IKA Vortex Mixer für 60 sec und 2400 rpm. Direkt im Anschluss erfolgte die automatische Analyse auf dem 2100 Bioanalyser.



Abbildung 2-5: Darstellung des Agilent Bioanalyser 2100

### 2.3.5.6 qRT-PCR basierter Nachweis zirkulierender microRNA

Die relative Quantifizierung zirkulierender miRNA aus Serum bzw. Gewebe (FFT, FFPET) erfolgte durch quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Entstehung von PCR-Produkten in „Echtzeit“ ver-

folgt werden kann. Dies ermöglicht einen quantitativen Rückschluss auf die Ausgangsmenge des Templates. Ein häufiges Anwendungsgebiet der qRT-PCR ist die Quantifizierung der Genexpression, z.B. im Rahmen von Zellkulturexperimenten oder Gewebebiopsien. Hierfür wird zunächst RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, welche als Template für die qRT-PCR genutzt wird. Die Entstehung von PCR-Produkten wird anschließend durch ein fluoreszenzbasiertes Verfahren verfolgt. Die Amplifikation von muren miRNA Sequenzen, die nur eine Länge von ca. 21 - 23 nt umfassen, bedarf jedoch einer Modifikation des konventionellen PCR-Verfahrens, da mit herkömmlichen Primern (ca. 20 nt) ein solch kurzes Molekül nicht amplifiziert werden könnte. Für den Blut-, bzw. gewebeassoziierten Nachweis von miRNA wurde daher das miScript Kit von Qiagen gemäß Herstellerangaben verwendet. Dieses System weicht vom Prinzip der konventionellen PCR ab und ist auf die Amplifikation kurzer miRNA Sequenzen spezialisiert (Abbildung 2-6).

#### **2.3.5.6.1      Universelle reverse Transkription**

Zu Beginn der Analyse erfolgt eine universelle reverse Transkription. Entscheidend bei diesem Vorgang ist, dass hier in einem Schritt, d.h. „universell“, sämtliche mature miRNA Sequenzen in eine cDNA umgeschrieben werden. Dies steht im Gegensatz zu anderen kommerziellen Systemen, bei denen die Umschreibung in eine cDNA sequenzspezifisch abläuft. Durch eine RNA-Ribose-Polymerase Reaktion wird in einem ersten Schritt eine Poly-A-Sequenz an alle, in dem Ansatz vorhandenen RNA-Moleküle, angefügt (Polyadenylierung, Abbildung 2-6). Anschließend dockt ein Oligo-dT-Primer an die zuvor generierte Poly-A-Sequenz an und vermittelt die Synthese eines komplementären cDNA Gegenstranges, der als DNA-Template für die nachfolgende PCR-Amplifikation genutzt werden kann. Für die reverse Transkription wurde jeweils ein Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt, der sich aus 5x miScript HiFlex-Puffer (4 µl), RNase-freiem H<sub>2</sub>O (11 µl), 10x miScript Nucleics Mix (2 µl), Reverse Transcriptase Mix (1 µl) und RNA-Template (2 µl für die Serumanalyse, 10 ng für die Gewebeanalyse) zusammensetzte.

#### **2.3.5.6.2      Quantitative Real-Time-PCR**

Die synthetisierte cDNA diente als Template für die nachfolgende miRNA-Amplifikation. Diese wurde durch folgendes Prinzip realisiert: Der im Rahmen einer reversen Transkription verwendete Oligo-dT Primer enthält zusätzlich eine artifizielle Sequenz, den sogenannten „*Universal Tag*“. Dieser stellt ein zentrales Element für

die nachfolgende Amplifikation dar. In dem Reaktionsgemisch ist ein *forward* und ein *reverse* Primer enthalten. Der *forward* Primer bindet spezifisch auf der zu amplifizierenden miRNA Sequenz, der *reverse* Primer (Universal Primer) bindet auf dem *Universal Tag* (Abbildung 2-6). So wird die Amplifikation einer spezifischen miRNA realisiert, alle restlichen Schritte verlaufen nach dem Prinzip des konventionellen PCR Verfahrens. Für die miScript qRT-PCR wurde jeweils ein Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt, der sich aus 2x QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Mastermix (10 µl), 10x miScript Universal Primer (2 µl), 10x miScript Specific Primer (2 µl), RNase-freiem H<sub>2</sub>O (1 µl) und cDNA-Template (5 µl) zusammensetzte. Die Konzentration der einzusetzenden cDNA wurde so gewählt, dass beobachtete Signale in der qRT-PCR stets in einem optimalen Messbereich von Ct 15-30 lagen. Im Rahmen der Gewebeanalyse wurde daher eine cDNA Verdünnung von 1:160 (FFT) und 1:60 (FFPET) verwendet, wohingegen die Serumanalyse mit einer cDNA Verdünnung von 1:12,5 durchgeführt wurde. Abbildung 2-7 zeigt den Temperaturzyklus des miScript-System. Die Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte wird über ein optisches System, bzw. eine Fluoreszenzmessung in Echtzeit verfolgt. Im Reaktionsgemisch der qRT-PCR ist SYBR Green, ein Cyanin-Farbstoff asymmetrischer Struktur enthalten, der eine DNA-interkalierende Eigenschaft aufweist. Dieser Farbstoff wird zum fluoreszenzbasierten Nachweis entstehender PCR-Produkte (d.h. doppelsträngiger DNA) genutzt. Bei Bindung an doppelsträngige DNA weist SYBR Green ein Absorptionsmaximum bei 498 nm (blau) auf und bei entsprechender Anregung in diesem Wellenlängenbereich erfolgt eine Emission bei etwa 522 nm. Es liegt eine lineare Beziehung zwischen der Menge entstehender Amplikons und der gemessenen Fluoreszenzintensität vor. Das Auslesen der Fluoreszenz erfolgt immer während der Phase der Extension, so entsteht im Rahmen der sich wiederholenden Temperaturzyklen der charakteristische Verlauf einer Fluoreszenzkurve, mit exponentiellem Anstieg und entsprechender Plateauphase (Abbildung 2-7). Mit Hilfe dieser Kurve wird ein entsprechender Cycle-Threshold Wert (Ct) ermittelt, der als Maß für Quantifizierung der Template-cDNA gilt. Der Ct Wert beschreibt die Anzahl benötigter PCR-Zyklen, bis die gemessene Fluoreszenz einen Schwellenwert, den sogenannten „*threshold-value*“ schneidet. Dieser Schwellenwert sollte immer im linearen Anstieg der Fluoreszenzkurve liegen und über alle zu vergleichenden Proben hinweg konstant gewählt sein.

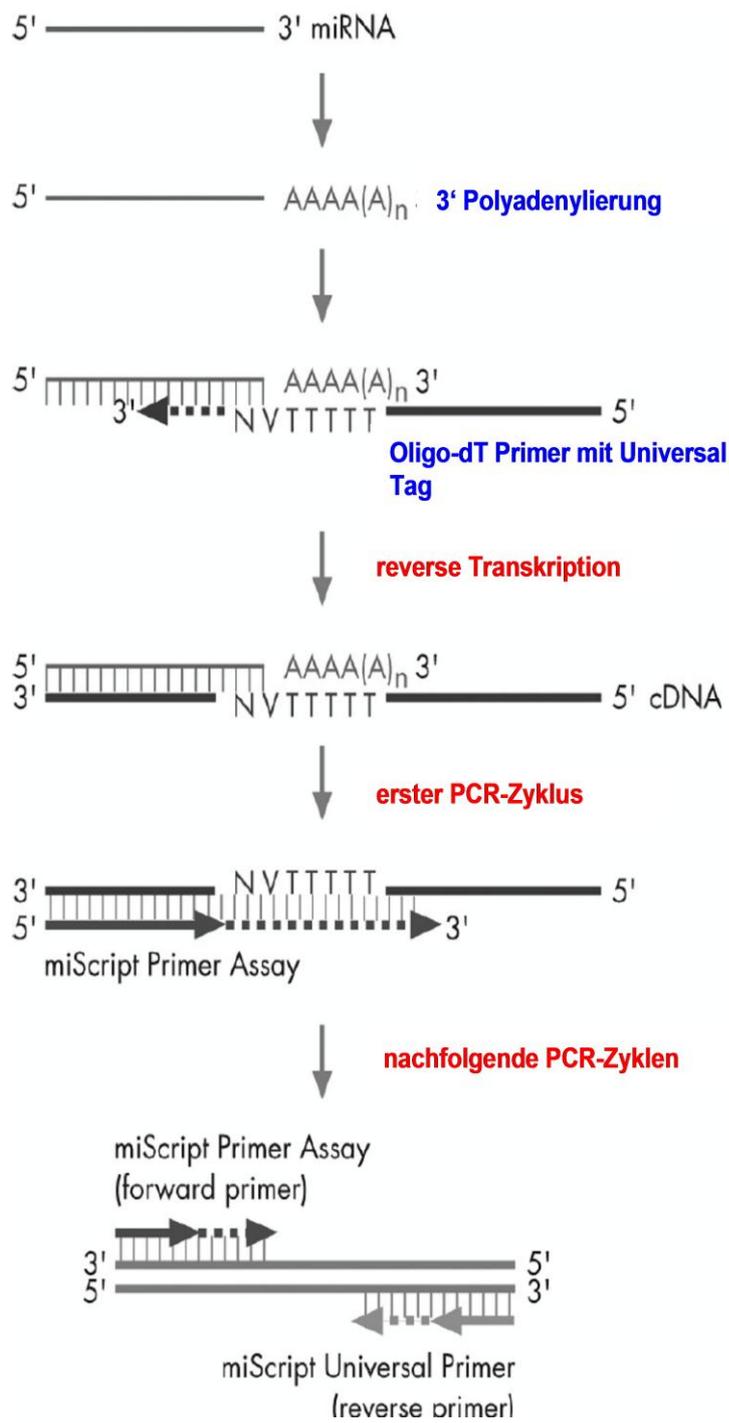


Abbildung 2-6: Prinzip des miScript-Assays (Bildquelle: Qiagen)

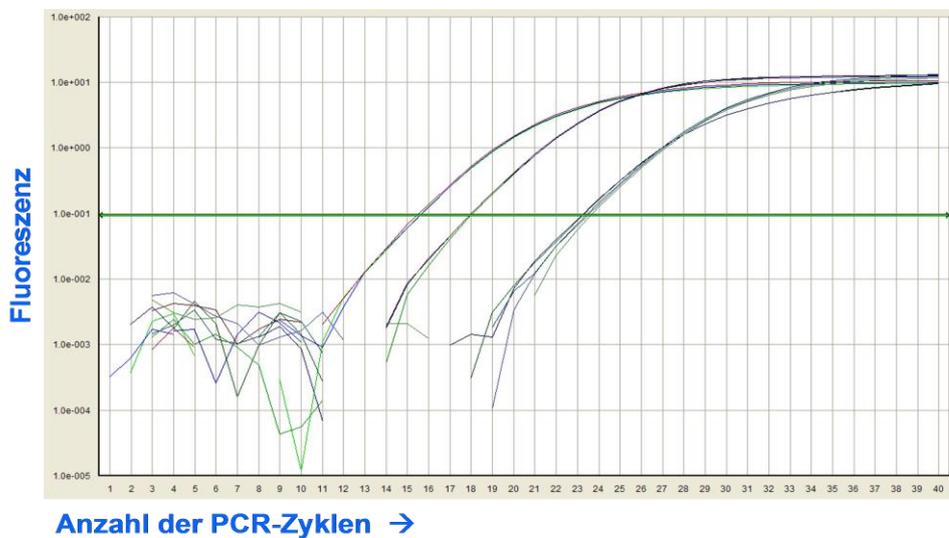
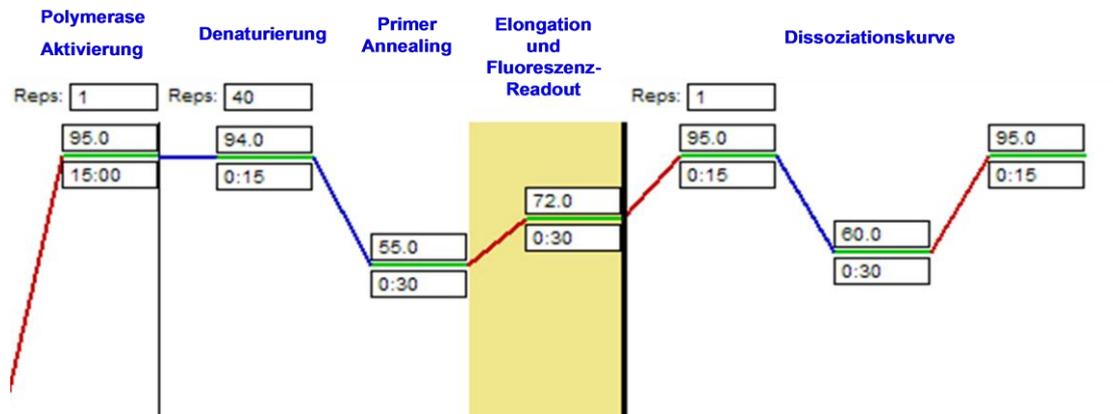


Abbildung 2-7: Temperaturzyklus und Amplifikationskurven der qRT-PCR

### 2.3.5.7 Serum-Proteaseverdau

Für die Untersuchung der Proteasesensitivität zirkulierender miRNA-Kandidaten im humanen Serum wurde ein Serum-Proteaseverdau nach Arroyo durchgeführt (Arroyo et al., 2011). Hierzu wurde Serum einer gesunden Spenderin in 12 Aliquots mit je 200  $\mu$ l Serum aufgeteilt. Die ersten 6 dieser Proben wurden mit 50  $\mu$ l Proteinase K versetzt, so dass im jeweiligen Ansatz eine Endkonzentration von 5 mg Protease / ml Serum erzielt wurde. Proben 6 bis 9 stellten Kontrollansätze dar und wurden jeweils mit 50  $\mu$ l PBS versetzt (Tabelle 2-3). Alle 12 Ansätze wurden bei 55 °C auf einem Thermoblock inkubiert. Gemäß der Versuchsvorschrift wurde in einem Zeitraum von 60 min exakt alle 10 min je eine proteaseverdaute Probe und eine Kontrollprobe aus dem Heizblock entfernt und unmittelbar einer miRNA-Isolation mit syn-cel-miR-54 Spike-In unterzogen (vgl. 3.3.4).

Tabelle 2-3: Versuchsvorschrift für den Proteaseverdau

Probe	Behandlung	Inkubation 55°C
1	5 mg/ml Protease	10 min
2	5 mg/ml Protease	20 min
3	5 mg/ml Protease	30 min
4	5 mg/ml Protease	40 min
5	5 mg/ml Protease	50 min
6	PBS	0 min
7	PBS	10 min
8	PBS	20 min
9	PBS	30 min
10	PBS	40 min
11	PBS	50 min

### 2.3.5.8 Statistische Auswertung

Erster Schritt für die Analyse der Microarraydaten war ein gruppenweiser Vergleich der miRNA Level im Serum der Ovarialkarzinompatientinnen, bzw. der Normalspendender. Mit Hilfe der GenSpring GX Software (Version 11.5.1.) wurde der Zwei-Stichproben-Proben-t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen durchgeführt. Ferner wurden miRNA mit einer differentiellen Expression  $\geq 2,0$  im Rahmen der Microarrayanalyse als tauglich für weitere Untersuchungen angesehen. Die statistische Analyse zur Bestimmung klinischer Relevanz der RNU2-1f wurde mit Hilfe des ABI Graph Pad Prism Programms (Version 5.03) realisiert. ROC-Kurven und der AUC-Wert wurden berechnet, um abzuschätzen, inwieweit die RNU2-1f Konzentration in der Zirkulation als diagnostisches Werkzeug für das Ovarialkarzinom verwendet werden kann, bzw. welcher Schwellenwert am besten geeignet ist, um zwischen Patientinnen und Normalspendern zu diskriminieren. Zusätzlich wurde der ungepaarte-

t-Test im Rahmen eines gruppenweisen Vergleiches genutzt, um die differenzielle Expression von RNU2-1f sowie die Korrelation mit klinischen Parametern zu untersuchen. Schließlich wurden Kaplan-Meier-Kurven für die Überlebensanalyse erstellt. Der *Log-Rank (Mantel-Cox) Test* wurde für die statistische Analyse verwendet. Ein p-Wert  $\leq 0.05$  galt als signifikant.

### 2.3.6 Isolation und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen

Der *AdnaTest OvarianCancer* ist eine Methode zur Isolation und molekularen Charakterisierung von ZTZ aus dem peripheren Blut. Dieses Verfahren besteht aus zwei Schritten und wurde durch die Firma Adnagen etabliert. Zunächst werden ZTZ durch eine immunomagnetische Anreicherung aus dem Blut aufgereinigt (*OvarianCancer-Select*). Hierfür werden Magnetpartikel genutzt, die mit Antikörpern gegen die epithelialen Oberflächenantigene GA 73.3 (EpCAM) und MUC-1 beschichtet sind. Die auf diesem Wege isolierten ZTZ werden anschließend lysiert. Ihre mRNA wird stabilisiert, immunomagnetisch aus dem Lysat aufgereinigt und durch Oligo-dT-Priming in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert. Es folgt ein semiquantitatives Multiplex-PCR Verfahren (*OvarianCancerDetect*) zum Nachweis tumorassoziierter Gentranskripte (GA733-2 (EpCAM), MUC-1 bzw. CA 125, Abbildung 2-8).

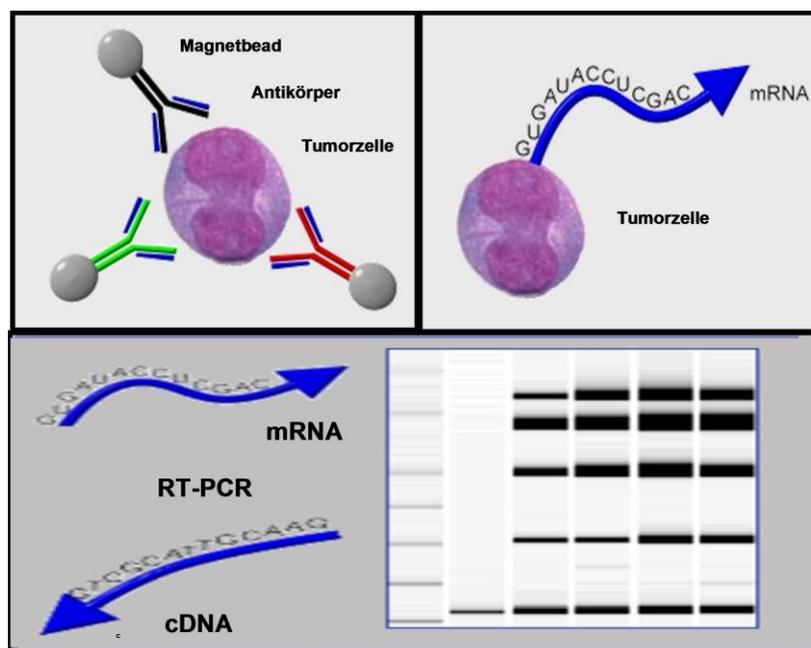


Abbildung 2-8: Prinzip zur Aufreinigung und Charakterisierung von ZTZ

### 2.3.6.1 Immunomagnetische Separation

Für die immunomagnetische Anreicherung der ZTZ (*OvarianCancerSelect*, Ausführung gemäß Werksprotokoll, Abbildung 2-9), wurden je 5 ml EDTA-Blut mit 100 µl magnetischen Beads (Verhältnis: 1 Mio. Beads / 1 ml Blut) versetzt und für 30 min auf einem Rotator bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde die Bindung, der im Blut befindlichen ZTZ, an die magnetischen Beads ermöglicht. Im Weiteren wurden die Bead-ZTZ-Komplexe magnetisch aufgereinigt und gewaschen (3 x 5 ml PBS, 1 x 1 ml PBS), um alle nichtgebundenen Blutbestandteile restlos zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung der Beads in 200 µl Lysis/Binding-Puffer. Dieser Schritt dient der vollständigen Lyse der ZTZ. Nach magnetischer Separation wurde das gewonnene Lysat abgenommen, umgehend bei -80 °C eingefroren und innerhalb von 14 Tagen weiter prozessiert.

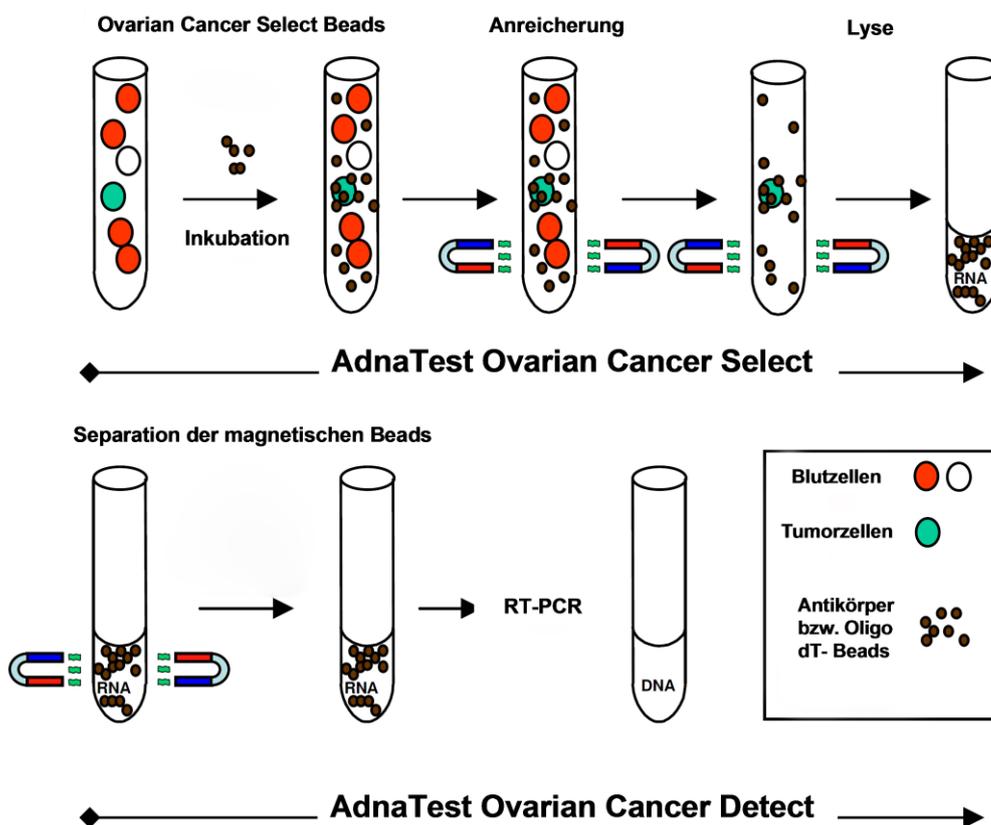


Abbildung 2-9: Workflow zur Anreicherung und Detektion von ZTZ (Bildquelle: Adnagen)

### 2.3.6.2 Reverse Transkription

Für die Detektion der ZTZ (*OvarianCancerDetect*, Ausführung gemäß Werksprotokoll) wurden zunächst Gentranskripte aus dem gewonnenen Lysat aufgereinigt. Hierzu wurden Oligo-(dT)<sub>25</sub>-Beads verwendet. Diese sind mit einem Poly-dT-Oligonukleotid behaftet, welches eine poly-A-Sequenz vermittelte Aufreinigung von mRNA ermöglicht. Dazu wurden je 20 µl Oligo-(dT)<sub>25</sub>-Beads in das zuvor gewonnene Lysat gegeben und der Ansatz für 10 min auf einem Rotator bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit je 100 µl Waschpuffer A, bzw. Waschpuffer B und einmal mit Tris-HCl Lösung (4 °C) gewaschen und anschließend in 14,25 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 50 °C und 650 rpm auf einem Thermomixer inkubiert und danach sofort für mindestens 2 min auf Eis gestellt. Der resuspendierte mRNA/Bead-Komplex wurde anschließend in cDNA umgeschrieben (SensiScript Kit, Qiagen). Hierzu wurde jeweils ein Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt, der sich aus 5x RT-Puffer (4 µl), dNTPs (1 µl), Bionline Reverse Transkriptase (0,5 µl), RNase Inhibitor (0,25 µl) und mRNA/Bead-Komplex (14,25 µl) zusammensetzte.

### 2.3.6.3 Multiplex-PCR *AdnaTestOvar*

Die gewonnene cDNA wurde im Folgenden durch ein Multiplex-PCR Verfahren auf die Expression der tumorassoziierten Gentranskripte GA733-2 (EpCAM), MUC-1 bzw. CA 125 hin analysiert. Als endogene Kontrolle der cDNA wurde in jeder Probe zusätzlich die β-Aktin Expression ermittelt. Das PCR-Verfahren wurde mit Hilfe des HotStarTaq Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierzu wurde jeweils ein Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 25 µl hergestellt, der sich aus HotStarTaq-Mix (12,5 µl), Nuclease-free-H<sub>2</sub>O (4,5 µl), Primermix *OvarianDetect* (4 µl) und Template-cDNA (4 µl) zusammensetzte. Folgende PCR-Fragmente sollten durch den PCR-Multiplexassay generiert werden: GA733-2 (EpCAM, 383 bp), MUC1 (293 bp), CA 125 (432 bp). Darstellung und Analyse der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des 2100 Bioanalyzer. Eine Blutprobe galt als ZTZ-positiv, sobald endogene β-Aktin Expression (> 1 ng/µl) sowie die Expression mindestens einer der genannten tumorassoziierten Transkripte (> 0,15 ng/µl) nachgewiesen werden konnte.

### 2.3.6.4 Analyse von ERCC1-Gentranskripten

Im Rahmen einer weiterführenden molekularen Charakterisierung der ZTZ wurde zusätzlich zu dem *AdnaTest OvarianCancer* die Expression von *Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 1* (ERCC1) best-

Tabelle 2-4: Reaktionsansatz für die ERCC1-Analyse

Komponente	eingesetzte Menge
HotStarTaq-Mix	25 µl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	13 µl
Primer ERCC1	4 µl
cDNA	8 µl
Gesamt	50 µl

immt. Selektion und cDNA-Synthese für dieses Verfahren wurden analog mit Hilfe des *OvarianCancerSelect* bzw. *OvarianCancerDetect* Kit realisiert. Der PCR-Ansatz jedoch wurde unter Verwendung anderer Volumenverhältnisse bzw. Temperaturbedingungen durchgeführt und ist in Tabelle 2-4, bzw. 2-5 dargestellt. Im Rahmen dieser Amplifikation sollte ein ERCC1 PCR-Fragment mit einer Größe von 366 bp entstehen.

Tabelle 2-5: Temperaturzyklus für die ERCC1-Analyse

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Ereignis
1	95 °C	15 min	1	Aktivierung der Taq-Polymerase
2	94 °C	30 sec	35	DNA-Denaturierung
3	60 °C	30 sec		Primer-Annealing
4	72 °C	60 sec		Polymerisation
5	72 °C	10 min	1	Elongation

### **2.3.6.5 Nachweis von EMT- und Stammzellmarkern**

Zusätzlich zu den bereits genannten tumorassoziierten Gentranskripten erfolgte eine separate Multiplex-Analyse zur Detektion von EMT- bzw. Stammzellmarkern der ZTZ. Selektion und reverse Transkription erfolgten hier prinzipiell analog gemäß Werksprotokoll, jedoch unter Verwendung des *EMT-1/StemCellSelect* bzw. *EMT-1/StemCellDetect* Kit, welches leichte Modifikationen, wie z.B. die Verwendung eines speziellen Waschpuffers bei der Selektion zur Reduktion des Hintergrundsignals, bzw. ein größeres Reaktionsvolumen der reversen Transkription beinhaltete. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die EMT-Marker PI3K $\alpha$  (595 bp, > 0,25 ng/ $\mu$ l), Akt-2 (306 bp, > 0,20 ng/ $\mu$ l), und Twist 1 (203 bp, > 0,15 ng/ $\mu$ l) untersucht. Ferner wurde ALDH1 (165 bp, > 0,15 ng/ $\mu$ l) als Marker für Stammzeleigenenschaft bestimmt.

### **2.3.6.6 Statistische Auswertung**

ROC-Analysen wurden durchgeführt um einen geeigneten diagnostischen Schwellenwert für ERCC1-Positivität zu ermitteln. Ferner wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt, um die prognostische Relevanz der ZTZ-Präsenz sowie der ERCC1-Expression zu ermitteln. Der Log-rank (Mantel-Cox) Test wurde zur Ermittlung von statistischer Signifikanz genutzt. Ein p-Wert  $\leq 0.05$  galt als signifikant.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 LOH-Analyse im Primärtumorgewebe

### 3.1.1 LOH-Inzidenz im Primärtumor

Aus dem Gesamtkollektiv der vorliegenden Dissertation (Tabelle 2-1) war die LOH-Analyse im Primärtumorgewebe für 88 Patientinnen möglich. Das Profil klinischer Parameter dieser Patientinnengruppe war vergleichbar mit dem des Gesamtkollektivs (Tabelle 3-1). Primäres Tumorgewebe (FFPE) dieser 88 Ovarialkarzinompatientinnen

Tabelle 3-1: Patientinnenkollektiv für die LOH-Analyse im Primärtumor

Anzahl Patientinnen: <b>88</b>	
mittleres Alter: <b>59</b> Jahre (Range: <b>21 - 81</b> Jahre)	
<b>FIGO-Stadium</b>	
FIGO I-II	21 (24%)
FIGO III	46 (52%)
FIGO VI	21 (24%)
<b>Lymphknotenstatus</b>	
N <sub>0</sub>	30 (35%)
N <sub>1</sub>	25 (28%)
N <sub>x</sub>	33 (38%)
<b>Grading</b>	
1-2	45 (51%)
3-4	43 (49%)
<b>Histologie</b>	
serös-papillär	68 (77%)
müzinös	5 (6%)
andere	15 (17%)
<b>Tumorrest</b>	
positiv	45 (52%)
negativ	41 (48%)
<b>DTZ vor Operation</b>	
positiv	26 (49%)
negativ	27 (51%)
<b>DTZ nach Chemotherapie</b>	
positiv	20 (50%)
negativ	20 (50%)

wurde auf die Inzidenz von LOH an vier Ovarialkarzinom-relevanten chromosomalen Regionen hin untersucht (Tabelle 1-3). Abbildung 3-1 zeigt die Resultate der LOH-Detektion am Beispiel des Mikrosatellitenmarkers D17S855 für zwei repräsentative Fälle aus dem vorliegenden Patientinnenkollektiv. Patient X ist heterozygot in Bezug auf diesen Marker, d.h. das Allelverhältnis liegt außerhalb des LOH-Definitionsbereiches von  $\leq 0,6$  bzw.  $> 1,67$ . Bei Patient Y liegt ein LOH vor, hier erkennt man eine deutliche Erniedrigung des längeren Allels in der Tumorprobe im Vergleich zu der Normalreferenz, entsprechend wurde ein Peak-Verhältnis  $> 1,67$  errechnet.

In dem untersuchten Patientinnenkollektiv konnte bei 56/88 Patientinnen (64%) mindestens ein LOH-Ereignis detektiert werden, wohingegen bei 30/88 Patientinnen (34%) Allelverluste an mindestens zwei der untersuchten chromosomalen Loci beobachtet wurden. Bei 8/88 Patientinnen (9%) zeigte sich ein LOH an mindestens drei Markern und 3/88 Patientinnen (3%) wiesen LOH an allen vier Markern D10S1765, D13S218, D6S1581 und D17S855 auf. Abbildung 3-2 zeigt das Profil der LOH-Inzidenz in den untersuchten Primärtumoren. Die allgemeine Verteilung der Allelverluste präsentierte sich heterogen. Der Mikrosatellitenmarker D10S1765 wies in 19% der untersuchten Fälle einen Allelverlust auf, wohingegen bei 50% der Patientinnen ein LOH des Markers D13S218 und D6S1581 detektiert werden konnte. Die höchste LOH-Frequenz konnte für den Marker D17S855 gezeigt werden (67%).

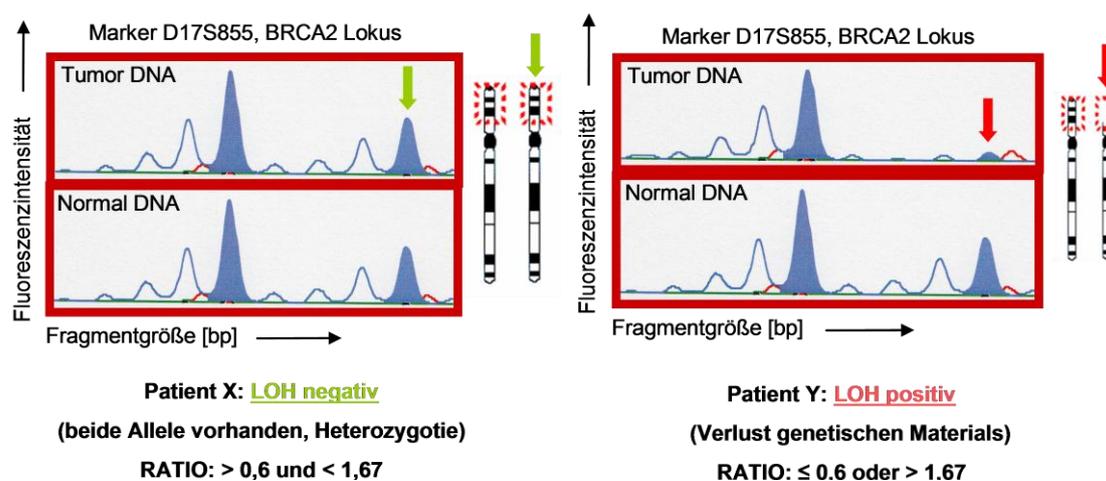


Abbildung 3-1: Prinzip der LOH-Detektion

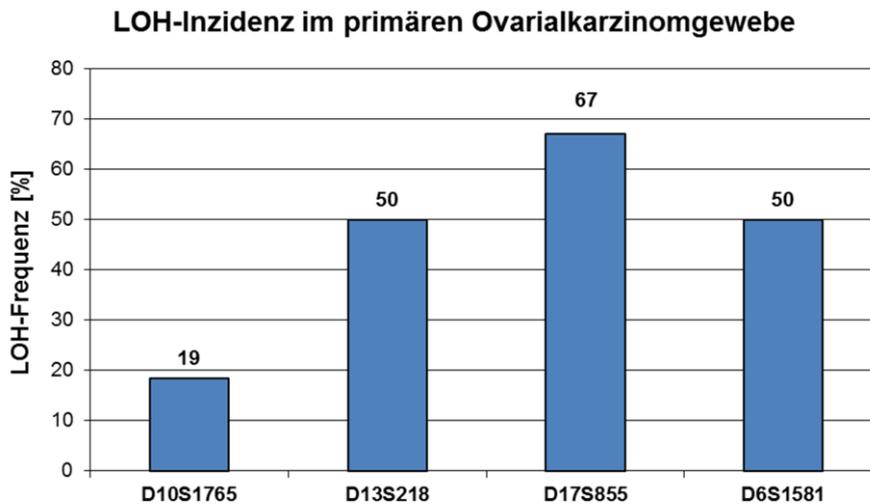


Abbildung 3-2: LOH-Inzidenz im primären Ovarialkarzinomgewebe

### 3.1.2 Klinische Relevanz der LOH im Primärtumor

Im Weiteren wurde die klinische Relevanz der LOH-Ereignisse im Primärtumor der Ovarialkarzinompatientinnen untersucht. Dazu wurde die Präsenz von LOH an den vier untersuchten chromosomalen Regionen mit den klinischen Parametern der Patientinnen korreliert. Insgesamt 67/88 Patientinnen (76%) des untersuchten Kollektivs konnten dem FIGO-Stadium III und IV zugeordnet werden. Der Medianwert des DFS betrug 9 Monate (Range: 1 – 34 Monate) und der Medianwert des OS betrug 34 Monate (Range: 1 – 85 Monate). Die Korrelation der LOH-Inzidenz mit klinischen Parametern des Patientinnenkollektivs sowie den Überlebensdaten ist in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Das OS korrelierte signifikant mit dem FIGO-Stadium ( $p = 0,003$ ), dem Nodalstatus ( $p = 0,051$ ), der Inzidenz von Fernmetastasen ( $p = 0,0001$ ), dem postoperativen Tumorrest ( $p = 0,0001$ ). Ferner korrelierte die LOH-Inzidenz des gesamten Marker-Panels signifikant mit dem Tumorgrading ( $p = 0,0001$ ) und dem histologischen Subtyp ( $p = 0,004$ ). Ein Allelverlust des Markers D10S1765 assoziierte signifikant mit einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium ( $p = 0,046$ ) und dem Tumorgrading ( $p = 0,050$ ), wohin Marker D17S1855 mit Tumorgrading und dem histologischen Subtyp korrelierte ( $p = 0,023$ , bzw.  $p = 0,012$ ). Es ergab sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Allelverlusten der evaluierten Mikrosatellitenmarkern und dem DFS sowie dem OS. Eine platinresistente Situation zeigte sich in 16/88 (18%) der untersuchten Patientinnen. Die Platinresistenz korrelierte signifikant mit dem OS ( $p = 0,0001$ ), jedoch zeigte sich auch hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der LOH-Inzidenz und einer Platinresistenz.

Tabelle 3-2: Klinische Relevanz der LOH im Primärtumor

n.s.: nicht signifikant	Total LOH	LOH D10S1765	LOH D13S218	LOH D17S855	LOHs D6S1581	DTZ vor Operation	DTZ nach Chemo- therapie	DFS	OS
<b>Tumorstadium (FIGO)</b>	n.s.	<b>p = 0,046</b>	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p = 0,022</b>	n.s.	n.s.	<b>p = 0,003</b>
<b>Nodalstatus</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p = 0,014</b>	<b>p = 0,051</b>
<b>Metastasierung (FIGO IV)</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p = 0,0001</b>
<b>Tumorgrading</b>	<b>p = 0,0001</b>	<b>p = 0,050</b>	n.s.	<b>p = 0,023</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Tumorrest</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p = 0,0001</b>
<b>Histologie</b>	<b>p = 0,004</b>	n.s.	n.s.	<b>p = 0,012</b>	n.s.	<b>p = 0,053</b>	n.s.	n.s.	no
<b>Platinresistenz</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p = 0,0001</b>
<b>DFS</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
<b>OS</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		

### 3.1.3 LOH und Tumorzell dissemination in das Knochenmark

Seit dem Jahre 2004 wurden in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Essen auch Analysen zu DTZ im KM bei Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom durchgeführt. Daher existierten zu den Patientinnen mit einer Primärdiagnose vor 2004 noch keine Daten bezüglich Tumorzell dissemination in das KM. Somit waren im Rahmen dieser Dissertation bei 53/88 Patientinnen vor Operation bzw. bei 40/88 Patientinnen nach Chemotherapie Daten über die Tumorzell dissemination verfügbar. Vor Therapie wiesen 26/53 Patientinnen (49%) DTZ im

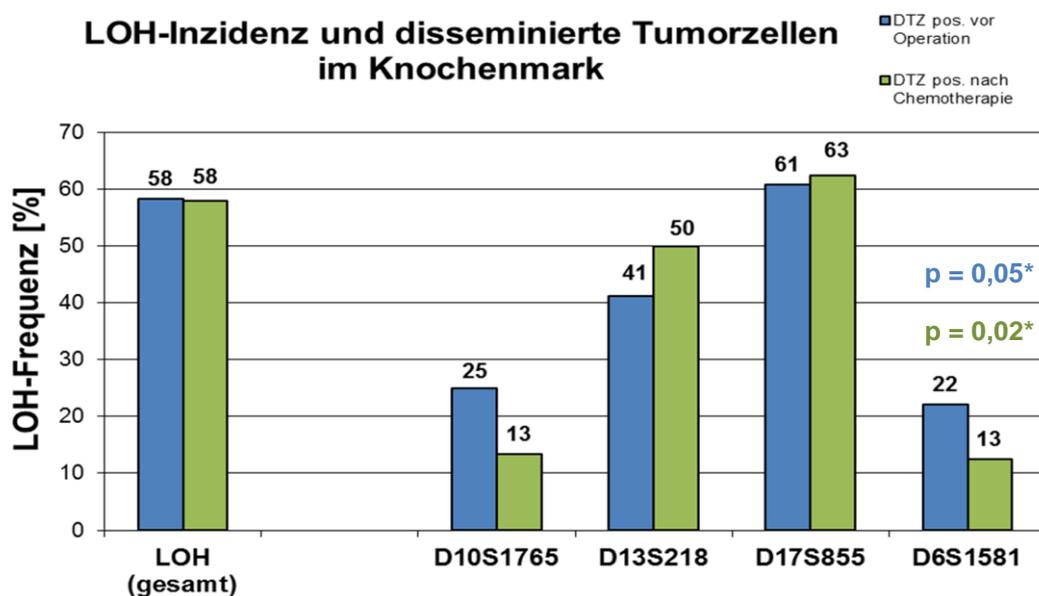


Abbildung 3-3: Korrelation der LOH-Inzidenz mit DTZ im Knochenmark

KM mit einem Medianwert von 6 Zellen /  $8 \times 10^6$  MNZ (Range: 1 - 38 Zellen) auf. Nach Chemotherapie konnten bei 20/40 Patientinnen (50%) DTZ mit einem Medianwert von 10 Zellen /  $8 \times 10^6$  MNZ (Range: 1 -35 Zellen) detektiert werden. Die Korrelation der DTZ-Inzidenz mit klinischen Parametern der Patientinnen ist in Tabelle 3-2 aufgeführt. Es ergab sich eine signifikante Korrelation der DTZ-Präsenz vor Operation mit dem FIGO-Stadium ( $p = 0,022$ ) sowie dem histologischen Subtyp ( $p = 0,053$ ). Abbildung 3-3 zeigt ferner die Assoziation der LOH-Ereignisse mit der Tumorzell dissemination in das KM. Die blauen Balken demonstrieren die LOH-Frequenzen der Patientinnen, die vor Operation disseminierte Tumorzellen im KM aufwiesen. Die grünen Balken zeigen die LOH-Häufigkeit der Patientinnen, die nach Chemotherapie noch DTZ im KM aufwiesen. In Bezug auf die gesamt LOH-Inzidenz konnte in diesen

beiden Patientinnengruppen kein Unterschied festgestellt werden. Erfolgte jedoch eine Aufschlüsselung in Bezug auf die vier unterschiedlichen chromosomalen Regionen, so zeigten DTZ-positive Patientinnen mit einem Allelverlust am PTEN-Lokus sowie proximal zum M6P/IGF2R-Lokus vor Operation eine höhere LOH-Frequenz als nach Chemotherapie. Für die BRCA1/2 Loci zeigte sich ein umgekehrter Sachverhalt. Diese Beobachtungen ergaben jedoch keine statistische Signifikanz. Betrachtet man jedoch die LOH-Inzidenz der Patientinnen mit DTZ-Positivität vor Operation bzw. nach Chemotherapie unabhängig voneinander, so ergab die statistische Analyse, dass ein LOH-Ereignis proximal zum M6P/IGF2R Locus (D6S1581) signifikant mit der Inzidenz von DTZ vor Operation, sowie nach Chemotherapie, korrelierte ( $p = 0,05$  bzw.  $p = 0,02$ ).

## **3.2 LOH-Analyse im Blut**

### **3.2.1 Fraktionierung und Quantifizierung zirkulierender DNA**

Im Weiteren sollte die LOH-Analyse im Rahmen der vier Mikrosatellitenmarker D10S1765, D13S218, D17S855 und D6S1581 vom Primärtumor der Patientinnen auf zellfreie zirDNA im Blut übertragen werden. Aus dem Gesamtkollektiv der vorliegenden Dissertation (Tabelle 2-1) war die blutbasierte LOH-Analyse für 63 Patientinnen möglich. Das Profil klinischer Parameter dieser Patientinnengruppe war vergleichbar mit dem des Gesamtkollektivs (Tabelle 3-3). Von diesen 63 Ovarialkarzinompatientinnen stand Serum von 63 Patientinnen vor Operation, sowie zusätzlich von 58 Patientinnen nach Chemotherapie, zur Verfügung. Aus dem Serum wurde zirDNA isoliert, fraktioniert und anschließend spektrophotometrisch quantifiziert. Der Gehalt an zirDNA in der HMF veränderte sich im Zuge der Chemotherapie nur marginal. In präoperativen Seren wurde hier eine mittlere DNA-Konzentration von 640 ng/ml Serum (Range 30 – 2460 ng/ml) ermittelt, wohingegen nach Chemotherapie ein DNA-Gehalt von 660 ng/ml Serum gemessen wurde, der allerdings eine etwas größere Streubreite aufwies (Range 60 – 2820 ng/ml, Abbildung 3-4). Interessanterweise zeigte sich jedoch in der NMF ein hoch signifikanter Abfall des Gehaltes an zirDNA nach Chemotherapie ( $p = 0,0001$ ). Vor Operation wurde eine mittlere Konzentration von 810 ng/ml Serum (Range 40 – 2060 ng/ml) gemessen, wohingegen nach Chemotherapie nur noch 380 ng/ml Serum (Range 40 – 1790 ng/ml) detektiert werden konnten. Mit Hilfe des *Mann-Whitney-U* Verfahrens konnte im Weiteren gezeigt wer-

den, dass eine signifikante Assoziation zwischen der zirDNA-Konzentration vor Operation und dem verbleibenden Tumorrest nach Operation bestand ( $p = 0,017$ ).

Tabelle 3-3: Patientinnenkollektiv für die LOH-Analyse im Blut

Anzahl Patientinnen: <b>63</b>	
mittleres Alter: <b>58</b> Jahre (Range: <b>21 - 81</b> Jahre)	
<b>FIGO-Stadium</b>	
FIGO I-II	13 (21%)
FIGO III	35 (56%)
FIGO VI	15 (24%)
<b>Lymphknotenstatus</b>	
N <sub>0</sub>	22 (35%)
N <sub>1</sub>	20 (32%)
N <sub>x</sub>	21 (33%)
<b>Grading</b>	
1-2	31 (49%)
3-4	32 (51%)
<b>Histologie</b>	
serös-papillär	50 (79%)
müzinös	3 (5%)
andere	10 (16%)
<b>Tumorrest</b>	
positiv	33 (52%)
negativ	30 (48%)
<b>DTZ vor Operation</b>	
positiv	27 (51%)
negativ	26 (49%)
<b>DTZ nach Chemotherapie</b>	
positiv	20 (50%)
negativ	20 (50%)

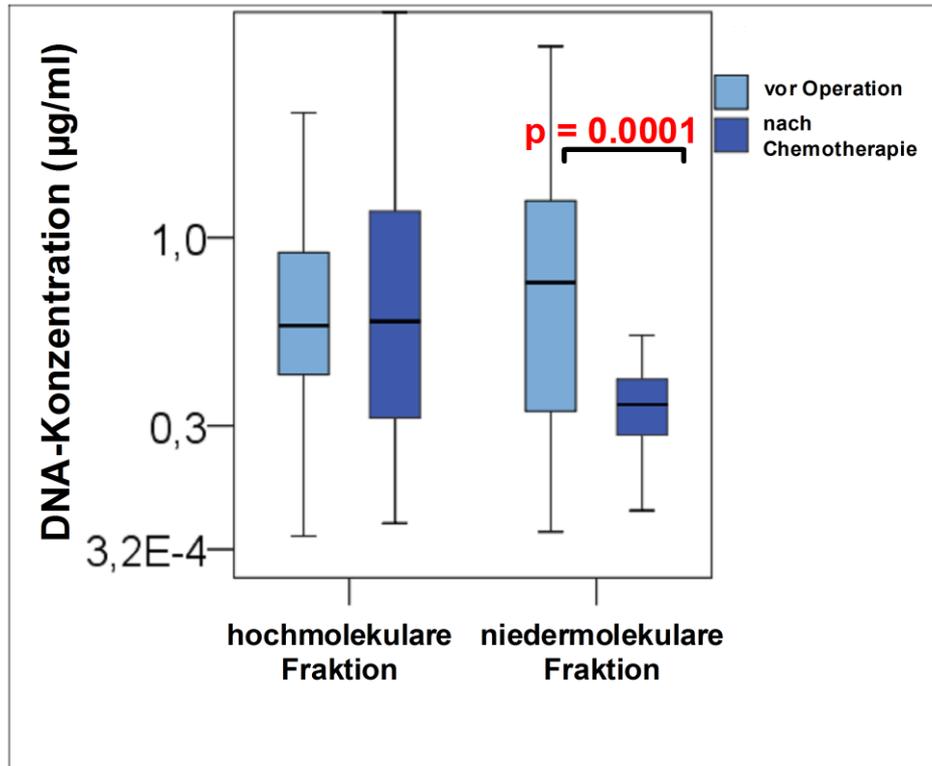


Abbildung 3-4: Quantifizierung zirkulierender DNA im Serum

### 3.2.2 LOH-Inzidenz im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen

Vor Therapie konnte bei 31/63 Patientinnen (49%) mindestens ein LOH-Ereignis in einer der beiden Fraktionen (HMF bzw. NMF) nachgewiesen werden, wohingegen nach Chemotherapie bei 24/58 Patientinnen (41%) mindestens ein LOH detektiert wurde. Die Verteilung der LOH-Ereignisse der Ovarialkarzinom-relevanten Mikrosatellitenmarker ist in Abbildung 3-5 graphisch dargestellt. LOH in der HMF stellte mit einer globalen Inzidenz von 13% vor Operation und 21% nach Chemotherapie ein verhältnismäßig seltenes Ereignis dar. Anders in der NMF, hier konnte LOH mit einer globalen Frequenz von 67% vor Operation bzw. 45% nach Chemotherapie recht häufig nachgewiesen werden. Allelverluste am Marker D6S1581 in der NMF wurden insgesamt sowohl vor Operation als auch nach Chemotherapie am häufigsten beobachtet. Interessanterweise fiel in diesem Zusammenhang auf, dass sich die LOH-Inzidenz auch nach vollendeter systemischer Chemotherapie nur moderat verringerte. Ferner lag bei einer Subgruppe (19/63 Patientinnen, 30%) zum Zeitpunkt der Primärdiagnose kein Allelverlust an den untersuchten Mikrosatellitenmarkern vor, wohingegen nach Therapie bei diesen Patientinnen ein neuerlich erworbener Allelverlust an mindestens einem der Marker detektiert werden konnte („de novo“ LOH).

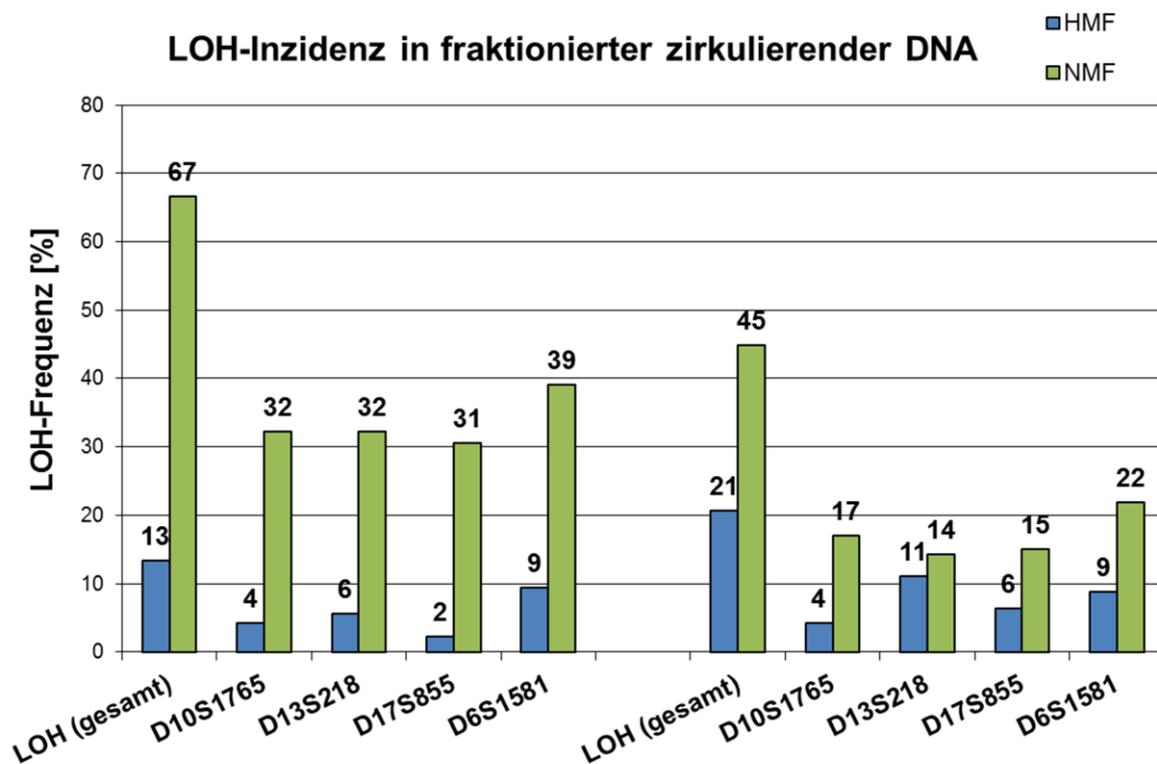


Abbildung 3-5: LOH-Inzidenz in fraktionierter zirkulierender DNA

### 3.2.3 Korrelation der LOH-Inzidenz mit disseminierten Tumorzellen

Insgesamt konnten bei 53/63 Patientinnen vor Operation und bei 40/58 Patientinnen nach Chemotherapie DTZ im KM bestimmt werden. Vor Operation erwiesen sich 26/53 Patientinnen (49%) positiv für die Präsenz von DTZ im KM mit einem Medianwert von 6 Zellen /  $8 \times 10^6$  MNZ (Range 1 – 38 Zellen). Nach Chemotherapie konnten bei 20/40 Patientinnen (50%) DTZ mit einem Medianwert von 10 Zellen /  $8 \times 10^6$  MNZ (Range 1 - 35 Zellen) nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung ergab ferner, dass nach Chemotherapie LOH in der NMF am Marker D10S1765 (PTEN-Lokus) signifikant mit der Präsenz von DTZ nach Chemotherapie korrelierte ( $p = 0.017$ ).

Tabelle 3-4: Klinische Signifikanz zirkulierender LOH

n.s.: nicht signifikant	DNA Konzentration HMF vor Operation	LOH D10S1765 kombinierte Fraktion vor Operation	LOH D10S1765 HMF vor Operation	LOH D10S1765 NMF vor Operation	LOH D10S1765 NMF nach Chemotherapie	LOH D13S218 NMF vor Operation	LOH D13S218 kombinierte Fraktion vor Operation	LOH D6S1581 kombinierte Fraktion vor Operation
<b>Tumorstadium (FIGO)</b>	n.s.	n.s.	<b>p = 0.035</b>	n.s.	n.s.	<b>p = 0.033</b>	<b>p = 0.012</b>	n.s.
<b>Nodalstatus</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Metastasierung (FIGO IV)</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Tumorgrading</b>	n.s.	<b>p = 0.012</b>	n.s.	<b>p = 0.004</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Tumorrest</b>	<b>p = 0.017</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Histologie</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Platinresistenz</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>PFS</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>OS</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p = 0.030</b>
<b>DTZ nach Chemotherapie</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p = 0.017</b>	n.s.	n.s.	n.s.

### 3.2.4 Klinische Relevanz der LOH im Serum

Im Folgenden wurde die LOH-Inzidenz im Serum mit den klinischen Parametern der Ovarialkarzinompatientinnen korreliert (Tabelle 3-4). Vor Therapie ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen LOH am Marker D10S1765 (HMF) und D13S218 (NMF und kombinierte Fraktion) und dem FIGO-Stadium ( $p = 0,035$ ,  $p = 0,033$ ,  $p = 0,012$ ). Des Weiteren assoziierte ein Allelverlust am Marker D10S1765 in der NMF alleine sowie in beiden Fraktionen kombiniert mit dem Tumorgrading ( $p = 0,004$ , bzw.  $p = 0,012$ ). In der vorliegenden Analyse ergab sich statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen LOH in zirDNA und dem Auftreten einer Platinresistenz. Mit Hilfe eine Kaplan-Meier Analyse wurde ferner die prognostische Sig-

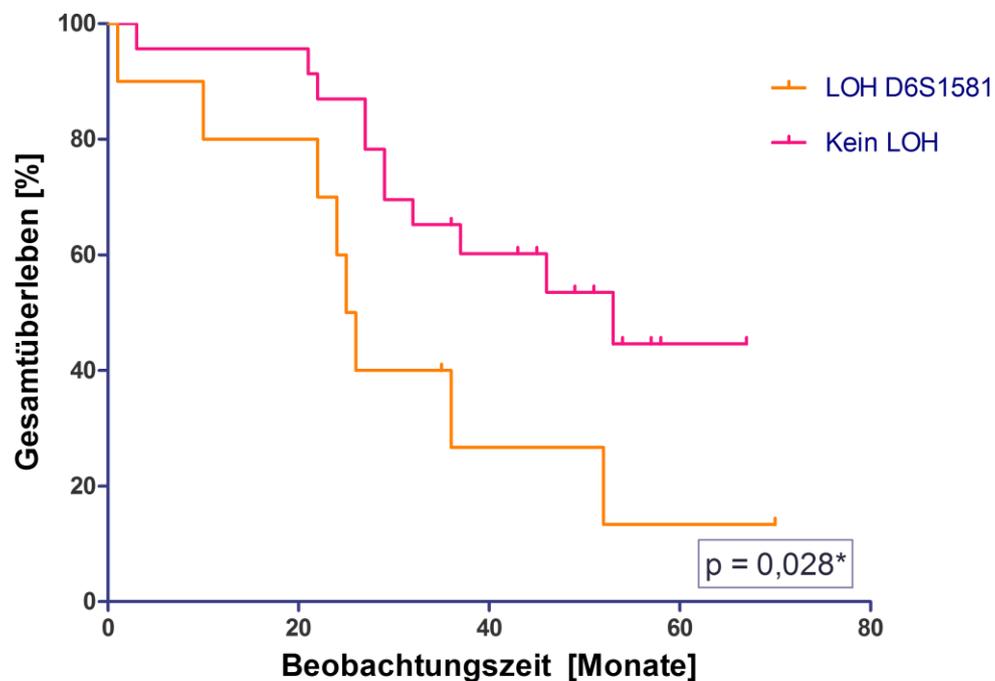


Abbildung 3-6: LOH proximal zum M6P/IGF2R und das OS

nifikanz der LOH im Serum untersucht. LOH am Marker D6S1581 in beiden Fraktionen zusammen (kombinierte Fraktion), konnte vor Therapie als prädiktiv für ein verkürztes OS ermittelt werden ( $p = 0,028$ , Abbildung 3-6). Keiner der untersuchten Mikrosatellitenmarker korrelierte mit dem DFS der Patientinnen.

### **3.3 microRNA-Analyse im Blut**

#### **3.3.1 Etablierung einer Microarrayanalyse aus Humanserum**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, das Profil zirkulierender miRNA im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen, im Hinblick auf die Identifikation neuer blutbasierter Biomarker, zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollten differentiell exprimierte miRNA-Kandidaten identifiziert und deren Tauglichkeit als Biomarker für das Ovarialkarzinom validiert werden. Erster Schritt dieses Konzeptes sollte im Rahmen eines „*unbiased approach*“ d. h. durch eine Microarrayanalyse realisiert werden, mit der das globale miRNA Profil im Patientinnenserum untersucht werden kann. Aus experimenteller Sicht erforderte dieses Vorhaben zunächst eine umfassende Charakterisierung zirkulierender RNA im Serum unter qualitativen bzw. quantitativen Gesichtspunkten.

##### **3.3.1.1 Qualitative Beurteilung zirkulierender RNA**

Zur qualitativen Charakterisierung wurde RNA (inkl. miRNA-Fraktion) aus Serum von Ovarialkarzinompatientinnen und Normalspendern (je 600 µl) bzw. aus frischen ovariellen Epithelzellen gesunder Ovarien (OSE-Zellen, im Rahmen einer Adnexektomie zur Verfügung gestellt) aufgereinigt und mittels Bioanalyzer elektrophoretisch untersucht. Abbildung 3-7 zeigt repräsentative Elektropherogramme. Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen, auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität. Je größer ein RNA-Fragment ist, desto mehr Zeit braucht es, um im Spannungsfeld durch die Kapillaren zu wandern, bis es im Detektionsfenster durch einen Lasersystem erkannt wird. Das Profil der RNA aus OSE-Zellen weist charakteristische 18S und 28S ribosomale Banden auf, die als Maß für die Integrität einer RNA-Probe genutzt werden können. Beide Peaks sind gut ausgeprägt und stehen in einem regelgerechten Verhältnis zueinander, was auf hohe Integrität der vorliegenden RNA hinwies. Das RNA-Profil der zirkulierenden RNA aus dem Serum jedoch zeigte ein völlig anderes Erscheinungsbild. Die RNA war mit 113 pg/µl recht niedrig konzentriert und nahezu vollständig fragmentiert. Dies wird durch einen sehr „stumpf“ erscheinenden Peak im Sekundenbereich < 30 angezeigt. Es kann somit gefolgert werden, dass zirkulierende RNA im Blut in einer sehr fragmentierten und niedrig konzentrierten Form vorliegt.

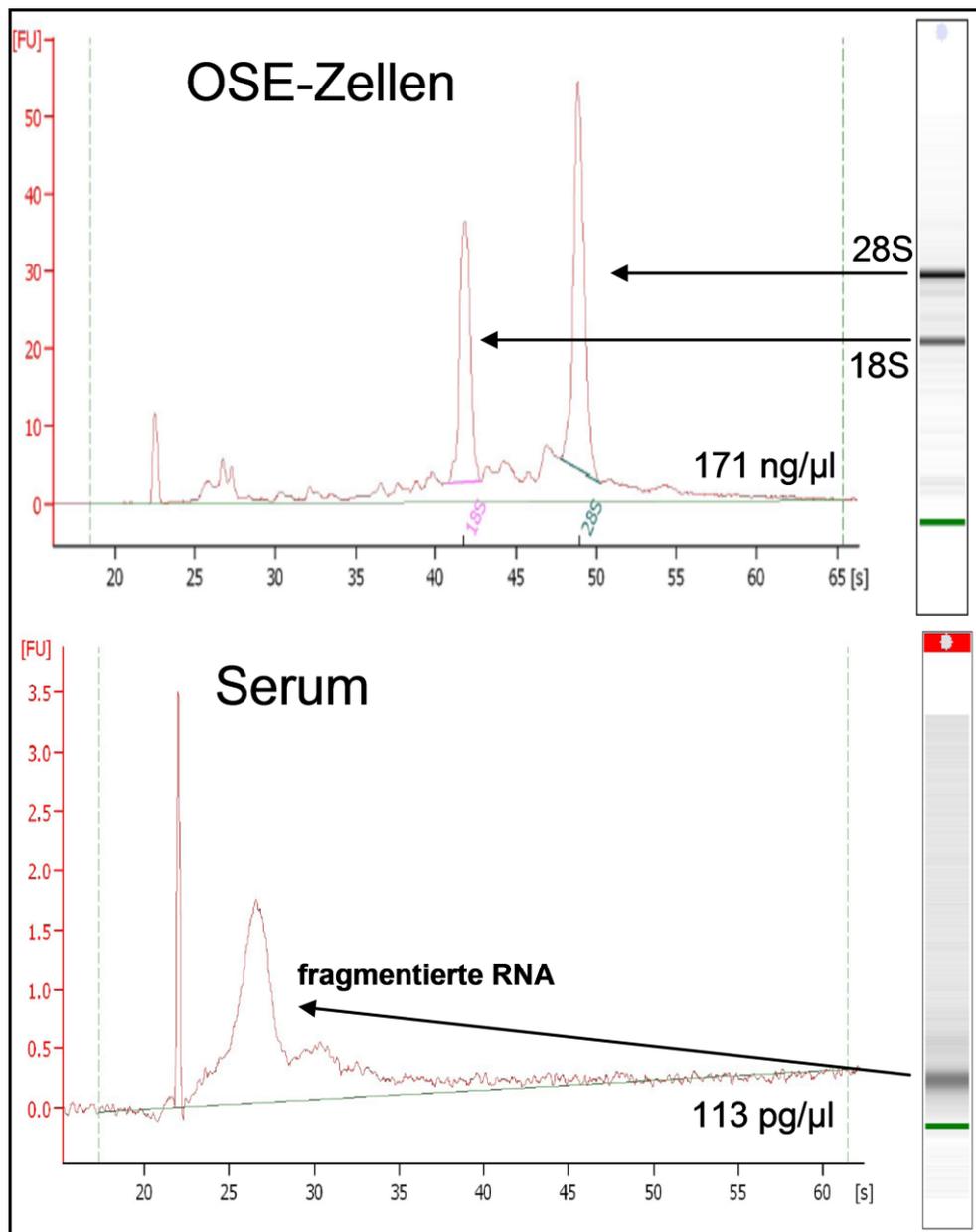


Abbildung 3-7: Elektropherogramm zirkulierender RNA

### 3.3.1.2 RNA-Einkonzentrierung und Inhibition enzymatischer Prozesse

Eine Microarrayanalyse benötigt den Einsatz konzentrierter RNA in einem sehr geringen Volumen (ca. 2  $\mu\text{l}$ ). Da Serum jedoch als zellfreies System nur eine sehr geringe Konzentration an zirkulierender RNA beinhaltet, war die Etablierung eines RNA-Einkonzentrierungsverfahrens erforderlich. Hier gilt es zu beachten, dass humanes Serum eine komplexe makromolekulare Komposition besitzt und Proteine, Elektrolyte oder Metabolite enzymatische Prozesse, wie z.B. das Labeling der Microarray-Analyse oder die reverse Transkription im Rahmen der qRT-PCR inhibie-

ren können. Besonders im Rahmen der RNA-Einkonzentrierung besteht somit die Gefahr, dass inhibitorisch wirkende Komponenten angereichert werden und Messverfahren stören. Da das Anfertigen von „Test-Microarrays“ für diese Untersuchung finanziell nicht zu realisieren war, wurde die qRT-PCR repräsentativ für ein sensitives enzymatisches Verfahren ausgewählt.

Es wurde Gesamt-RNA (inkl. miRNA-Fraktion) aus einem Ausgangsvolumen von 400 µl bzw. 600 µl Humanserum isoliert. Das RNA-Eluat (Ausbeute 62 µl für Ansatz 1 bzw. 72 µl für Ansatz 2, Tabelle 3-5) wurde anschließend mit Hilfe eines Speed Vac Systems vollständig lyophilisiert und anschließend in einem Volumen von 2 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Daraus ergab sich für Ansatz 1 ein Einkonzentrierungsfaktor von 31 und für Ansatz 2 ein Faktor von 36 (Abbildung 3-8). Das Eluatvolumen unterschied sich hier leicht, da die RNA in beiden Ansätzen separat isoliert wurde und die Eluatausbeute auf Grund des Totvolumens der Filtersäulen einer gewissen Schwankungsbreite unterliegt. Vor und nach dem Einkonzentrierungsverfahren wurde miR-16 als Repräsentant endogener miRNA mittels qRT-PCR gemessen, um auf eine mögliche Inhibition des PCR-Systems hin zu untersuchen. Die Abbildung zeigt das ermittelte miR-16 Signal vor und nach Einkonzentrierung der gesamten RNA aus 400 µl (Ansatz 1) bzw. 600 µl (Ansatz 2) Serum-Ausgangsvolumen. In Ansatz 1 zeigte sich eine Signalverstärkung um den Faktor 5,41, wohingegen in Ansatz 2, in dem eine höhere Ausgangsmenge an Serum verarbeitet wurde, eine Signalverstärkung um den Faktor 1,79 verzeichnet wurde. Zusammenfassend konnte in diesem Zusammenhang keine direkte Proportionalität zwischen Einkonzentrierung bzw. Serum-Ausgangsvolumen und Signalverstärkung endogener miR-16 Expression gezeigt werden.

Tabelle 3-5: Schema zur Einkonzentrierung von RNA aus Serum

	<b>Serum Volumen</b>	<b>Eluat</b>	<b>Aufkonzentrierung</b>
<b>Ansatz 1</b>	400 µl	62 µl	Faktor 31
<b>Ansatz 2</b>	600 µl	72 µl	Faktor 36

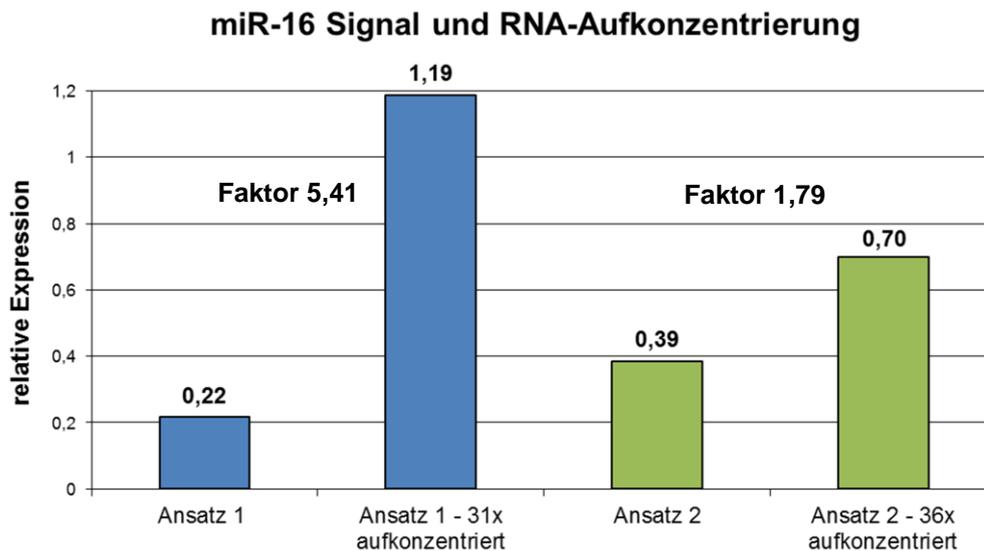


Abbildung 3-8: miR-16 Signal in Abhängigkeit zur RNA-Aufkonzentrierung

### 3.3.2 Microarrayanalyse zirkulierender microRNA

Die bisherigen Untersuchungen konnten zeigen, dass zirkulierende RNA aus Humanserum verhältnismäßig gering konzentriert ist und einen fragmentierten kurzsträngigen Charakter aufweist. Gemäß den Daten der Voruntersuchungen wurde die Microarrayanalyse zirkulierender miRNA gemäß der folgenden experimentellen Parameter vorbereitet:

1. Ausgangsmenge Serum: 600 µl
2. Aufreinigung der Gesamt-RNA (inkl. miRNA-Fraktion)
3. vollständige Lyophilisierung des Eluates
4. Resuspension in 2 µl RNase freiem Wasser
5. Microarrayanalyse

Das Verfahren wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. S. A. Hahn am Zentrum für klinische Forschung der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt und erfolgte in 5 Seren von Ovarialkarzinompatientinnen und 5 Normalspenderseren postmenopausaler Frauen. Nach dem Filtern, der Normalisierung und einem paarweisen Vergleich der Daten (Fold Change  $\geq 2$ ) konnten insgesamt 23 miRNA identifiziert werden, die im Serum der Ovarialkarzinompatientinnen im Vergleich zu Normal-

spenderseren eine differentielle Expression aufwiesen (7 hochreguliert, 16 herunterreguliert, Tabelle 3-6). Aus dieser Kandidatengruppe wurden potentielle Biomarkerkandidaten gemäß der folgenden Kriterien selektiert:

**1. Hochregulation in der malignen Situation**  
**2. ausreichend starke Expression im Blut**  
(mittleres normalisiertes gTotalProbeSignal >7)

Tabelle 3-6: Differentiell exprimierte miRNA-Kandidaten im Serum

	Name	Fold Change	Regulation	gTotalProbeSignal (Patientinnen)	gTotalProbeSignal (Normalspender)
1	hsa-miR-595	3,46	↑	1,81	0,02
2	hsa-miR-18b*	3,53	↑	2,44	0,63
3	hsa-miR-625*	4,47	↑	2,53	0,37
4	hsa-miR-1183	2,37	↑	6,03	4,79
5	hsa-miR-1290	2,29	↑	8,40	7,20
6	hsa-miR-320c	2,06	↑	9,72	8,68
7	hsa-miR-1246	2,00	↑	10,69	9,69
8	hsa-miR-10b*	8,33	↓	0,01	3,07
9	hsa-miR-194	3,53	↓	0,01	1,83
10	hsa-miR-1469	3,89	↓	0,01	1,97
11	hsa-miR-193a-5p	4,84	↓	1,21	3,48
12	hsa-miR-1979_v15.0	3,19	↓	1,41	3,09
13	hsa-miR-497	5,23	↓	1,48	3,87
14	hsa-miR-18b	2,76	↓	1,97	3,44
15	hsa-miR-513b	4,17	↓	2,30	4,36
16	hsa-miR-193b*	2,32	↓	2,69	3,91
17	hsa-miR-30a	2,33	↓	4,25	5,47
18	hsa-miR-150	2,36	↓	4,31	5,55
19	hsa-miR-663	2,28	↓	4,37	5,56
20	hsa-miR-513a-5p	2,58	↓	6,22	7,59
21	hsa-miR-940	2,41	↓	6,46	7,73
22	hsa-miR-106b	2,40	↓	7,38	8,64
23	hsa-miR-144	3,91	↓	9,11	11,08

Gemäß dieser Kriterien wurden **miR-1290**, **miR-320c** und **miR-1246** für eine weiterführende Analyse ausgewählt (Tabelle 3-6, grüne Markierung).

### 3.3.3 Überprüfung der Assay-Validität der Biomarkerkandidaten

Im Folgenden sollte überprüft werden, inwieweit die im Rahmen der Microarray-Analyse ermittelten miRNA-Kandidaten auf der Ebene eines qRT-PCR Assays quantifizierbar sind. Die Amplifikation von miRNA ist auf Grund der Kürze einer murenen Sequenz technisch komplex und wird in dieser Arbeit durch ein kommerzielles Primersystem realisiert (miScript-System, Qiagen). Kommerzielle Primerassays sind ab Werk ausschließlich informatisch getestet und die experimentelle Validität eines jeden Assays sollte somit im Vorfeld überprüft werden.

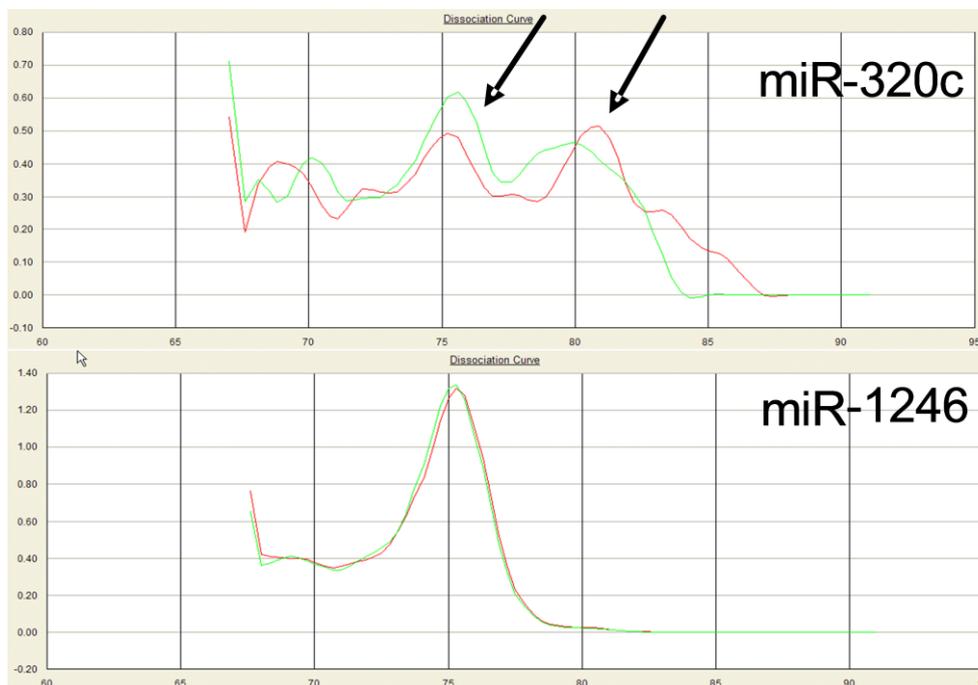


Abbildung 3-9: Repräsentative Dissoziationskurven der miRNA-Kandidaten

Als Grundlage für die Bestätigung einer experimentellen Primervalidität sollten alle folgenden Parameter zutreffen: 1.) Das qRT-PCR Signal sollte ausreichend stark sein, d.h. einen Ct Wert  $\leq 30$  aufweisen. 2.) Die Dissoziationskurve sollte nur einen „spezifischen“ Peak zeigen. 3.) In der Agarosegelelektrophorese sollte nur ein Amplikon mit einer Größe von etwa 89 bp erkennbar sein (Werksinformation der Firma Qiagen für den miScript-Assay). Daher wurden, im Rahmen eines Testversuches, miR-1290, miR-320c und miR-1246 im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen mittels qRT-PCR Assay amplifiziert. MiR-1290 und miR-320c zeigten ein Ct-Signal  $> 35$  und die miR-320c Amplifikation wies zusätzlich eine abnormale Dissoziationskurve mit zahlreichen „unspezifischen“ Peaks sowie Mehrfachbanden in der Gelelektrophorese

auf (Abbildung 3-9, 3-10). Daher konnten diese miRNA-Kandidaten nicht weiterführend charakterisiert werden. MiR-1246 jedoch war in einem Bereich von Ct < 25 detektierbar und die Dissoziationskurve zeigte sich regelgerecht mit nur einem deutlich ausgeprägten Peak. Analog wie die Gelelektrophorese, korrespondierend zu den Kontrollamplikons von miR-16 und cel-miR-54, eine Bande im erwarteten Größenbereich von 89 bp auf.

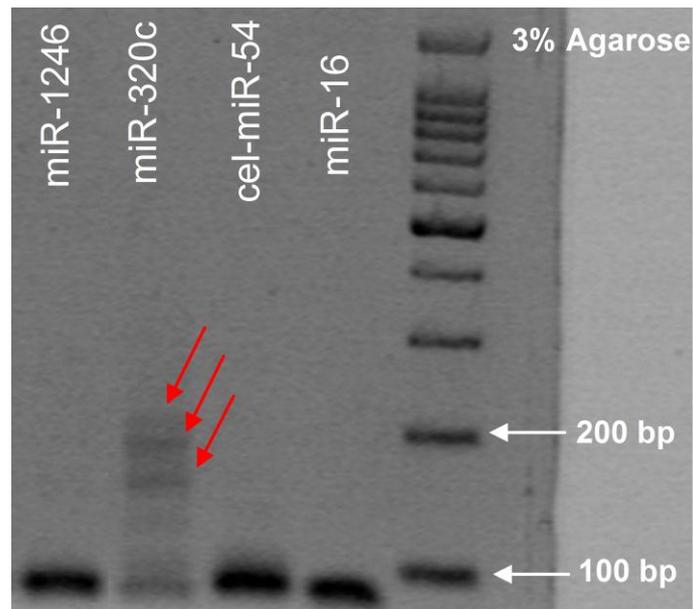


Abbildung 3-10: Fragmentanalyse nach Amplifikation von Biomarkerkandidaten

Folglich wurde miR-1246 als Biomarkerkandidat für weiterführende Untersuchung ausgewählt.

### 3.3.4 Etablierung einer Spike-In Normalisierung

Weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die differentielle Regulation der miR-1246 in einem klinisch dokumentierten Kollektiv von Ovarialkarzinompatientinnen mittels qRT-PCR zu validieren und ihre Eignung, im Hinblick auf einen blutbasierten Biomarker zu evaluieren. Die Aufreinigung zirkulierender miRNA sowie eine qRT-PCR basierte Quantifizierung sind komplexe Prozesse, die auch bei Verarbeitung exakt gleicher Serumvolumina unterschiedliche Störvariablen, wie etwa Schwankung im Rahmen der Aufreinigungseffizienz oder der cDNA-Synthese, beinhalten. In diesem Zusammenhang sollte zunächst ein Spike-In basiertes Normalisierungsverfahren etabliert werden, welches durch Applikation einer exogenen Spike-In Sequenz die genannten Störvariablen kontrolliert und somit eine relative Quantifizierung der zu untersuchen-

den Proben ermöglicht. Die Etablierung dieses Verfahrens wurde in Anlehnung an die Publikation von Mitchell et al., 2008 durchgeführt.

#### **3.3.4.1 Selektion einer Spike-In Oligonukleotidsequenz**

Für die Etablierung einer Spike-In Normalisierung wurde zunächst cel-miR-54 ausgewählt. Diese miRNA-Sequenz ist hoch spezifisch für den Nematoden *C. elegans* und im humanen Genom nicht vertreten. Des Weiteren konnte durch LNA-basierte Microarrayanalyse im Vorfeld gezeigt werden, dass die cel-miR-54 Sequenz keine Kreuzhybridisierung mit humanen miRNA-Sequenzen aufweist (Mitchell et al., 2008) und somit optimale Voraussetzungen für eine Spike-In Normalisierung liefert. Im Folgenden sollte die Eignung von cel-miR-54 für das geplante Spike-In Verfahren weiter überprüft werden. Gemäß der miRNA-Datenbank ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) ist die mature Sequenz der cel-miR-54 im Folgenden dargestellt:

<p>cel-miR-54-3p (MIMAT0000025) Sequenz: 5'-UACCCGUAUUCUUCAUAAUCCGAG-3'</p>
---

Für das Spike-In Verfahren wurde die cel-miR-54 in Form eines synthetischen RNA-Oligonukleotids (syn-cel-miR-54) verwendet (Qiagen, MSY0000025).

#### **3.3.4.2 Bestimmung des Hintergrundsignals der syn-cel-miR-54**

Zur experimentellen Überprüfung einer möglichen Hintergrundexpression bzw. einer Kreuzreaktivität zwischen dem syn-cel-miR-54-Assay und humanen miRNA-Sequenzen im Serum wurde in nativen (nicht gespikten) Humanseren auf syn-cel-miR-54 Signal hin überprüft. Dazu wurde Gesamt-RNA (inkl. miRNA-Fraktion) aus 400 µl Serum einer Ovarialkarzinompatientin sowie einer postmenopausalen Normalspenderin aufgereinigt und anschließend das cel-miR-54 Signal quantifiziert. Als endogene Positivkontrolle wurde die miR-16 Expression ermittelt. Beide Serumproben erwiesen sich positiv in Bezug auf endogene miR-16 Expression. In dem Serum der Ovarialkarzinompatientin befand sich die cel-miR-54 Expression jedoch unterhalb der Nachweisgrenze und es konnte kein Ct-Wert ermittelt werden. Ferner wurde im Normalspenderserum ein Ct-Wert von > 38 gemessen, was dem Rauschbereich des

Systems entspricht (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend wurde gezeigt, dass cel-miR-54 in den untersuchten Humanseren keine nennenswerte basale Expression aufwies.

### 3.3.4.3 Thermostabilität des Spike-In Oligonukleotides

Eine Reproduzierbarkeit des Spike-In Signals im Rahmen der Normalisierung ist nur dann gegeben, wenn das synthetische RNA-Oligonukleotid unter gegebenen Assay-

Tabelle 3-7: Ansatz zur Überprüfung der Thermostabilität

<b>syn-cel-miR-54 Spike-In Verdünnung (5 fmol / <math>\mu</math>l)</b>	
<b>Inkubationsvolumen: 1000 <math>\mu</math>l</b>	
<b>Ansatz 1</b>	15h -80°C (1 x freeze-thaw)
<b>Ansatz 2</b>	15h +4°C
<b>Ansatz 3</b>	15h RT
<b>Ansatz 4</b>	15h +80°C (Kontrolle für RNA Degradation)

bedingungen eine ausreichende Thermostabilität aufweist. In diesem Zusammenhang wurde das syn-cel-miR-54 Signal im Rahmen fünf verschiedener Inkubationsbedingungen getestet (Tabelle 3-7). Hierzu wurde eine Spike-In Arbeitsverdünnung von 5 fmol/ $\mu$ l angesetzt und mit einem Volumen von je 1000  $\mu$ l in Duplikaten unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert. In Abbildung 3-11 ist das gemessene syn-cel-miR-54 Signalniveau nach Inkubation unter verschiedenen Versuchsbedingungen dargestellt. Die y-Achse zeigt den jeweils ermittelten Ct-Rohwert. Nach Inkubation von syn-cel-miR-54 bei -80°C, +4°C und RT konnte ein stabiler Ct-Wert von ca. 15,5 ermittelt werden, wohingegen nach 15 h Inkubation bei +80°C (Kontrolle für RNA-Degradation) ein Anstieg des Ct-Wertes auf 28,35, d.h. ein rapider syncel-miR-54 Signalverlust, beobachtet wurde.

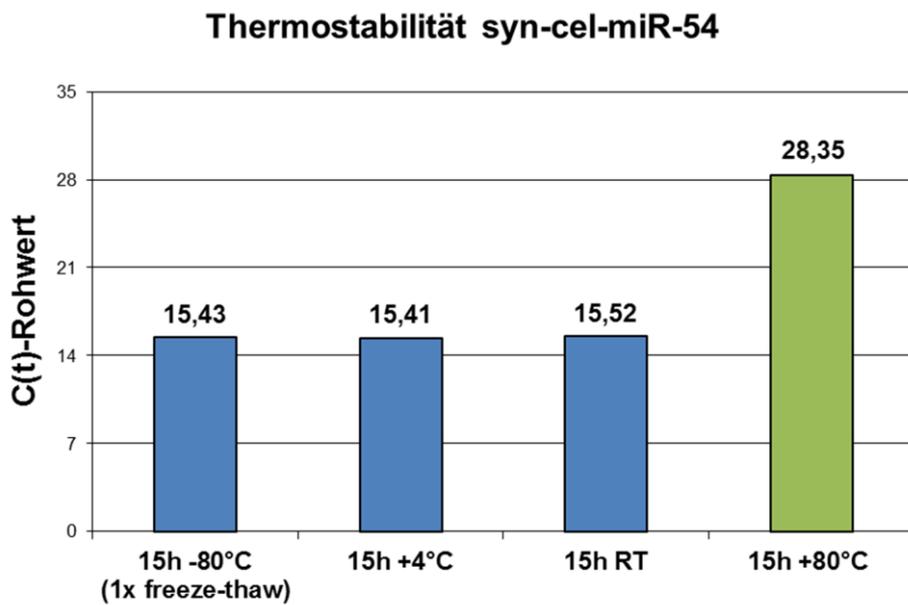


Abbildung 3-11: Thermostabilität syn-cel-miR-54

#### 3.3.4.4 „Proof-of-Principle“ für das Spike-In Konzept

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob das Spike-In Signal auf technisch bedingte Schwankungen im Versuchsablauf reagierte und diese dem Experimentator anzeigt. Wie bereits erwähnt, ist die miRNA Aufreinigungseffizienz aus Patientinnenserum eine maßgebliche Störvariable, auch wenn exakt gleiche Serum-Ausgangsvolumina verwendet werden. Im Folgenden sollte die Modulation des Spike-In Signals im Hinblick auf den Störparameter Aufreinigungseffizienz evaluiert werden. Dazu wurden vier Serumaliquots einer Ovarialkarzinompatientin (je 400 µl) jeweils mit 5 µl einer 5 fmol/ml syn-cel-miR-54 Lösung gespikt. Des Weiteren wurden bei diesen vier Serumproben jeweils eine unterschiedliche Aufreinigungseffizienz durch kontrollierte Veränderung des „Recovery-Volumen“ der aquatischen Phase im Kontext der organischen Extraktion simuliert (vgl. 2.3.5.1). Ausgehend von einer Verarbeitung von 500 µl aquatischer Phase in Ansatz 1 (100%), wurde die Abnahme der aquatischen Phase in den Folgeansätzen kontrolliert verringert (90%, 50%, 25%, siehe Tabelle 3-8) und anschließend in allen Proben das relative cel-miR-54 Signal verglichen (Abbildung 3-12).

Tabelle 3-8: Simulation unterschiedlicher RNA-Aufreinigungseffizienz

	Aufreinigungseffizienz	„Recovery“ der aquatischen Phase
<b>Ansatz 1</b>	100%	500 µl
<b>Ansatz 2</b>	90%	450 µl
<b>Ansatz 3</b>	50%	250 µl
<b>Ansatz 4</b>	25%	125 µl

Parallel zu syn-cel-miR-54 wurde miR-16 repräsentativ für ein endogenes miRNA-Signal gemessen. Die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Stufen der modulierten Aufreinigungseffizienz, die Y-Achse stellt die relative Expression der jeweiligen miRNA dar. Eine 100%ige relative Expression entsprach jeweils dem gemessenen Signalniveau für miR-16 bzw. syn-cel-miR-54 bei 100% Recovery der aquatischen Phase (Ansatz 1, 500 µl). Die Daten zeigten, dass das syn-cel-miR-54 Signal nahezu linear auf eine verminderte Aufreinigungseffizienz reagierte. Lediglich bei 50% Aufreinigungseffizienz zeigte sich nur etwa 36% des Spike-In Ausgangssignals. Das gemessene Expressionsniveau für miR-16 als endogene Kontrolle stand in guter Übereinstimmung mit dem syn-cel-mir-54 Signal, auch wenn sich bei 90% Aufreinigungseffizienz eine leichte Abweichung ergab.

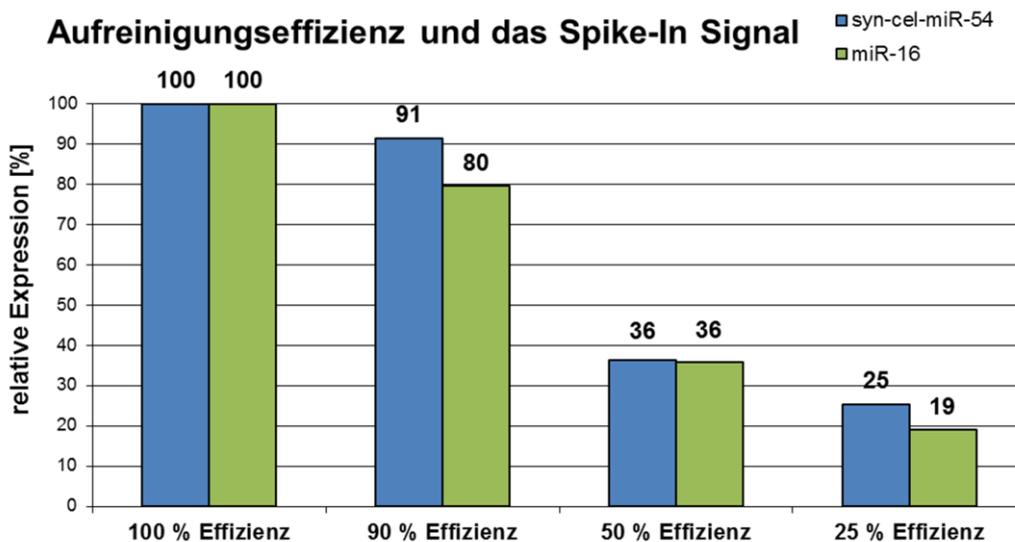


Abbildung 3-12: „Proof-of-Principle“ für das Spike-In Konzept

### 3.3.5 Nomenklatur und Assay-Kreuzreaktivität der microRNA-1246

Während der experimentellen Phase dieser Arbeit konnte durch die Kooperationsgruppe in Bochum ein relevanter „post-hoc“ Befund beschrieben werden. Die folgenden Daten sind extern, d.h. zum größten Teil nicht im Rahmen dieser Dissertation erhoben worden, sollten aber trotzdem an dieser Stelle erwähnt werden, da sie zentrale Bedeutung für Interpretation und Verständnis dieser Arbeit aufweisen. Die Amplifikation der miR-1246 Sequenz aus Serum von Kolon- bzw. Pankreaskarzinompatienten durch das miScript System (Qiagen) erzeugte PCR-Fragmente, welche in ihrer Länge die erwartete Fragmentgröße von ca. 89 Basenpaaren aufwiesen. Bei der Amplifikation der miR-1246 Sequenz im zellulären Kontext (RNA aus Lysaten von Pankreaskarzinom-, bzw. Kolonkarzinomzelllinien) hingegen, wurde in Untersuchungen der AG Prof. Dr. Hahn ein viel größeres PCR-Produkt mit einer Größe von etwa

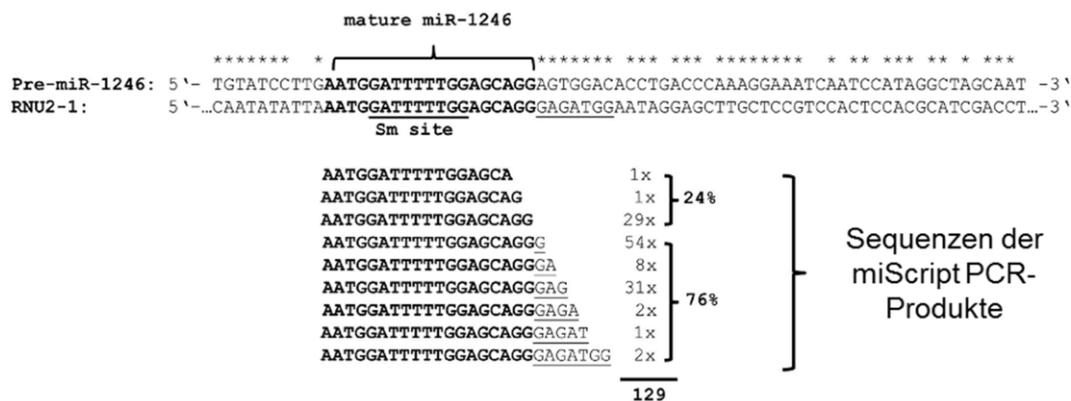


Abbildung 3-13: Sequenzanalyse des miR-1246 Amplikons nach Baraniskin et al., 2012 (Int. J. Cancer, *Epub ahead of Print*)

180 bp beobachtet. Klonierung und Sequenzanalyse dieses PCR-Fragments durch die Kooperationspartner ergab eine 100% Sequenzübereinstimmung mit der *U2 small nuclear RNA* (snRNA, RNU2-1, NCBI Datenbank Reference Sequenz: NR\_002716.3). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die gesamte mature Sequenz der miR-1246 in der humanen RNU2-1 Sequenz enthalten ist (Abbildung 3-13). Im Weiteren wurden PCR-Fragmente, die aus der miR-1246 Amplifikation im Humaneserum generiert wurden, kloniert und ebenfalls einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Mehrzahl der klonierten PCR Fragmente (98/129 Fragmente, 76%) wiesen am 3' Ende eine Verlängerung von 1 –7 Basenpaaren auf, welche sich in allen Fällen als übereinstimmend zur RNU2-1 Sequenz, jedoch nicht zur pre-miR-1246-Sequenz erwiesen. In einem Folgeversuch wurde ein relevanter Bereiche der Sequenz des pri-

miR-1246 Vorläufermoleküls in einen lentiviralen Expressionsvektor kloniert und stabil in eine pankreatische Tumorzelllinie transduziert. Obwohl hier ein primäres Transkript detektiert wurde, konnte auf funktioneller Ebene keine mature miR-1246 nachgewiesen werden. Ferner wurden in Zelllinien keine pre-miR-1246 Vorläufermoleküle nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass in humanen Zellen keine Prozessierung der pri-miR-1246 zur maturen miR-1246 initiiert wird (Baraniskin et al., 2012).

Untersuchungen zum primären Ovarialkarzinom im Rahmen dieser Dissertation ergaben analoge Befunde im Hinblick auf die Daten der Kooperationsgruppe. Die miR-1246 Amplifikation im Serum zeigte ein PCR-Produkt mit einer erwarteten Größe von etwa 89 bp, wohingegen die miR-1246 Amplifikation im primären Ovarialkarzinomgewebe, d.h. im zellulären Kontext, analog ein ca. 180 bp großes Amplikon ergab (Abbildung 3-14). Des Weiteren konnten weder im primären Ovarialkarzinomgewebe, noch im Serum der Tumorpatientinnen pre-miR-1246 Vorläufermoleküle,

durch den miScript-Assay, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen, gestützt durch die Erkenntnisse der Kooperationsgruppe, hatten entscheidenden Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse dieser Dissertation. Es wurde zusammenfassend davon

ausgegangen, dass es sich bei miR-1246 mit großer Wahrscheinlichkeit um eine „Pseudo-miRNA“ handelt, die weder im Gewebe, noch im Serum exprimiert ist. Folglich ist das in dieser Arbeit detektierte „miR-1246“ Signal im Serum der Ovarialkarzinompatientinnen sowohl im Rahmen der Microarrayanalyse, als auch im Rahmen der miScript-Assay Detektion mit großer Wahrscheinlichkeit und möglicherweise ausschließlich auf RNU2-1 Fragmente (RNU2-1-f) und nicht auf zirkulierende mature miR-1246 zurückzuführen. Folglich wurde ab diesem Zeitpunkt die Nomenklatur ent-

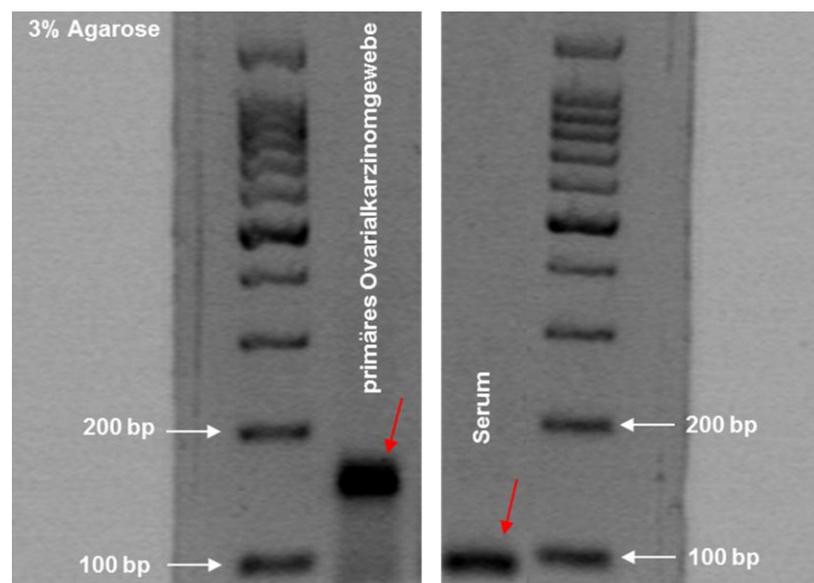


Abbildung 3-14: Fragmentanalyse nach miR-1246 Amplifikation

sprechend angepasst und die Bezeichnung „miR-1246“ durch die Bezeichnung „RNU2-1f“ fortgeführt.

### 3.3.6 Validierung differentieller RNU2-1f Expression im Serum

Im Weiteren sollte die differentielle Expression von RNU2-1f im Serum validiert werden. Aus dem Gesamtkollektiv der vorliegenden Dissertation (Tabelle 2-1) war die blutbasierte RNU2-1f Analyse für 70 Patientinnen möglich. Das Profil klinischer Parameter dieser Patientinnengruppe war vergleichbar mit dem des Gesamtkollektivs

Tabelle 3-9: Patientinnenkollektiv für die RNU2-1f Analyse

Anzahl Patientinnen: <b>70</b>	
mittleres Alter: <b>56</b> Jahre (Range: <b>18 – 81</b> Jahre)	
<b>FIGO-Stadium</b>	
FIGO I-II	20 (29%)
FIGO III	38 (54%)
FIGO VI	12 (17%)
<b>Lymphknotenstatus</b>	
N <sub>0</sub>	14 (20%)
N <sub>1</sub>	24 (34%)
N <sub>x</sub>	20 (29%)
<b>Grading</b>	
1-2	35 (50%)
3-4	33 (47%)
<b>Histologie</b>	
serös-papillär	47 (67%)
müzinös	5 (7%)
andere	18 (26%)
<b>Tumorrest</b>	
positiv	32 (46%)
negativ	38 (54%)
<b>DTZ vor Operation</b>	
positiv	31 (44%)
negativ	39 (56%)
<b>DTZ nach Chemotherapie</b>	
positiv	23 (40%)
negativ	35 (60%)

(Tabelle 3-9). Von diesen 70 Ovarialkarzinompatientinnen stand Serum von 64 Patientinnen vor Operation sowie zusätzlich von 58 Patientinnen nach Chemotherapie zur Verfügung. Als Kontrollgruppe wurden Seren von 35 Normalspendern (postmenopausal, anonymisiert) verwendet. Aus je 400 µl Serum wurde Gesamt-RNA (inkl. miRNA-Fraktion) isoliert und anschließend mittels qRT-PCR (miScript-System, Qiagen) auf RNU2-1f Expression hin untersucht. Die zuvor etablierte Spike-In Me-

thodik (vgl. 3.3.4) wurde zur Normalisierung der Daten genutzt. Abbildung 3-15 zeigt die normalisierte RNU2-1f Expression. Die Kontrollseren der Normalspender wiesen einen mittleren normalisierten Ct Wert von -2,46 auf (Range -3,57 bis -1,32). Vor Operation wurde im Serum der Patientinnen mit einem Ct von -1,32 (Range -4,21 bis +2,67) eine signifikant höhere RNU2-1f Expression ermittelt als in den Kontrollseren ( $p < 0,0001$ ). Auch nach Chemotherapie zeigte sich im Serum der Patientinnen noch eine signifikant höhere RNU2-1f Expression (Ct -1,70 (Range -3,42 bis +2,23)) als bei den gesunden Probandinnen ( $p = 0,0003$ ).

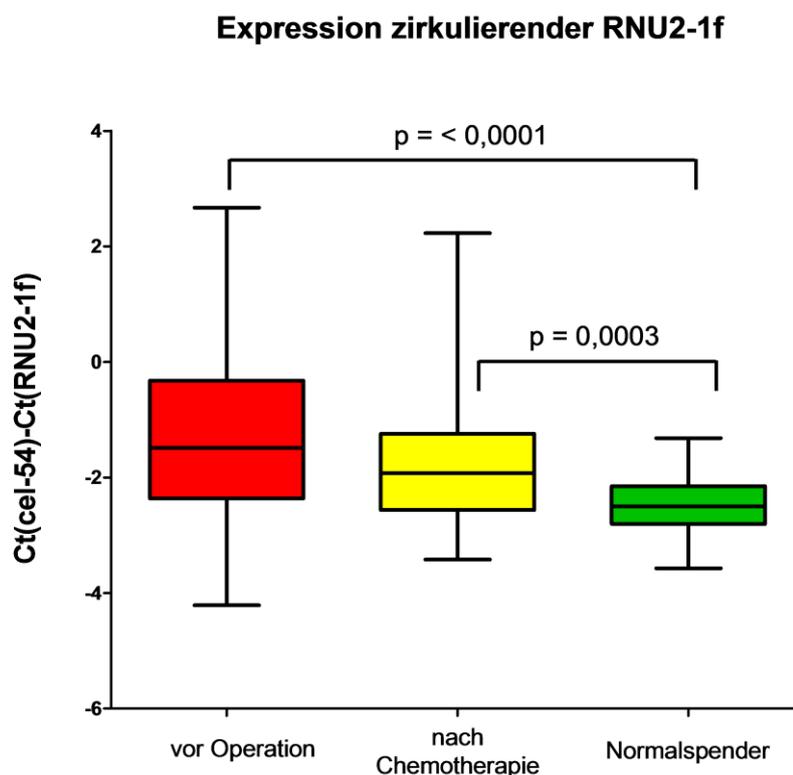


Abbildung 3-15: Expression zirkulierender RNU2-1f im Serum

### 3.3.7 Klinische Relevanz zirkulierender RNU2-1f

Basierend auf einer *Receiver Operating Characteristic Analyse* (ROC-Analyse) wurde ein diagnostischer Schwellenwert zur Diskriminierung zwischen „erkrankt“ und „gesund“ festgelegt. Demnach wurde ein normalisierter Ct Wert  $> -1,55$  als „diagnostisch-positiv“ und ein Ct Wert  $\leq -1,55$  als „diagnostisch-negativ“ definiert. Dieser Schwellenwert ermöglichte gemäß ROC-Analyse eine Diskriminierung von Ovarialkarzinompatientinnen und Normalspendern mit einer Sensitivität von 91,43% (CI = 76,94% bis 98,20%) und einer Spezifität von 51,56% (CI = 38,73% bis 64,25%). Der

area under the curve-Wert (AUC-Wert) betrug 0,74 (Abbildung 3-16). Im Folgenden wurden die RNU2-1f Expressionsdaten mit den klinischen Parametern der Patientinnen korreliert. Vor Operation zeigten Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO III oder IV) mit einem mittleren Ct Wert von -0,94 eine signifikant höhere RNU2-1f Expression als Patientinnen mit dem Tumorstadium FIGO I oder II (mittlerer Ct Wert -2,22,  $p = 0,015$ ). Ferner korrelierte die Expression zirkulierender

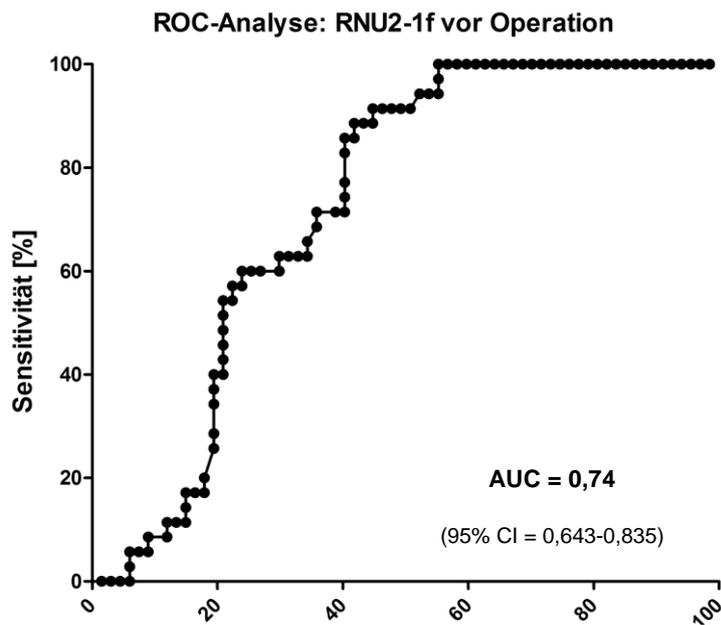


Abbildung 3-16: ROC-Analyse (RNU2-1f) zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

RNU2-1f nach Chemotherapie signifikant mit der residuellen Tumorlast nach Operation ( $p = 0,010$ ). Es konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen der RNU2-1f Expression und der Platinresistenz beobachtet werden. Ferner wurde die Veränderung der RNU2-1f Expression im Zuge der Chemotherapie untersucht. Von insgesamt 52 Patientinnen war Serum jeweils vor Operation und nach Chemotherapie verfügbar. Bei 8/52 Patientinnen (15%) wurde durchweg eine RNU2-1f-Positivität beobachtet (pos-pos), wohingegen 12/52 Patientinnen (23%) zum Zeitpunkt der Primärdiagnose negativ waren und nach Therapie neuerlich positiv wurden (neg-pos). Bei 18/52 (35%) Patientinnen wurde RNU2-1f-Positivität vor Operation festgestellt, jedoch nicht mehr nach Chemotherapie (pos-neg), wohingegen sich 14/52 Patientinnen (27%) als durchweg diagnostisch-negativ erwiesen (neg-neg) (Abbildung 3-17).

### RNU2-1f Expressionsdynamik

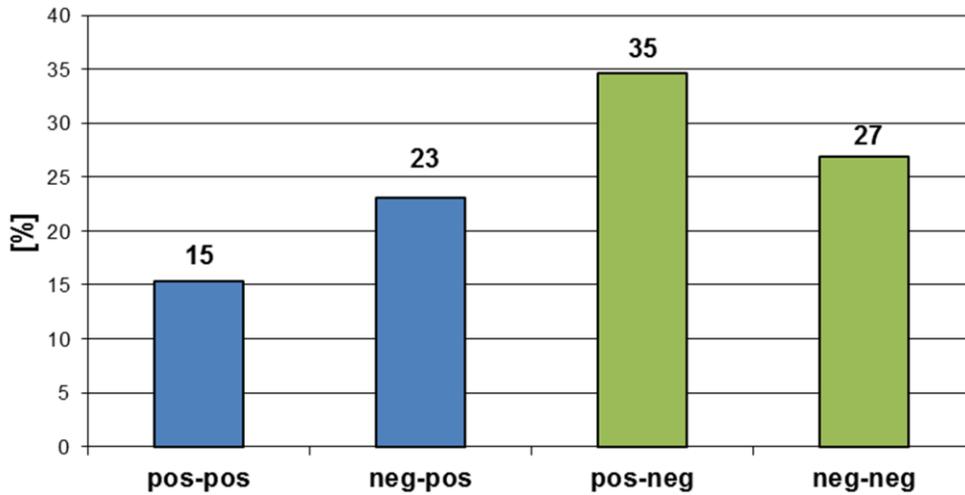


Abbildung 3-17: Subgruppenanalyse zur RNU2-1f-Expressionsdynamik

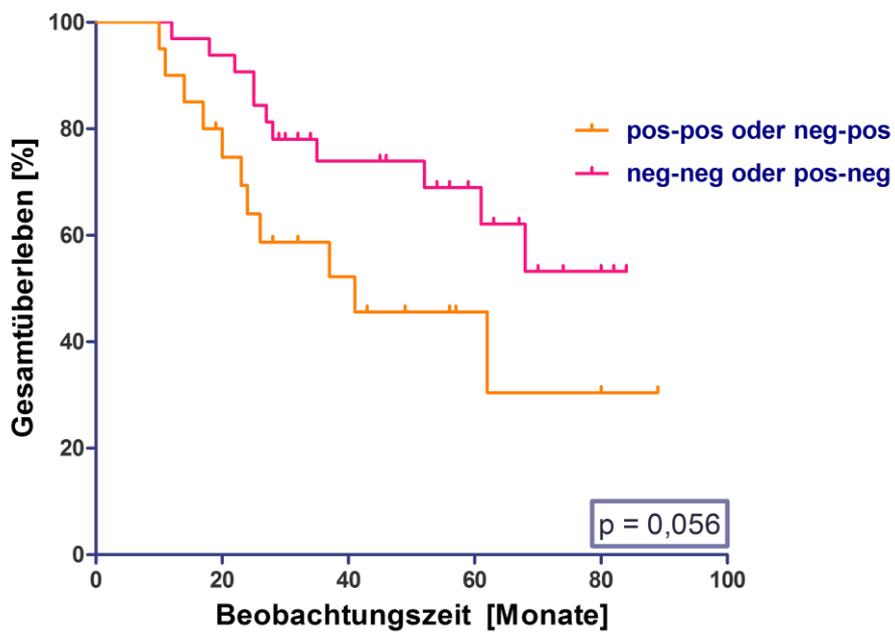


Abbildung 3-18: RNU2-1f Expressionsdynamik und das OS

Eine Kaplan-Meier Analyse ergab, dass Patientinnen mit persistierender bzw. nach Therapie neuerlich erworbener RNU2-1f-Positivität, tendenziell ein kürzeres OS aufwiesen, als Patientinnen, die sich als durchweg negativ erwiesen oder im Zuge der Therapie negativ wurden (Abbildung 3-18). Dieser Unterschied befand sich jedoch an der Grenze zur statistischen Signifikanz (*Log-rank (Mantel-Cox) Test*:  $p = 0,056$ ; Ge-

han-Breslow-Wilcoxon Test:  $p = 0,042$ ). Ferner zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der RNU2-1f Expressionsveränderung und dem DFS ( $p = 0,56$ , Abbildung 3-19).

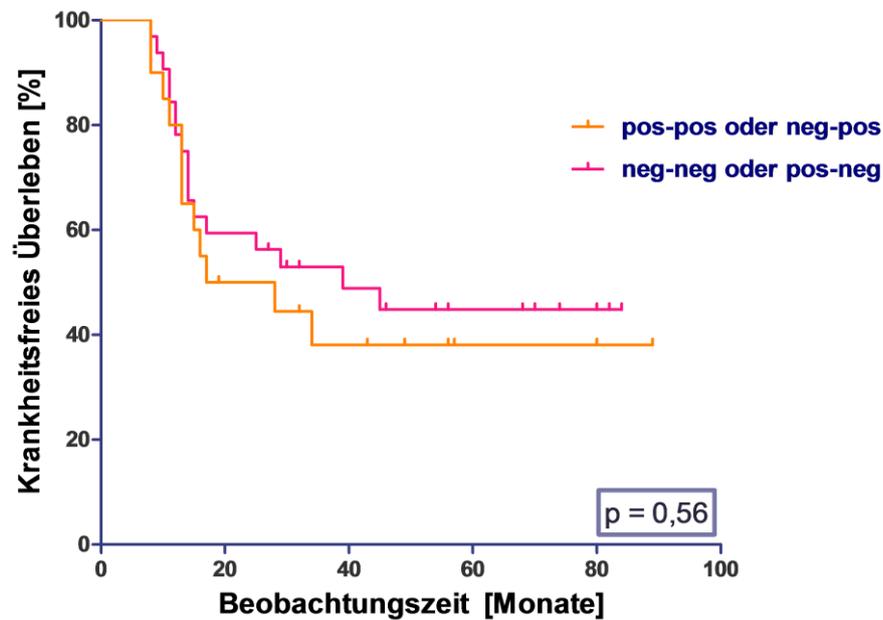


Abbildung 3-19: RNU2-1f Expressionsdynamik und das DFS

### 3.3.8 Weiterführende Charakterisierung von RNU2-1f

#### 3.3.8.1 Proteasesensitivität zirkulierender RNU2-1f im Serum

Erster Ansatz für eine weiterführende Analyse der RNU2-1f Stabilität in der Zirkulation sollte durch Untersuchung auf Proteasesensitivität realisiert werden. In diesem Zusammenhang wurde Serum einer Normalspenderin einem Proteinase K Verdau nach Arroyo unterzogen (vgl. 2.3.5.7) (Arroyo et al., 2011). Das Serum wurde mit 50  $\mu$ l Proteinase K (5 mg Proteinase K / ml Serum) bzw. 50  $\mu$ l PBS (Kontrolle) versetzt und bei 55  $^{\circ}$ C inkubiert. Die Stabilität des RNU2f Signals wurde über einen Zeitraum von insgesamt 50 min durch qRT-PCR verfolgt. Die Messdaten wurden durch das zuvor etablierte Spike-In Verfahren (vgl. 3.3.4) normalisiert. MiR-16 wurde zusätzlich als Sensitivitätskontrolle gemessen. Diese miRNA, so konnte es kürzlich gezeigt werden, ist im Humanserum überwiegend an Proteinkomplexe gebunden und gilt somit als proteasesensitiv (Arroyo et al., 2011). Die miRNA let-7a wurde als Resistenzkontrolle verwendet, da diese im Sinne einer „vesicle-type-RNA“ überwiegend

mit zirkulierenden Vesikeln bzw. Exosomen assoziiert ist (Arroyo et al., 2011). Abbildung 3-20 zeigt das Signal der untersuchten miRNA-Kandidaten unter Proteinase K Einwirkung. MiR-16 erwies sich auch in diesem Versuch als äußerst Protease-sensitiv. Das ermittelte Signal im Proteinase K verdauten Ansatz betrug nach 10 min nur noch 14% des Ausgangssignals, wohingegen der korrespondierende Wert in der PBS-Kontrolle bei etwa 79% lag. Ab einer Inkubationszeit von 20 min betrug das miR-16 Signal weniger als 10% des Ausgangslevels. Für let-7a zeigte sich im Vergleich zur PBS-Kontrolle keine Resistenz, sondern ebenfalls ein rapider Signalverlust, der sich in seiner Dynamik nur marginal von den Beobachtungen zur miR-16 unterschied. Zuletzt ist das RNU2-1f Signal graphisch dargestellt. In diesem Zusammenhang ließ sich im Vergleich zur PBS-Kontrolle ein Signalverlust unter Proteinase K Einwirkung feststellen, der sich jedoch nicht so drastisch wie im Falle der

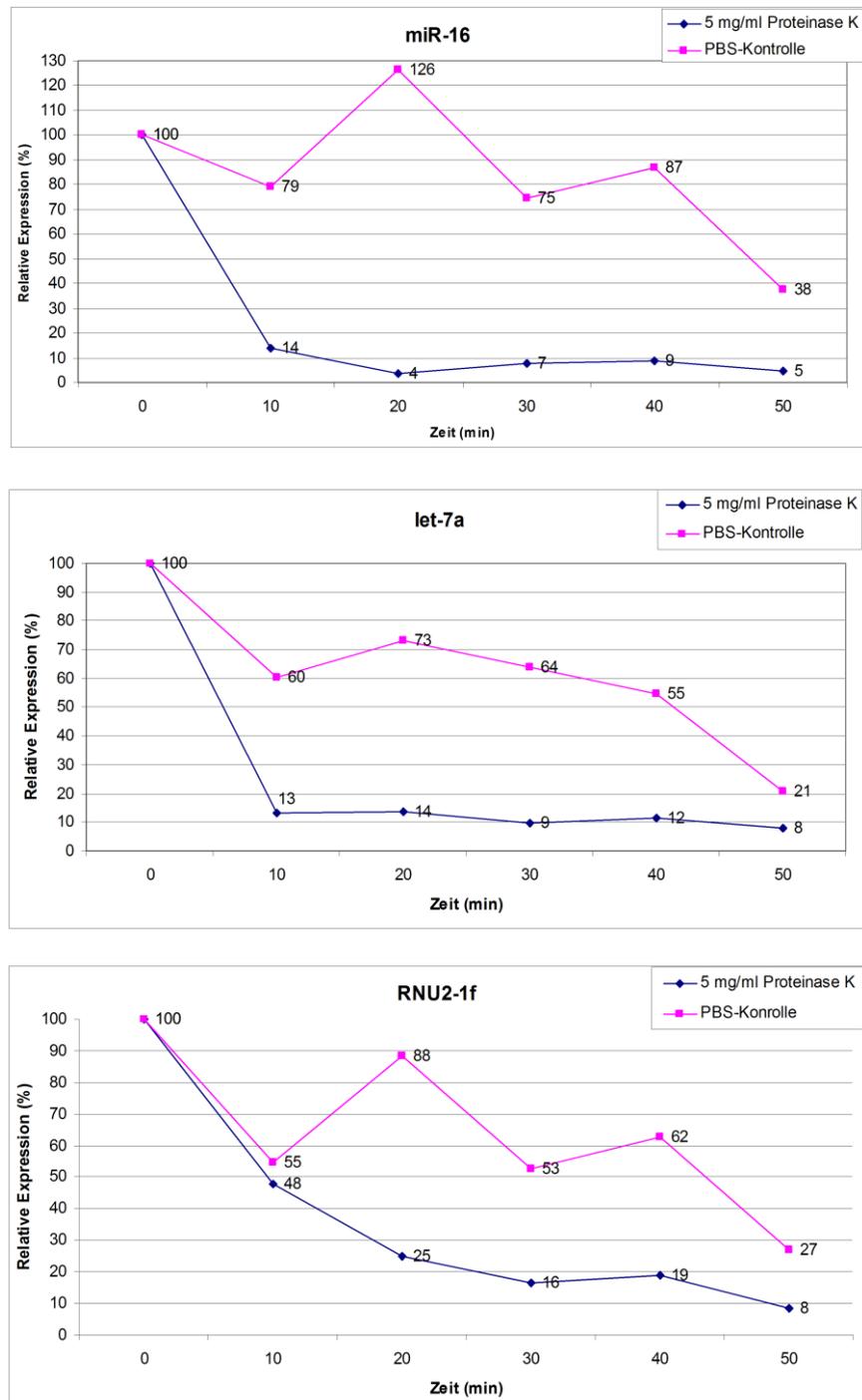


Abbildung 3-20: RNU2-1f Proteasesensitivitätstest

Sensitivkontrolle miR-16 präsentierte. Erst nach 40 min Inkubation reduzierte sich hier die Signalstärke unter auf einen Wert < 10%

### 3.3.8.2 RNU2-1 Expression im primären Tumorgewebe (FFT)

Für die RNU2-1 Analyse im kryokonservierten Ovarialkarzinomgewebe stand ein „Pilotkollektiv“ von 10 Ovarialkarzinompatientinnen zur Verfügung. Es wurde im Rahmen der Operation Tumorgewebe und entsprechendes Normalgewebe aus dem Peritonealbereich der jeweils gleichen Patientin zur Verfügung gestellt. Anschließend

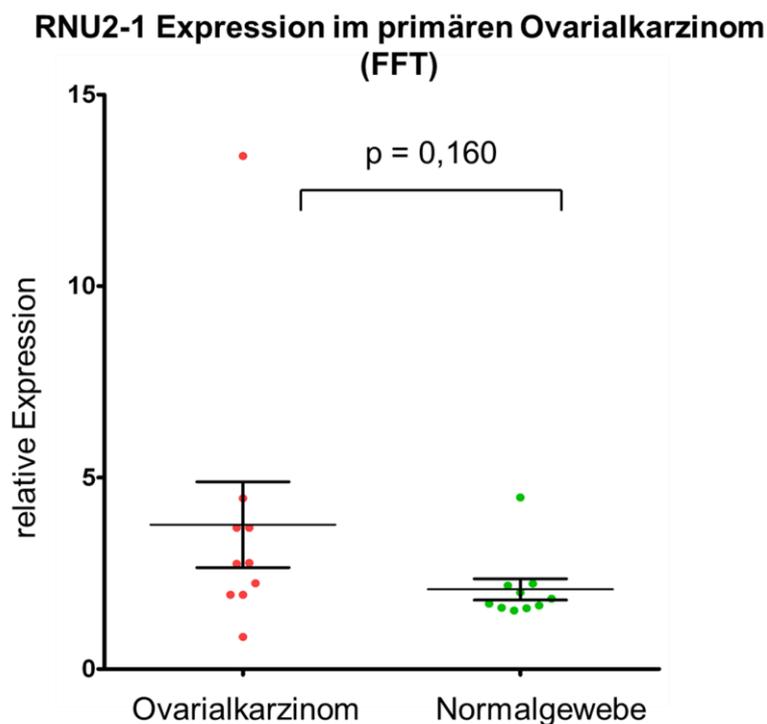


Abbildung 3-21: RNU2-1 Expression im primären Ovarialkarzinomgewebe (FFT)

wurde Gesamt-RNA (inkl. miRNA-Fraktion) aufgereinigt, in 100 µl eluiert und anschließend spektrophotometrisch quantifiziert. Je 100 ng der entsprechenden RNA wurden in cDNA umgeschrieben. Als „Normalizer-Sequenz“ wurde SNORR-44 ausgewählt. Eine cDNA Verdünnung von 1 zu 320 erwies sich als optimal für ein adäquates RNU2-1 bzw. Normalizer-Rohsignal, welches ungefähr im Bereich von Ct 16-30 liegen sollte (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3-21 zeigt die relative normalisierte RNU2-1 Expression im ovariellen Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. In den Karzinomproben konnte eine mittlere relative Expression von 3,77 (Range 0,84 – 13,40) verzeichnet werden, wohingegen im Normalgewebe eine mittlere Expression von 2,08 (Range 1,53 – 4,48) beobachtet wurde. Diese Hochregulation im Tumorgewebe erreichte mit einem p-Wert von 0,160, jedoch keine statistische Signifikanz.

### 3.3.8.3 RNU2-1 Expression im primären Tumorgewebe (FFPET)

Analog sollte die RNU2-1 Expression auch im FFPET analysiert werden, da hier Referenzgewebe aus tumorfreien Ovarien zur Verfügung stand. Es wurden 3 mm Tumorstücken aus FFPET von 20 primären Ovarialkarzinomen sowie von 20 tumorfreien Ovarien angefertigt. Anschließend wurde aus diesem Material Gesamt-RNA

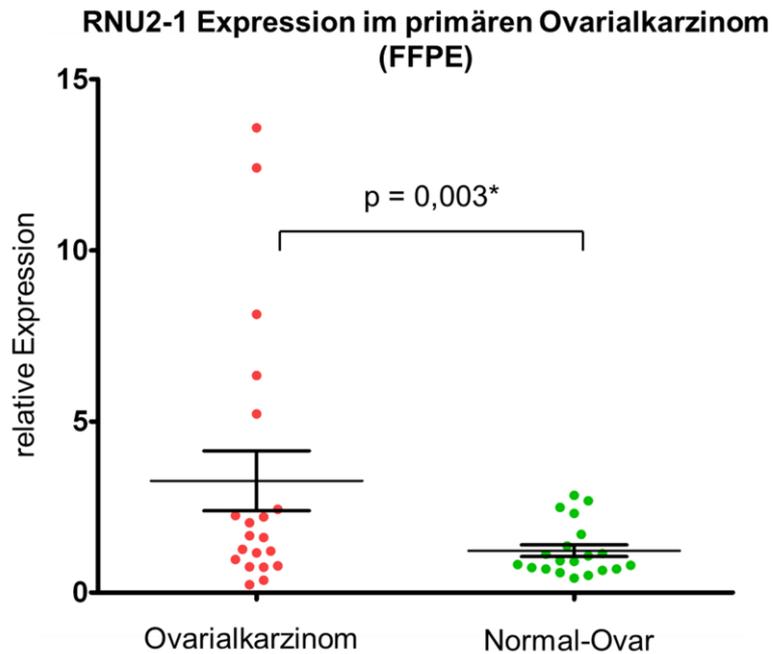


Abbildung 3-22: RNU2-1 im primären Ovarialkarzinomgewebe (FFPE)

(inkl. miRNA) aufgereinigt, in einem Volumen von 100 µl eluiert und spektrophotometrisch quantifiziert. Je 100 ng der entsprechenden RNA wurden in cDNA umgeschrieben. Eine cDNA Verdünnung von 1:60 erwies sich als optimal für ein adäquates RNU2-1 bzw. Normalizer Roh-Signal (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3-22 zeigt die relative normalisierte RNU2-1 Expression im ovariellen Tumorgewebe vs. Normalgewebe (FFPET). Für die Expression im Tumor ergab sich eine mittlere relative Expression von 3,27 (Range 0,23 – 13,58), wohingegen im Normalgewebe eine mittlere Expression von 1,22 (Range 0,42 – 2,84) beobachtet wurde. Die beobachtete Hochregulation im Tumorgewebe erwies sich als statistisch signifikant ( $p = 0,003$ ).

## 3.4 Molekulare Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen

### 3.4.1 ERCC1-Expression in zirkulierenden Tumorzellen

Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von ZTZ im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen vor Operation sowie nach Chemotherapie prädiktiv für ein verkürztes OS ist (Aktas et al., 2011). Im Folgenden sollte die Hypothese geprüft werden, inwieweit dieser negativ prognostische Einfluss der ZTZ möglicherweise mit einem platinresistenzassoziiertem Phänotyp dieser Zellen in Verbindung steht. In diesem Sinne sollte die Expression von ERCC1, einer Nuklease, die funktionell in die DNA-Reparatur involviert ist und bereits mit Platinresistenz ovarieller Tumoren in Verbindung gebracht werden konnte, in ZTZ untersucht werden (Dabholkar et al., 1994; Scheil-Bertram et al., 2010).

#### 3.4.1.1 Inzidenz und Verteilung der ERCC1-Expression

Aus dem Gesamtkollektiv der vorliegenden Dissertation (Tabelle 2-1) war die ERCC1-Analyse für 128 Patientinnen möglich. Das Profil klinischer Parameter dieser Patientinnengruppe war vergleichbar mit dem des Gesamtkollektivs (Tabelle 3-10). Von diesen 128 Patientinnen stand cDNA von 107 Patientinnen vor Operation sowie zusätzlich von 60 Patientinnen nach Chemotherapie zur Verfügung. Die Positivitätsrate für ZTZ in dieser Gruppe lag vor Operation bei 15% (16/106 Patientinnen) und nach Chemotherapie bei 23% (10/43 Patientinnen, Abbildung 3-23).

Tabelle 3-10: Patientinnenkollektiv für die ERCC1-Analyse

Anzahl Patientinnen: <b>128</b>	
mittleres Alter: <b>59</b> Jahre (Range: <b>21 - 89</b> Jahre)	
<b>FIGO-Stadium</b>	
FIGO I-II	26 (20%)
FIGO III	74 (58%)
FIGO VI	28 (22%)
<b>Lymphknotenstatus</b>	
N <sub>0</sub>	46 (36%)
N <sub>1</sub>	54 (42%)
N <sub>x</sub>	28 (22%)
<b>Grading</b>	
1-2	66 (52%)
3-4	61 (48%)
<b>Histologie</b>	
serös-papillär	93 (73%)
müzinös	11 (9%)
andere	24 (19%)
<b>Tumorrest</b>	
positiv	54 (42%)
negativ	74 (58%)
<b>DTZ vor Operation</b>	
positiv	39 (36%)
negativ	70 (64%)
<b>DTZ nach Chemotherapie</b>	
positiv	15 (31%)
negativ	33 (69%)

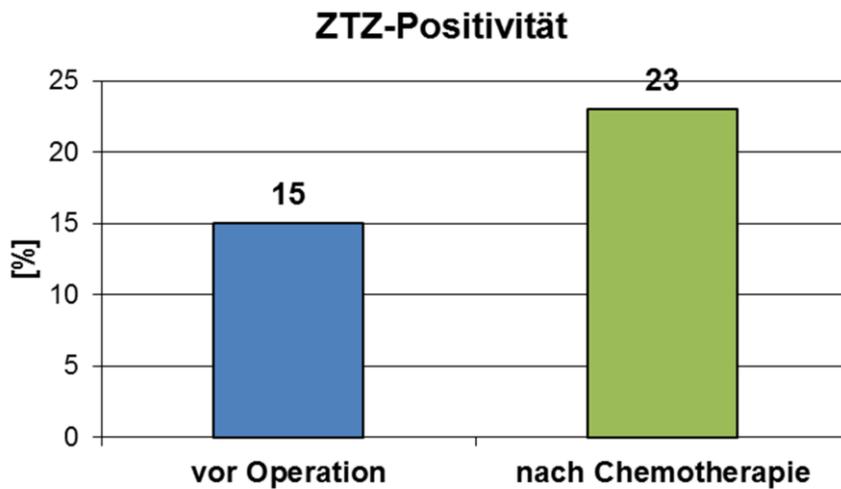


Abbildung 3-23: Präsenz von ZTZ gemäß *AdnaTest OvarianCancer*

Nachfolgend wurde die cDNA aller Patientinnen zusätzlich auf ERCC1-Expression hin untersucht. Nach Durchführung aller Messungen wurde zunächst eine ROC-Analyse zur Bestimmung eines diagnostischen Schwellenwertes, im Hinblick auf ERCC1-Positivität, durchgeführt (Abbildung 3-24). Dazu wurden Daten zur ERCC1-

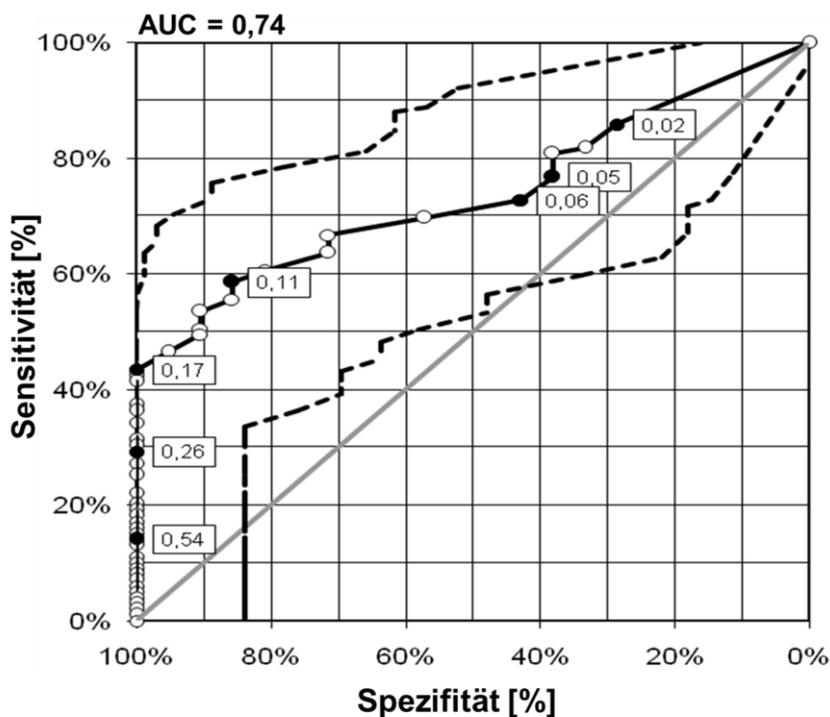


Abbildung 3-24: ROC-Analyse zur ERCC1-Expression

Expression von 21 Normalspendern herangezogen, die im Vorfeld durch die Firma Adnagen erhoben worden waren. Gemäß der ROC-Analyse wurde ein Amplikon-Schwellenwert  $>0,20$  ng/ $\mu$ l für ERCC1-Positivität festgelegt. Dieser Schwellenwert ermöglichte eine Diskriminierung zwischen Ovarialkarzinompatientinnen und Normal-

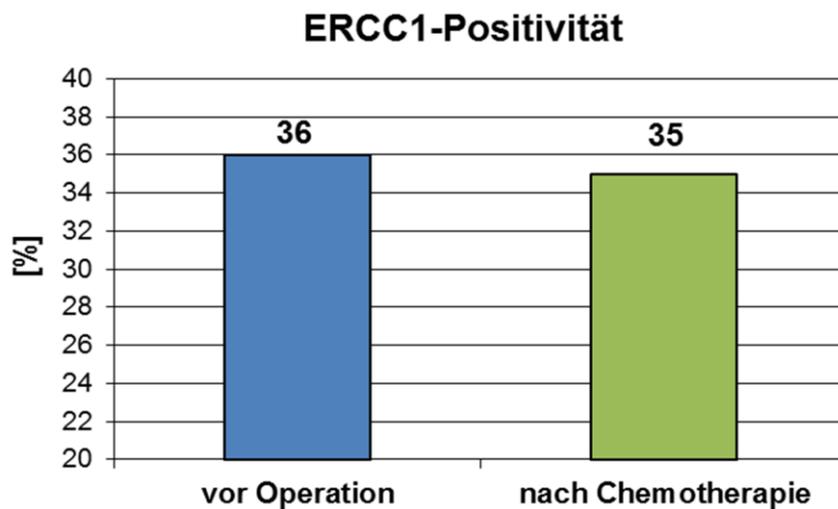


Abbildung 3-25: Darstellung der ERCC1-Positivität

spendern mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 41,4%. Der AUC-Wert betrug 0,74. Vor Operation zeigte sich gemäß dieses Schwellenwertes bei 39/107 Patientinnen (36%) ERCC1-Positivität, wohingegen sich nach Chemotherapie 21/60 Patientinnen (35%) als ERCC1-positiv erwiesen (Abbildung 3-25). Ferner wurde die ERCC1-Expression mit der Präsenz von ZTZ im Blut (gemäß *AdnaTest OvarianCancer*) verglichen. Aus dem vorliegenden Kollektiv stand ein kompletter Datensatz in Bezug auf diese beiden Parameter bei 103 Patientinnen vor Operation sowie bei 36 Patientinnen nach Chemotherapie zur Verfügung. In der ZTZ-positiven Gruppe erwiesen sich vor Operation 10/15 der Patientinnen (67%) positiv für ERCC1, wohingegen in der ZTZ-negativen Gruppe 26/88 (30%) ERCC1-positiv waren. Nach Chemotherapie zeigten sich in der ZTZ-positiven Gruppe 3/8 der Patientinnen (38%) positiv für ERCC1, wohingegen in der ZTZ-negativen Gruppe 8/28 (29%) ERCC1-positiv waren (Abbildung 3-26). Zusätzlich wurde die Veränderung der ERCC1-Expression im Zuge der Chemotherapie aufgeschlüsselt (Abbildung 3-27). Von insgesamt 39 Patientinnen des untersuchten Kollektivs war eine Blutprobe jeweils vor Operation sowie korrespondierend nach Chemotherapie verfügbar. Bei 18/39 dieser Patientinnen (46%) konnten weder vor Operation, noch nach Chemotherapie ERCC1-Transkripte nachgewiesen werden (neg-neg), wohingegen bei 11/39 Patien-

tinnen (28%) dieser Marker zum Zeitpunkt der Primärdiagnose gemessen wurde und ERCC1-Positivität auch noch nach Therapie persistierte (pos-pos). In 5/39 Fällen (13%) waren ERCC1-Transkripte zum Zeitpunkt der Primärdiagnose detektierbar, jedoch nicht mehr nach vollendeter Chemotherapie (pos-neg). Anders bei 5/39 Patientinnen (13%), diese Subgruppe wies anfangs keine ERCC1-Expression auf, wurde jedoch nach Chemotherapie neuerlich positiv (neg-pos).

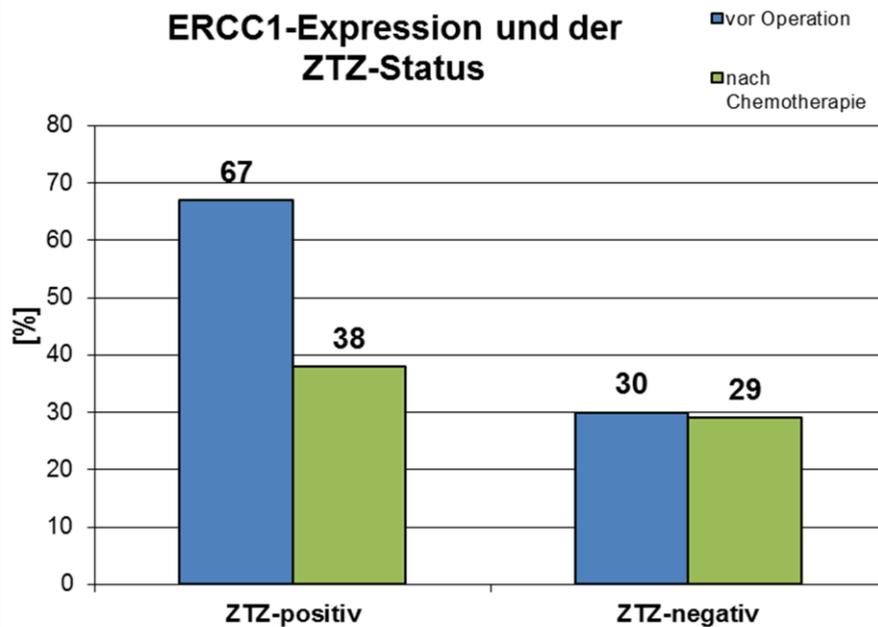


Abbildung 3-26: ERCC1-Positivität und der ZTZ-Status

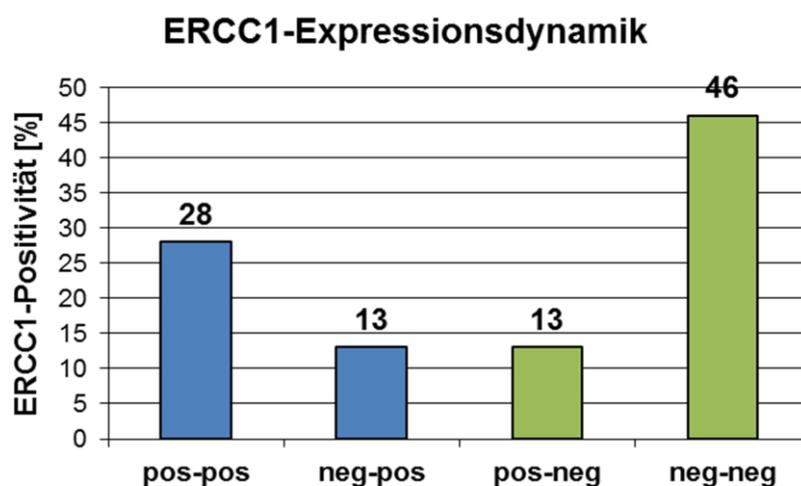


Abbildung 3-27: Subgruppenanalyse zur ERCC1-Expressionsdynamik

### 3.4.1.2 Klinische Relevanz der ZTZ und der ERCC1-Expression

Die Präsenz der ZTZ vor Operation korrelierte signifikant mit einem verkürzten OS ( $p = 0,0086$ , Abbildung 3-28) und nach Chemotherapie mit einem verkürzten DFS ( $p = 0,0111$ , Abbildung 3-29) und OS ( $p = 0,0016$ , Abbildung 3-30).

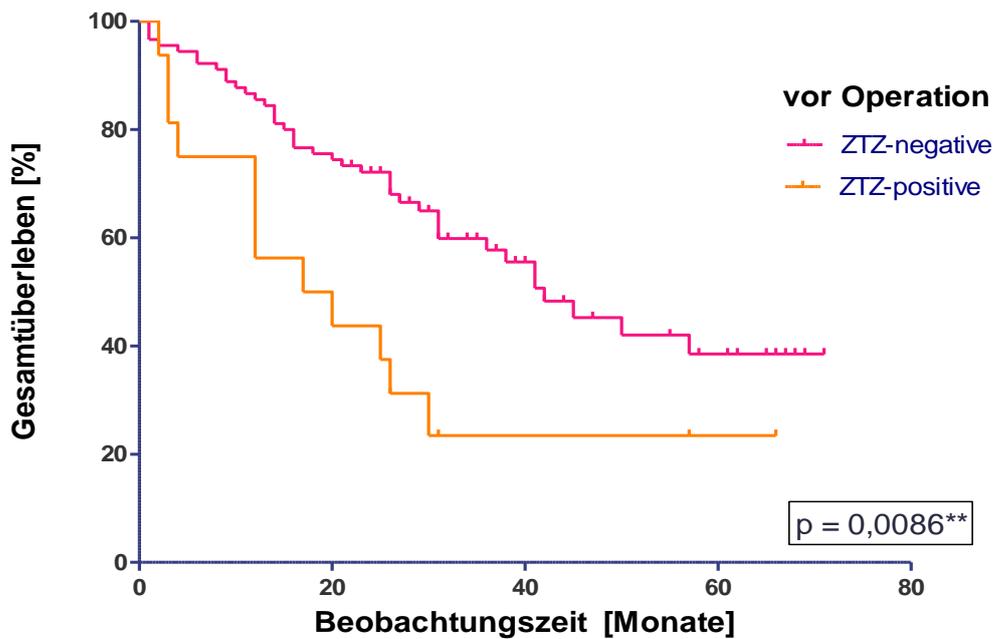


Abbildung 3-28: ZTZ-Präsenz vor Operation und das OS

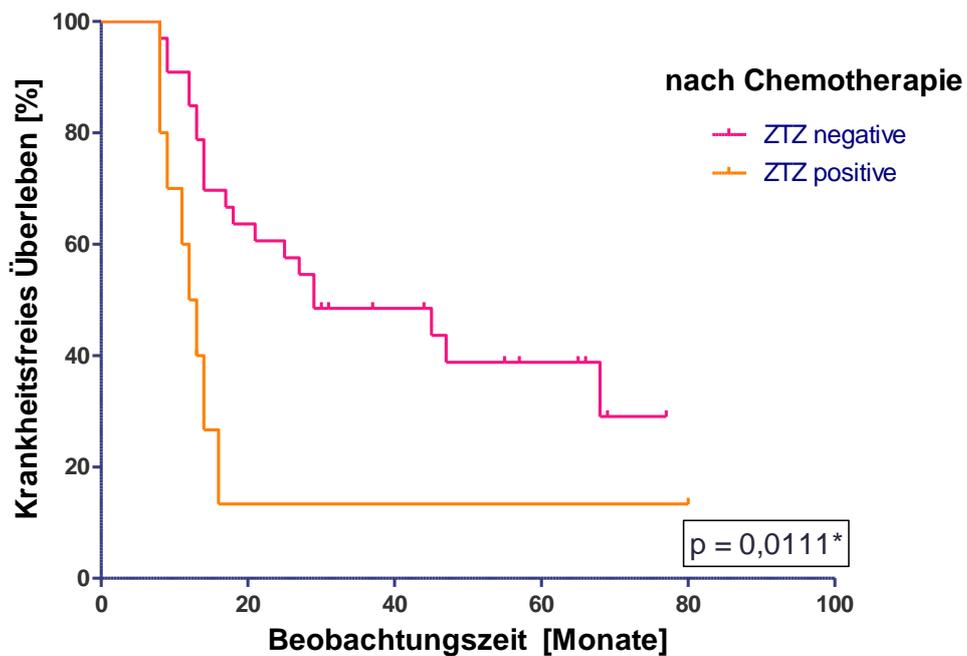


Abbildung 3-29: ZTZ-Präsenz nach Chemotherapie und das DFS

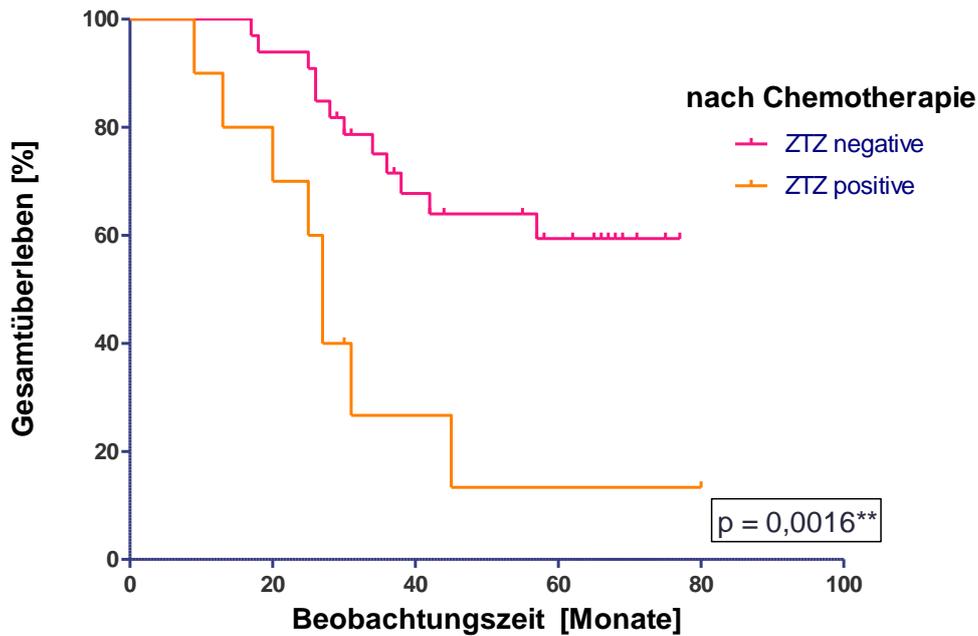


Abbildung 3-30: ZTZ-Präsenz nach Chemotherapie und das OS

Nachfolgend sollte die klinische Relevanz der ERCC1-Expression evaluiert werden. Es wurde untersucht, inwieweit die ERCC1-Expression in ZTZ mit der Platinresistenz korrelierte. Im Rahmen dieser Analyse wurde die ERCC1-Positivität in Bezug auf den klinischen Parameter „Platinresistenz“ aufgeschlüsselt (Tabelle 3-11). Bei 107 Patientinnen des untersuchten Kollektivs waren die Informationen bezüglich Platinresistenz und ERCC1-Expression verfügbar. Eine klinisch definierte Platinresistenz wurde bei 14/107 Patientinnen (13%) beobachtet, 5/14 dieser resistenten Fälle (36%) waren positiv für ERCC1, wohingegen 34/93 der Patientinnen (37%) mit platin sensiblen Tu-

Tabelle 3-11: ERCC1 und Platinresistenz

	ERCC1-positiv	ERCC1-negativ	n
<b>platinresistent</b>	5	9	14
[%]	36	64	
<b>platin sensitiv</b>	34	59	93
[%]	37	63	

moren ERCC1-Positivität aufwiesen. Somit zeigte sich in dieser Analyse eine in etwa gleiche Verteilung der ERCC1-Positivität in Bezug auf die resistente, bzw. die sensitive Patientinnengruppe. Nachfolgend wurde die prognostische Signifikanz der ERCC1-Expression in ZTZ untersucht. ERCC1-Positivität vor Operation, bzw. nach

Chemotherapie alleine zeigte keine prognostische Signifikanz in Bezug auf das DFS bzw. OS. Ferner wurden die bereits beschriebenen Subgruppen (neg-neg, pos-pos, pos-neg, neg-pos, Abbildung 3-27) mit dem DFS sowie dem OS korreliert.

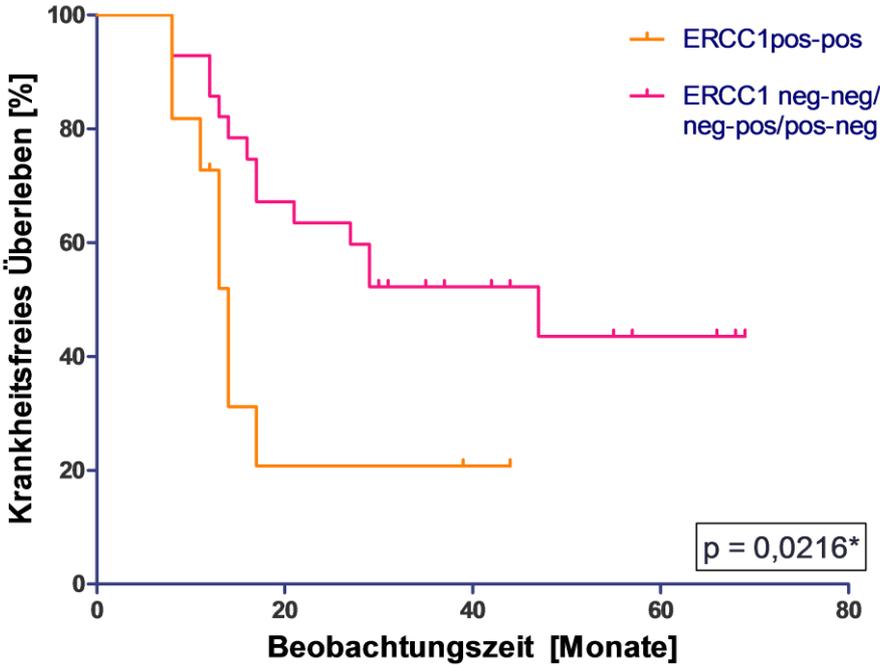


Abbildung 3-31: ERCC1-Expressionsdynamik und das DFS

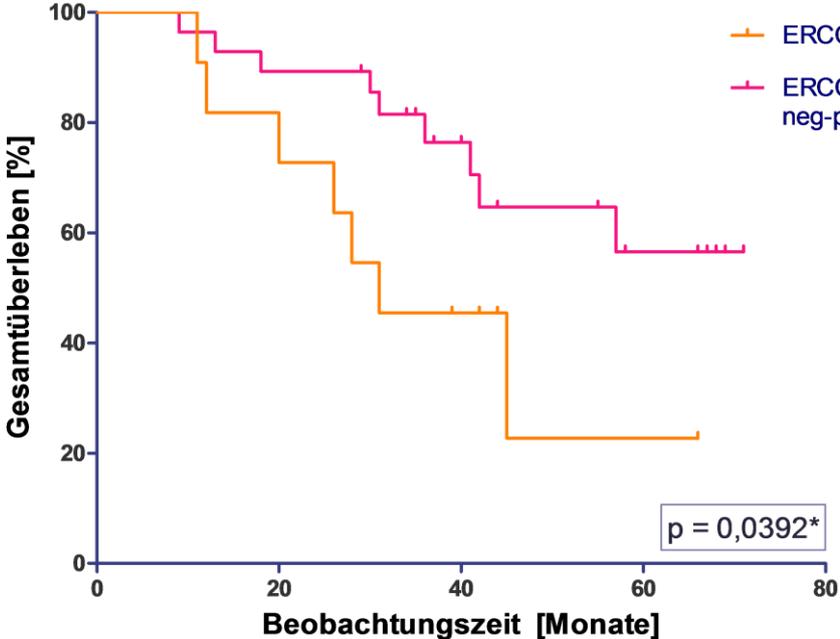


Abbildung 3-32: ERCC1-Expressionsdynamik und das OS

Interessanterweise ergab die Kaplan-Meier-Analyse, dass Patientinnen mit persistierender ERCC1-Positivität (pos-pos), im Vergleich zu allen anderen Subgruppen zusammen (neg-neg, pos-neg, neg-pos), ein signifikant kürzeres DFS aufwiesen ( $p = 0,021$ , Abbildung 3-31). Dies galt ebenso für das OS, hier erreichte jedoch ausschließlich der *Gehan-Breslow-Wilcoxon Test* statistische Signifikanz ( $p = 0,039$ , Abbildung 3-32).

### 3.4.2 EMT- und Stammzellmarker in zirkulierenden Tumorzellen

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschäftigten sich mit dem Nachweis von ZTZ bei Ovarialkarzinompatientinnen durch Verwendung des *AdnaTest BreastCancer*, bei dem die tumorassoziierten Transkripte GA733-2 (EpCAM), MUC-1, bzw. Her-2 im Multiplex-Verfahren analysiert wurden. Ergänzend wurde die CA 125-Expression in einem separaten Ansatz bestimmt. In diesem Zusammenhang konnte die Präsenz von ZTZ im Blut vor Operation sowie nach Chemotherapie als prädiktiv für ein verkürztes OS beschrieben werden (Aktas et al., 2011). Im Rahmen der Entwicklung eines *AdnaTest OvarianCancer* wurde nachfolgend ein Multiplex-Assay, mit der Detektion von CA 125 (an Stelle von Her-2), etabliert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Blut von 37 Ovarialkarzinompatientinnen durch *AdnaTest OvarianCancer* aufgearbeitet, parallel wurde die Präsenz stammzellähnlicher Zellen sowie der KM-Status der Patientinnen bestimmt. Die Präsenz von ZTZ galt als bestätigt, sobald sich die Expression von mindestens einem der Marker EpCAM, MUC-1, bzw. CA 125 als positiv herausstellte. Bei 7/37 dieser Patientinnen (19%) wurden ZTZ im Blut detektiert, wohingegen bei 13/36 Patientinnen (36%) DTZ im KM beobachtet werden konnten. In der ZTZ-positiven Patientinnengruppe waren 4/7 Patientinnen (57%) positiv für DTZ, wohingegen in der ZTZ-negativen Patientinnengruppe 9/29 Patientinnen (31%) DTZ im KM aufwiesen. Eine Aufschlüsselung dieser Untersuchung ist ergänzend in Tabelle 3-12 dargestellt.

Tabelle 3-12: ZTZ-Status und DTZ-Präsenz

	n	DTZ neg	DTZ pos
<b>ZTZ neg</b>	29	20	9
<b>[%]</b>		69	31
<b>ZTZ pos</b>	7	3	4
<b>[%]</b>		43	57

Ferner zeigten 24/36 Patientinnen (67%) eine Übereinstimmung des DTZ bzw. ZTZ-Status. Im Weiteren wurden alle Blutproben im Hinblick auf die Expression von EMT- bzw. stammzellassozierten Transkripten hin untersucht und diese Daten im Anschluss mit der Präsenz von ZTZ korreliert. Bei 29/37 Patientinnen stand ein vollständiger Datensatz in Bezug auf die Inzidenz von ZTZ im Blut und der Expression von EMT- bzw. Stammzellmarkern zur Verfügung. ALDH1-Positivität im Rahmen eines Stammzellcharakters wurde bei 2/29 Patientinnen (7%) verzeichnet (Abbildung 3-33). Ferner waren 4/29 Patientinnen (14%) positiv in Bezug auf mindestens einen der EMT-Marker Akt-2, PI3K oder Twist (davon: Akt-2 50%; PI3K 50%; Twist 0%). In der ZTZ-positiven Patientinnengruppe war keine Patientin positiv für EMT-Marker, jedoch 1/6 Patientinnen (17%) exprimierte ALDH1. In der ZTZ-negativen Patientinnengruppe hingegen waren interessanterweise 4/23 (17%) Patientinnen EMT-positiv bzw. 1/23 Patientinnen (4%) ALDH1-positiv (Abbildung 3-34). Eine genaue Aufschlüsselung dieser Untersuchung ist ergänzend in Tabelle 3-13 dargestellt.

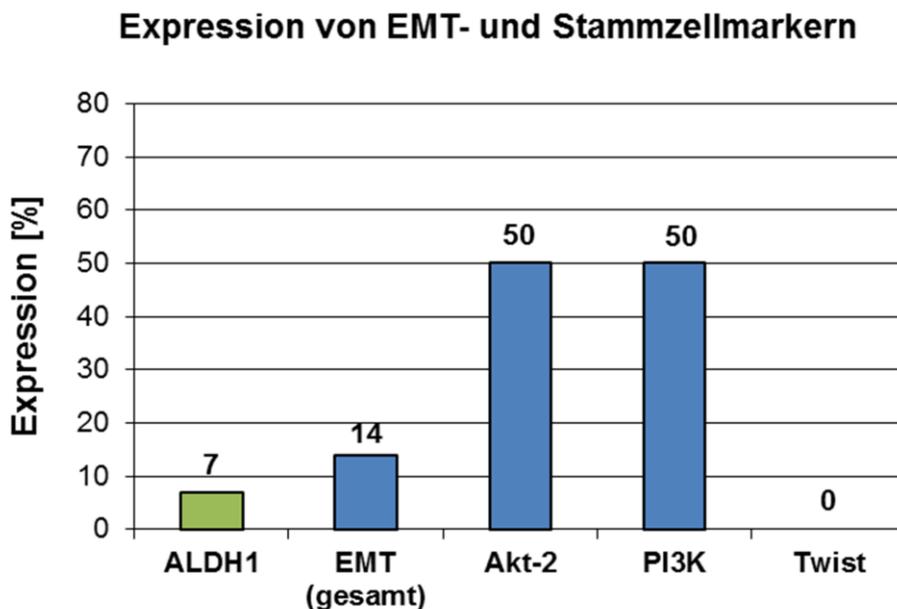


Abbildung 3-33: Expression von EMT- bzw. Stammzellmarkern

### EMT- und Stammzellmarker im Bezug auf den ZTZ-Status

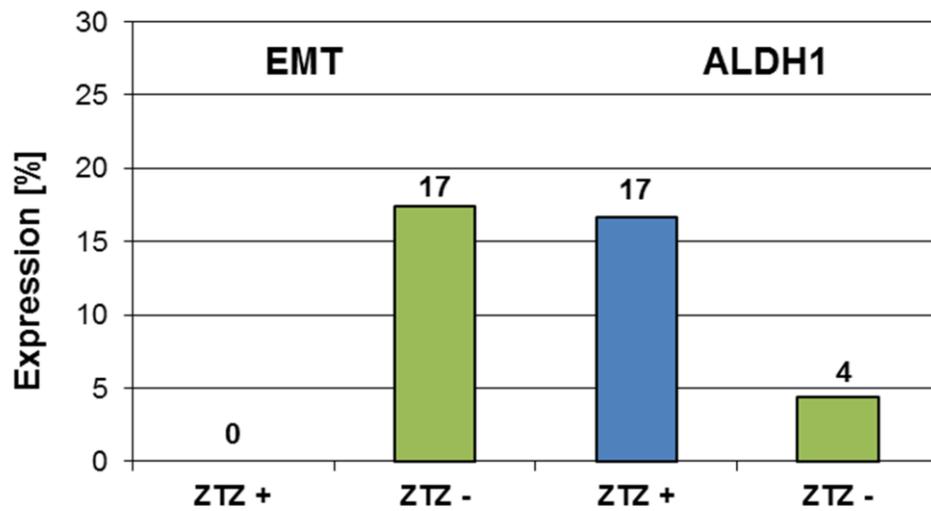


Abbildung 3-34: ZTZ-Status und Expression von EMT- bzw. Stammzellmarkern

Tabelle 3-13: ZTZ-Status und Expression von EMT- bzw. Stammzellmarkern

	n	EMT	AKT-2	PI3K	TWIST	ALDH1
<b>ZTZ neg</b>	23	4	2	2	0	1
<b>[%]</b>		17	9	9	0	4
<b>ZTZ pos</b>	6	0	0	0	0	1
<b>[%]</b>		0	0	0	0	17

## 4 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war die Identifikation neuer Biomarkerkonzepte für das Ovarialkarzinom. Dies geschah zunächst auf der Ebene des Primärtumors. In einem zweiten Schritt wurden experimentelle Strategien auf ein blutbasiertes System übertragen und es wurde überprüft, inwieweit das Blut von Ovarialkarzinompatientinnen, im Sinne einer „Real-Time-Liquid-Biopsy“, genutzt werden könnte.

### 4.1 LOH-Analyse im Primärtumorgewebe

In der vorliegenden Untersuchung wurde die LOH-Inzidenz an vier Ovarialkarzinom-relevanten chromosomalen Loci in Primärtumoren analysiert. Mit Hilfe der angewandten Minidissektion von Gewebearealen sollten Störeinflüsse durch nicht tumoröse Zellkompartimente minimiert werden. Die Mehrzahl der Patientinnen zeigte mindestens ein LOH-Ereignis im Primärtumor und bei der Hälfte aller Patientinnen waren vor Operation sowie nach Chemotherapie DTZ im KM präsent. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die LOH-Inzidenz proximal zum M6P/IGF2R-Lokus einen prädiktiven Marker für die Präsenz von DTZ vor Operation sowie nach Chemotherapie darstellt.

#### 4.1.1 Klinische Relevanz der LOH im Primärtumor

Für die untersuchten Mikrosatellitenmarker D13S218, D17S855 und D6S1581 erwies sich LOH mit einer Inzidenz > 50% als sehr häufiges Ereignis. Dieser Befund steht in Übereinstimmung zu vorausgegangenen Studien mit kleineren Patientinnenkollektiven. LOH am Chromosom 17 und 13q wurde in hereditären sowie sporadischen Ovarialkarzinomen als häufiges Phänomen beschrieben (Brozek et al., 2009). In einer weiteren Untersuchung von 20 Ovarialkarzinompatientinnen wurde ein LOH-Ereignis am Marker D17S855 mit einer Frequenz von 63% beschrieben, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt (Hickey et al., 1999). Ferner wurde LOH am chromosomalen Arm 6q als häufiges Ereignis beobachtet (Zheng et al., 1991). Der mit dem PTEN Locus assoziierte Marker D10S1765, der in der vorliegenden Analyse eine moderate LOH-Frequenz von 18,5% aufwies, wurde schon einmal in einem Kollektiv von 13 Patientinnen mit serösem Adenokarzinom des Ovars untersucht. Mit einer ermittelten Frequenz von 31% erwies sich ein Allelverlust an diesem Marker jedoch als recht häufiges Ereignis (Ho et al., 2009). Im Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass LOH am analysierten Marker-Panel signifikante Korrelationen

mit der Histologie (D17S855), dem FIGO-Stadium (D10S1765) sowie dem Tumorgrading (D17S855) aufwies. Die Assoziation von LOH an definierten Regionen auf dem Chromosom 17 mit klinischen Parametern konnte auch in anderen Studien berichtet werden. In diesem Zusammenhang zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Profil der Allelverluste in serösen versus endometrioiden histologischen Subtypen primärer Ovarialkarzinome (Eccles et al., 1992).

In dem vorliegenden Patientinnenkollektiv ergab sich jedoch keine Korrelation der untersuchten LOH mit dem DFS bzw. dem OS, was damit zusammen hängen könnte, dass nur eine limitierte Anzahl möglicher Mikrosatellitenmarker untersucht wurde. Das Auftreten definierter Allelverluste in ovariellen Primärtumoren ist als sehr komplexes und vielschichtiges Phänomen zu verstehen, welches genetische Aberrationen an einer Vielzahl von Chromosomen umfasst (Gallion et al., 1995; Brown et al., 1999). Daher ist nicht zu erwarten, dass jeder Allelverlust im Primärtumor auch mit einer prognostischen Signifikanz einhergeht. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich bei Patientinnen mit ovariellen Klarzelltumoren in 30% der untersuchten Fälle eine verminderte PTEN-Expression gezeigt werden. Bemerkenswerter Weise standen beobachtete LOH am PTEN-Lokus bei 33% der Patientinnen weder im Zusammenhang mit der PTEN Inaktivierung, noch zeigten sie prognostische Signifikanz (Ho et al., 2009). Das Auftreten von Allelverlusten könnte ebenso als sogenannter „Trittbrettfahrer“ im Zuge einer progressiven genetischen Instabilität im Tumorgenom entstehen und muss somit nicht zwingend im kausalen Zusammenhang mit einer malignen Progression stehen.

#### **4.1.2 LOH und Tumorzell disseminierung in das Knochenmark**

Die vorliegende Untersuchung zeigte erstmalig einen Zusammenhang zwischen der Präsenz von LOH proximal zu IGF2R im ovariellen Primärtumor und der Tumorzell disseminierung in das KM. Eine derartige Analyse ist bisher nur in wenigen Studien durchgeführt worden. In einer Arbeit zum Mammakarzinom wurden sechs Mikrosatellitenmarker, darunter auch D10S1765, D13S218 und D17S855, untersucht. LOH im Primärtumor und in zellfreier zirkulärer DNA im Serum konnte in diesem Zusammenhang nicht als prädiktiv für die Tumorzell disseminierung in das KM beschrieben werden (Schwarzenbach et al., 2009). Ferner wurde jedoch im Kontext des primären Prostatakarzinoms berichtet, dass LOH in zellfreier zirkulärer DNA am Marker D8S137 (Demantin-

Lokus), D9S171 (CDKN2/p16-Lokus) und D17S855 mit der Präsenz von ZTZ im Blut korrelierte (Schwarzenbach et al., 2009).

Die hier gezeigten Befunde in Bezug auf den Mikrosatellitenmarker D6S1581 sind komplementär zu bereits publizierten Daten. Ein Allelverlust am M6P/IGF2R-Lokus stellt bei Ovarialkarzinomen grundsätzlich ein häufiges Ereignis dar (Rey et al., 2000) und eine niedrige Kopienzahl des Markers D6S1581 wird als prädiktiver Faktor für eine Platinresistenz dieser Tumoren angesehen (Makhija et al., 2003). Der Mikrosatellitenmarker D6S1581 ist 6q25.1 lokalisiert und etwa 25 kb von dem M6P/IGF2R-Rezeptor-Lokus entfernt (Makhija et al., 2003). Dieser Rezeptor konnte bei Untersuchungen zum Mammakarzinom als funktionell relevant beschrieben werden und es wurde die Hypothese postuliert, dass dieser Rezeptor im Rahmen eines Tumorsuppressors Zellüberleben, Tumordinvasion und Metastasierung negativ reguliert (De Souza et al., 1997; Lee et al., 1998; Oates et al., 1998; Wood et al., 2000). In diesem Sinne könnte ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen dem Verlust von M6P/IGF2R und einem „persistierenden“ mikrometastatischen Phänotyp bei Ovarialkarzinompatientinnen vermutet werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust des M6P/IGF2R das Gleichgewicht zwischen IGF2 und seinem Rezeptor verhinderte und somit zu einer verstärkten IGF2-vermittelten IGF1R Signalaktivierung führte. Dies wiederum kann Überleben und Proliferation von Tumorzellen begünstigen (Makhija et al., 2003). Da das Auftreten von DTZ im KM sowie deren Persistenz nach Chemotherapie im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose steht, könnte LOH am Marker D6S1581 zum Zeitpunkt der Primärdiagnose sowie nach vollendeter Chemotherapie wertvolle Information über verbleibende Tumorzell-disseminierung in das KM liefern (Braun et al., 2001; Banyas et al., 2009; Wimberger et al., 2011).

#### **4.1.3 Fazit der gewebebasierten LOH-Analyse**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die klinische Relevanz von Allelverlusten im Primärtumor gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurde LOH proximal zum M6P/IGF2R als neuer Biomarkerkandidat identifiziert, mit dem man durch Primärturmormaterial Information über die Tumorzellstreuung ins KM gewinnen könnte.

## **4.2 LOH-Analyse im Blut**

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Fraktionierung der zirDNA eine essentielle Voraussetzung für die LOH-Analyse im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen darstellt. Ferner wurden neue blutbasierte Biomarker für die Tumorzeldisseminierung in das KM und die Prognose identifiziert.

### **4.2.1 Tumorbiologische Relevanz niedermolekularer DNA im Blut**

Die Mehrzahl detektierter LOH-Ereignisse wurde in der NMF gefunden. Ferner zeigte die NMF einen signifikanten Abfall des DNA-Gehaltes nach Chemotherapie. Diese Befunde implizieren, dass Tumor-DNA in der Zirkulation primär einen niedermolekularen Charakter aufweisen mag. Aus vorausgegangenen Untersuchungen wurde bereits die Hypothese abgeleitet, dass freie tumorassoziierte DNA in der Zirkulation primär einen niedermolekularen Charakter aufwies (Wang et al., 2004). Dies, so die Annahme, stehe im Zusammenhang mit den biologischen Eigenschaften der Tumorzellen. Diese proliferieren in der Regel mit abnormer Geschwindigkeit und induzieren häufig den programmierten Zelltod, die Apoptose, was eine zunehmende DNA-Fragmentierung und in Folge dessen eine kumulative Abgabe kurzsträngiger DNA in die Zirkulation bedingen könnte (Nakamura et al., 1995; Schulte-Hermann et al., 1995; Arai et al., 1999; Wang et al., 2004). In diesem Zusammenhang lässt sich der signifikante Abfall des Gehaltes niedermolekularer DNA im Blut nach Chemotherapie durch die systematische Vernichtung platinempfindlicher Tumorzellen erklären. Der Gehalt hochmolekularer DNA erwies sich jedoch vor Operation und nach Chemotherapie als stabil, wenn auch nach Therapie eine etwas größere Streubreite auffiel. Als Quelle für hochmolekulare zirDNA werden „normale“ Blutlymphozyten sowie nekrotische und inflammatorische Zellen des Tumorstroma diskutiert (Anker et al., 1999). Betrachtet man den stabilen HMF-DNA-Gehalt im Serum der Patientinnen vor Operation und nach Chemotherapie und berücksichtigt, dass die post-therapeutischen Seren bis zu sechs Monate nach Abschluss der Chemotherapie gewonnen wurden, so lässt sich folgern, dass eine systemische Chemotherapie offensichtlich keine langfristige Auswirkung auf den Gehalt der HMF im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen hat. Ob nun unmittelbar nach Applikation bzw. während der platinbasierten Chemotherapie eine Veränderung der HMF-DNA induziert wird, kann in dieser Studie nicht beurteilt werden, da in diesem Zusammenhang keine entsprechenden Messpunkte zur Verfügung standen.

#### **4.2.2 Vorteile der DNA-Fraktionierung**

Die Mehrzahl detektierter Allelverluste sowie die Mehrzahl der Korrelationen mit klinischen Parametern beruhte auf der NMF, wohingegen LOH in der HMF ein verhältnismäßig seltenes Ereignis darstellte. Nahezu alle bisherigen Studien unterschiedlichster Tumorentitäten, die sich mit LOH-Analyse in zirDNA beschäftigten, untersuchten Allelverluste, ausschließlich in nicht fraktionierter DNA. In diesem Zusammenhang zeigten vorausgegangene Studien, z.B. im Rahmen des Lungen-, des Kopf-Hals- oder des Mammakarzinoms, eine große Variabilität beobachteter LOH-Detektionsraten mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen (Chen et al., 1996; Anker et al., 1999; Coulet et al., 2000; Wang et al., 2003). Diese Arbeit fokussierte sich, in Kooperation mit dem Labor von Frau PD Dr. Schwarzenbach, auf die Validierung einer neuen Fraktionierungsmethodik, die eine Separation von zirDNA aus Serum oder Plasma in HMF und NMF ermöglichen sollte (Muller et al., 2008). In einer Pilotstudie zum Prostatakarzinom wurde die Mehrzahl der Allelverluste in der LMF detektiert, was sich mit den Erkenntnissen dieser Arbeit deckte (Muller et al., 2008). In einer weiteren Untersuchung von Wang et al. konnte mit Hilfe einer säulenbasierten „Guanidin-Promega-Resin-Methode“ gezeigt werden, dass die spezifische Isolation kurzsträngiger DNA die Detektionssensitivität zirkulierender K-RAS-Sequenz im Blut von Kolonkarzinompatienten erheblich verbesserte. Mit Hilfe dieser präliminären Daten wurde die Hypothese postuliert, dass man für den sensitiven Nachweis somatischer tumorassoziierter Alterationen im Blut eine Isolationsmethodik wählen sollte, mit der man selektiv kurzsträngige DNA anreichern kann (Wang et al., 2004).

#### **4.2.3 Klinische Relevanz der LOH im Serum**

LOH am Marker D10S1765 in der NMF erwies sich als prädiktiv für die Tumorzellstreuung in das KM nach Chemotherapie, für das FIGO-Stadium sowie für das Tumorgrading. Assoziationen zwischen diesen Mikrosatellitenmarkern und dem FIGO-Stadium bzw. dem Tumorgrading standen in Übereinstimmung mit den vorausgegangenen primärtumorbasierten Untersuchungen dieser Arbeit (Kuhlmann et al., 2011). Die Lokalisation von D10S1765 ist 10q23.3. Diese genomische Region kodiert für PTEN, eine Proteinphosphatase mit dualer Spezifität, die den PI3K-Akt Signalweg antagonisiert und wichtige Prozesse wie Proliferation, DNA-Reparatur, Stammzellenrenewerung, genomische Stabilität und Metastasierung reguliert (Zhang and Yu, 2010). Eine PTEN-Herunterregulation in ovariellen Tumoren, so eine aktuelle Untersuchung,

ist funktionell in den Mechanismus der Platinresistenz involviert (Yang et al., 2008). In diesem Zusammenhang erscheint es logisch, dass fortgeschrittene Tumoren viel stärker von der Akkumulation genetischer Alterationen abhängig sind, als frühe maligne Läsionen. Ebenfalls könnte man vermuten, dass eine PTEN-Lokus Deletion durch LOH, in Kooperation mit z.B. epigenetischen Ereignissen, im funktionellen Zusammenhang mit der Tumorprogression, der Persistenz von Tumorzellen nach Chemotherapie sowie der Tumorzell dissemination in das KM steht (Goel et al., 2004).

Des Weiteren ergab die statistische Auswertung dieser Arbeit, dass LOH am Marker D6S1581 zum Zeitpunkt der Primärdiagnose prädiktiv für ein verkürztes OS war. Wie im Vorfeld beschrieben, konnte eine niedrige Kopienzahl des Markers D6S1581 als prädiktiver Faktor für die Platinresistenz von ovariellen Primärtumoren beschrieben werden (Makhija et al., 2003). In dem hier untersuchten Patientinnenkollektiv jedoch, ergab sich keine signifikante Assoziation mit der Platinresistenz. Allgemein handelt es sich beim Ovarialkarzinom um eine sehr platin sensible Tumorentität mit einer allgemeinen Ansprechrate von 70 – 80% (Bookman, 1999). Daher war die Anzahl der platinresistenten Patientinnen in unserem Kollektiv zu gering ( $n = 15$ ), um hier eine statistisch fundierte Aussage zu treffen. Die beobachtete prognostische Signifikanz des Markers D6S1581 in der zirkulären DNA von Ovarialkarzinompatientinnen ist jedoch von besonderem Interesse, da der Marker im Rahmen dieser Arbeit bereits im Primärtumor als prädiktiv für die Tumorzellstreuung in das KM beschrieben wurde (Kuhlmann et al., 2011). Man könnte vermuten, dass die genomische Region proximal zu M6P/IGF2R eine funktionelle Relevanz für die ovarielle Tumorgenese besitzt. Ebenfalls unterstützen die gewonnenen Ergebnisse das Konzept zirkuläre DNA, im Sinne einer „Real-Time-Liquid-Biopsy“, für das Ovarialkarzinom zu nutzen und ein nicht invasives Therapiemonitoring zu etablieren. Ferner wurden die meisten signifikanten Korrelationen in Bezug auf die klinischen Parameter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose gefunden. Somit scheint das präoperative Serum für Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom der am meisten informative Messpunkt zu sein.

#### **4.2.4 LOH-Profil in der „Follow-Up“ Situation**

Auch nach vollendeter Chemotherapie verringerte sich die LOH-Frequenz der Patientinnen nur marginal. Die Verfolgung genetischer Alterationen in Verlaufsseren von Patienten wurde bereits in einigen früheren Studien durchgeführt (Hamana et al., 2005; Rawnaq et al., 2011). In einer entsprechenden Untersuchung zum Mammakar-

zinom konnte gezeigt werden, dass das LOH-Profil von seriell entnommenen Blutproben weitestgehend stabil blieb, wobei es nicht vollständig geklärt werden konnte, inwieweit einzelne, nicht übereinstimmende Ergebnisse auf die Veränderung klinischer Parameter zurückzuführen waren (Schwarzenbach et al., 2007). In einer weiteren Studie zum Mammakarzinom deutete eine Persistenz von Allelverlusten in der zirkulären DNA nach Mastektomie auf prognostisch ungünstige histologische Parameter sowie auf die Präsenz von Mikrometastasen hin (Silva et al., 2002). Die Detektion von Allelverlusten nach einer vollendeten Chemotherapie, wie es in dieser Arbeit beobachtet wurde, könnte mit der Präsenz von residuellen Tumorzellen oder okkulten mikrometastatischen Zellen, wie DTZ oder ZTZ, erklärt werden, die eine Resistenz gegenüber der zytotoxischen Therapie aufweisen.

#### **4.2.5 „De Novo“ LOH und deren möglicher Ursprung**

Abgesehen von Patientinnen, deren LOH nach Chemotherapie nicht mehr detektierbar war, fiel in der Untersuchung eine Subgruppe von Patientinnen auf (30 %), bei denen entsprechende(r) Allelverlust(e) nach Chemotherapie, aber nicht zum Zeitpunkt der Primärdiagnose detektierbar waren. Ein vergleichbares Phänomen wurde bei Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom berichtet. Im Falle einer erfolgreichen Therapie verschwanden genetische Aberrationen der zirkulären DNA, wohingegen neuerlich auftretendes LOH nach Chemotherapie mit dem Auftreten eines Rezidivs korrelierte (Gonzalez et al., 2000). Auf Grund der limitierten Anzahl an Patientinnen in unserer Studie mit neuerlich erworbenem LOH, war eine statistisch fundierte Aussage, über die prognostische Signifikanz dieses Phänomens, noch nicht möglich. Es lässt sich aber vermuten, dass eine gewisse Subpopulation ovarieller Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften nicht durch die Chemotherapie beeinträchtigt wird, sich durch klonale Selektion weiter entwickelt und systematisch neue genetische Alterationen akquiriert. Es bleibt Gegenstand der Spekulation, ob es genau diese Art der Zellpopulation ist, die zur Initiierung eines Rezidivs führt. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine Subpopulation von Tumorzellen mit Stamzelleigenschaften ABC-Transporter überexprimiert, dadurch das Wachstum therapieresistenter Ovarialtumoren begünstigt und letztendlich die Entwicklung eines Rezidivs bedingt (Rizzo et al., 2011).

## **4.2.6 Anmerkung zu methodischen Schwachpunkten**

### **4.2.6.1 Amplifikation niedermolekularer DNA**

Das Auftreten von sogenannten „Pseudo-LOH“, also einem zufällig angezeigten Allelverlust auf Grund schlechter DNA-Integrität bzw. zu niedriger DNA-Konzentration, stellt einen möglichen Schwachpunkt der angewandten Methodik dar. Ein wichtiges Kennzeichen von Pseudo-LOH ist ein tendenziell häufiger auftretender Verlust des längeren Allels. Dies ist dadurch bedingt, dass es im Falle einer stark fragmentierten DNA bei dem längeren Allel statistisch gesehen eher zu einem Ausfall der Amplifikation kommt, als bei dem kürzeren Allel. Ein mögliches Auftreten von Pseudo-LOH im Zuge der Mikrosatellitenanalysen sollte somit auch hier kritisch beurteilt werden. Durch die Zugabe des PCR-Additivums TMAC, welches in dieser Arbeit ebenfalls verwendet wurde, konnte eine Verbesserung der Amplifikationsbedingung niedermolekularer DNA gezeigt werden (Muller et al., 2008). Zusätzlich wurden alle PCR-Ergebnisse mit geringstem Verdacht auf Amplifikationsauffälligkeiten als „nicht informativ“ gewertet. Ferner kann für die vorliegende Untersuchung bestätigt werden, dass das Verhältnis der Verlusthäufigkeit des längeren bzw. kürzeren Allels an allen vier Mikrosatellitenmarkern, und über alle untersuchten Proben hinweg tendenziell ausgeglichen ist. Unter Berücksichtigung dieser Sachverhalte ist es unwahrscheinlich, dass sich unter den beobachteten LOH in der NMF eine nennenswerte Anzahl zufallsbedingter „Pseudo-LOH“ befindet.

### **4.2.6.2 DNA-Fraktionierung und Fragmentgrößen**

In einer vorausgegangenen Studie wurde bereits versucht, die Fragmentgrößenverteilung in der HMF und LMF zu bestimmen (Muller et al., 2008), jedoch war es bisher nicht möglich einen exakten Schwellenwert, in Bezug auf die Fragmentgröße zu definieren. Dies lässt sich auf die unterschiedliche DNA-Bindekapazität der verwendeten Filtersysteme zurückführen, die bezüglich der Fragmentgrößen-separation überlappende Eigenschaften zeigen. In diesem Zusammenhang sollten weitere Untersuchungen geplant werden, um die Fragmentgrößenverteilung von HMF und NMF der zirDNA näher zu charakterisieren.

#### **4.2.7 Fazit der blutbasierten LOH-Analyse**

In dieser Arbeit konnten Notwendigkeit und Anwendungspotential einer DNA-Fraktionierung verdeutlicht werden. Die Fraktionierungsmethodik könnte die selektive Analyse tumorassoziierter Mikrosatellitenalterationen im Blutserum von Ovarialkarzinompatientinnen ermöglichen. Obwohl die meisten signifikanten Korrelationen mit klinischen Parametern in der NMF gefunden wurden und in dieser Fraktion auch der größte Anteil frei zirkulierender Tumor-DNA vermutet wird, könnte der LOH-Status in der HMF noch zusätzlich prognostisch relevante Informationen für Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom liefern. Ferner wurden in dieser Arbeit LOH am Marker D10S1765 und D6S1581 als neue blutbasierte Biomarker für die Tumorzell dissemination in das KM sowie die Prognose der Patientinnen beschrieben, was als relevanter Beitrag für die Entwicklung eines nicht invasiven Therapiemonitoring verstanden werden könnte. Die genomische Region proximal zu M6P/IGF2R könnte ein interessantes therapeutisches Ziel darstellen und sollte in Zukunft weiterführend charakterisiert werden.

### **4.3 microRNA-Analyse im Blut**

#### **4.3.1 Etablierung einer Microarrayanalyse aus Humanserum**

Repräsentative Elektropherogramme lieferten Erkenntnisse über die Beschaffenheit von RNA im peripheren Blut. RNA aus zellulären Systemen, wie etwa frisch isolierte OSE-Zellen, wies charakteristische ribosomale 18S bzw. 28S Banden auf und zeigte in der Regel eine hohe RNA-Integrität. Zirkulierende RNA aus dem Serum ist jedoch sehr schwach konzentriert und fragmentiert. Dies erscheint plausibel wenn man bedenkt, dass RNA eine geringe intrinsische Stabilität aufweist und das natives Humanserum eine hohe endogene RNase-Aktivität besitzt (Tsui et al., 2002). An dieser Stelle ist jedoch zu beachten, dass in der vorliegenden Analyse Gesamt-RNA untersucht wurde und der miRNA Anteil in diesen Proben nur eine gewisse Subfraktion umfasste. Zirkulierende miRNA sind in ihrer funktionellen maturen Form nur etwa 21-23 Nukleotide lang, besitzen eine hohe endogene Stabilität in der Zirkulation und können akkurat detektiert werden (Mitchell et al., 2008; Brase et al., 2010). Somit ist der hier beobachtete fragmentierte Charakter zirkulierender RNA nicht obligatorisch mit verminderter Integrität der miRNA-Fraktion gleichzusetzen. Obwohl der Nachweis zirkulierender mRNA prinzipiell deutlich kritischer ist, konnte gezeigt werden, dass z.B. Tyrosinase-mRNA, ein essentielles Transkript zur Synthese von Melanin, im Se-

rum amplifizierbar ist und trotz einer Länge von > 200 bp als potentieller Biomarkerkandidat für Melanompatienten gilt (Fryer et al., 2001; Hasselmann et al., 2001).

Eine Microarrayanalyse bedarf einer bestimmten Ausgangsmenge an RNA, die in der Regel etwa 100 ng beträgt. Jedoch ist es auf Grund der geringen Konzentration nicht möglich, RNA aus dem Serum spektrophotometrisch exakt zu quantifizieren. Ziel der Etablierungsarbeit war es somit, ein Serum-Ausgangsvolumen für das Mikroarrayverfahren zu wählen, aus der eine ausreichende Menge an RNA für das Verfahren isoliert und einkonzentriert werden kann. Humanes Serum jedoch hat eine komplexe makromolekulare Komposition und es ist nicht zu verhindern, dass „Fremdkomponenten“ aus dem Serum in das RNA-Eluat gelangen. Somit gilt es bei einem Einkonzentrierungsverfahren zu prüfen, ob eine mögliche parallele Anreicherung von Kontaminanten aus dem Serum inhibitorisch auf enzymbasierte Detektionsassays, wie z.B. auf die Microarrayanalyse oder die qRT-PCR, wirkt. Da das Anfertigen einer Serie von „Test-Microarrays“ aus finanziellen Aspekten nicht möglich war, wurde die qRT-PCR basierte miR-16 Detektion als repräsentatives enzymatisches Verfahren ausgewählt. Durch Einkonzentrierung konnte ein Zugewinn an miR-16 Signal gezeigt werden, jedoch war der beobachtete Faktor an Signalzugewinn nach Aufkonzentrierung weitaus geringer, als der korrespondierende Einkonzentrierungsfaktor. Diese Diskrepanz war bei einer Serumausgangsmenge von 600 µl noch etwas stärker ausgeprägt als bei einer Ausgangsmenge von 400 µl. Grundsätzlich könnte dies ein Hinweis sein, dass schon bei einer Einkonzentrierung von 400 µl Serum eine kritische Konzentration von PCR inhibierenden molekularen Komponenten erreicht wird, die bei einer Einkonzentrierung von 600 µl noch einmal übertroffen wird. Jedoch konnte anhand dieses Pilotversuches nicht eingeschätzt werden, inwieweit es im Rahmen der vollständigen Einkonzentrierung des Eluates und der nachfolgenden Resuspendierung im Minimalvolumen von 2 µl zu RNA Verlusten gekommen ist, was wiederum eine verminderte Amplifikationseffizienz vortäuschen könnte. Angesichts dieser argumentativen Basis und angesichts der ansonsten technisch einwandfrei verlaufenen PCR-Reaktionen aus einkonzentriertem Eluat, wurde ein Serum-Ausgangsvolumen von 600 µl für die Microarrayanalyse gewählt.

### 4.3.2 Etablierung einer Spike-In Normalisierung

Für das Spike-In basierte Normalisierungsverfahren wurde die *C. elegans* spezifische syn-cel-miR-54 Sequenz ausgewählt, da diese im humanen Genom nicht vertreten ist und gemäß Literatur auch keine Kreuzhybridisierung mit humanen miRNA Sequenzen zeigen sollte (Mitchell et al., 2008). Dieser Sachverhalt konnte experimentell verifiziert werden. In den getesteten nativen Humanseren wurde keine messbare Expression bzw. lediglich ein marginales Hintergrundsignal im Assay-bedingten „Rauschbereich“ beobachtet. Im Versuch zur Thermostabilität konnte gezeigt werden, dass eine syn-cel-miR-54 Lösung bei verwendeter molarer Konzentration von 5 fmol/ $\mu$ l bei RT über einen getesteten Zeitraum von 15 h keinen nennenswerten Signalverlust aufweist. Dies stellte eine sehr wichtige Erkenntnis für das Spike-In Konzept dar. Die gleichförmige Applikation einer stabilen Spike-In Sequenz über alle zu analysierenden Proben hinweg, ist die wichtigste Grundvoraussetzung für ein adäquates Normalisierungsverfahren, da schon kleinste Schwankungen im „Spike-Input“ einen Störfaktor darstellen.

Zirkulierende RNA aus dem Serum ist sehr niedrig konzentriert, so dass eine akkurate spektrophotometrische Quantifizierung nicht möglich ist. In diesem Sinne ist die Aufreinigung von RNA aus konstanten Serum-Inputvolumina ein erster Schritt für vergleichbare Versuchsbedingungen. Jedoch auch bei Verarbeitung gleicher Serumvolumina unterliegt die miRNA-Quantifizierung einer Vielzahl technischer Störvariablen, die z.B. im Rahmen der Aufreinigung oder der qRT-PCR auftreten. Die Aufreinigungseffizienz stellt in diesem Zusammenhang eine maßgebliche Störvariable dar und kann sowohl durch den Experimentator, als auch durch die individuelle makromolekulare Komposition im Serum sowie durch weitere unbekannte Parameter negativ beeinflusst werden. Dieses Problem sollte durch die zu etablierende Spike-In Normalisierung gelöst werden. Eine der wichtigsten Voraussetzungen für dieses Verfahren war jedoch, dass die Spike-In Sequenz eine vergleichbare Aufreinigungsdynamik zu endogenen miRNA aufwies und dass das Spike-In Signal sensitiv auf Schwankungen der Aufreinigungseffizienz reagierte. Folglich wurde ein Experiment konzipiert, in dem RNA-Präparationen mit simulierten Aufreinigungseffizienz-Schwankungen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass das syn-cel-miR-54 Signal nahezu exakt mit der Aufreinigungseffizienz korrelierte. Lediglich bei einer Aufreinigungseffizienz von 50% wurde eine leichte Diskrepanz beobachtet. Beachtete man die miR-16 Expression als endogene Kontrolle, so fiel auf, dass hier

bei 50% Aufreinigungseffizienz auch nur etwa 36% Signal gemessen wurde. Dies könnte sich dadurch erklären, dass wir in unserem Modellsystem durch die kontrollierte Abnahme der aquatischen Phase nur einen einzigen Parameter veränderten und die Aufreinigungseffizienz noch von weiteren unbekanntem Parametern abhängen kann, die aber durch das Spike-In Signal kontrolliert werden sollten. Bei 90% Aufreinigungseffizienz zeigte sich eine leichte Diskrepanz zwischen syn-cel-miR-54 Signal und miR-16 Signal. Dies wird auf eine Assay bedingte Messschwankung zurückzuführen sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass syn-cel-miR-54 keine nennenswerte Basalexpression im Humanserum aufweist und ausreichende Thermostabilität unter Assaybedingungen besitzt. Ferner zeigte syn-cel-miR-54 vergleichbare Aufreinigungsdynamik mit endogenen miRNA und reagierte sensitiv auf Schwankungen in der Aufreinigungseffizienz von nur 10%. Ergänzend zu diesen Beobachtungen konnte durch die Kooperationsgruppe von Prof. Dr. Hahn parallel gezeigt werden, dass sich das syn-cel-miR-54 Signal bei verwendeter molarer Konzentration des Spike-In stets im linearen Amplifikationsbereich des Detektionsassays befand (Baraniskin et al., 2012). Gemäß diesen Befunden wurde syn-cel-miR-54 als tauglich für das geplante Normalisierungsverfahren erachtet.

#### **4.3.3 Nomenklatur und Assay-Kreuzreaktivität der microRNA-1246**

Im Gegensatz zu bisherigen Studien, die miR-1246 im Kontext des Mamakarzinoms sowie im Kontext weiterer gastrointestinaler Malignome untersuchten (Pigati et al., 2010; Bansal et al., 2011; Piepoli et al., 2012), konnte im Rahmen einer Analyse durch Prof. Dr. Hahn, die während der experimentellen Phase dieser Dissertation initiiert wurde, eine starke Kreuzreaktivität des miR-1246 Detektionsassays mit RNU2-1 Fragmenten in der Zirkulation gezeigt werden. Es wurde festgestellt, dass es sich bei miR-1246 mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Pseudo-miRNA handelt, die nicht in humanen Zellen exprimiert wird (Baraniskin et al., 2012). Dies ist in Übereinstimmung mit einer aktuellen Untersuchung, die sich mit Sequenzüberschneidungen zwischen snRNA und pre-miRNA bzw. entsprechend fehlgeleiteter Nomenklatur beschäftigt. Im Rahmen dieser Analyse wurde bereits postuliert, dass die mature miR-1246 Sequenz vollständig in der RNU2-1 Sequenz enthalten ist (Guo et al., 2011). Auf Grund analoger gelelektrophoretischer Befunde im Rahmen von Gewebe- und Serumanalysen der hier untersuchten Ovarialkarzinompatientinnen war diese Erkenntnis auf die ak-

tuelle Untersuchung zum Ovarialkarzinom übertragbar und die Nomenklatur wurde entsprechend angepasst.

#### **4.3.4 Klinische Relevanz zirkulierender RNU2-1f**

Im Rahmen der hier präsentierten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass RNU2-1f in der Zirkulation von Ovarialkarzinompatientinnen signifikant hochreguliert war. Im weiteren Verlauf konnte die klinische Relevanz der RNU2-1f Expression bestätigt werden. In diesem Zusammenhang wurde eine Assoziation mit dem FIGO-Stadium und der residuellen Tumorlast beschrieben. Ferner erwies sich die RNU2-1f Expressionsveränderung im Zuge der Therapie als prognostisch signifikant. Interessanterweise konnte die Kooperationsgruppe um Prof. Dr. Hahn im Vorfeld zeigen, dass RNU2-1f auch als Tumormarker für gastrointestinale Malignome fungieren kann. RNU2-1f wurde im Serum von Kolon- und Pankreaskarzinompatienten ebenfalls als signifikant hochreguliert identifiziert und ermöglichte eine Diskriminierung von Tumorpatienten und Normalspendern mit einer Sensitivität von 97,7% und einer Spezifität von 90,6% (Baraniskin et al., 2012). In der vorliegenden Untersuchung zum Ovarialkarzinom jedoch zeigte RNU2-1f zum Zeitpunkt der Primärdiagnose eine limitierte diagnostische Kapazität, was prinzipiell nicht für die Eignung von RNU2-1f als Screeningmarker für das Ovarialkarzinom spricht.

RNU2-1f-Werte im Serum der Patientinnen mit fortgeschrittener Tumorerkrankung waren gegenüber Patientinnen mit lokal begrenzter Erkrankung signifikant erhöht. Diese Beobachtung ist vergleichbar mit den vorausgegangenen Untersuchungen im Rahmen gastrointestinaler Tumoren (Baraniskin et al., 2012) und lässt vermuten, dass eine Korrelation zwischen der RNU2-1f Konzentration im Serum und dem Tumorstadium wohlmöglich ein generelles Charakteristikum dieser zirkulierenden RNA-Fragmente sein mag. Komplementär zu dieser Beobachtung zeigte sich auch im ovariellen Primärtumor ein tendenziell höheres RNU2-1 Signal als im gesunden Gewebe, was jedoch auf Grund der geringen Patientinnenzahl noch keine statistisch fundierte Aussage erlaubte. Insgesamt deuten diese Befunde aber darauf hin, dass der Zuegewinn an RNU2-1f Signal im Blut der Ovarialkarzinompatientinnen, zumindest zu einem gewissen Anteil, auf die Tumormasse zurückzuführen sein mag. Diese Hypothese wird ebenfalls durch die Beobachtung unterstützt, dass Patientinnen mit verbleibendem Tumorrest nach Operation häufiger einen positiven RNU2-1f Score nach Chemotherapie aufwiesen als Patientinnen mit einer R0-Resektion. Jedoch sind die-

se beiden Parameter nicht direkt vergleichbar. Man würde in diesem Kontext einen RNU2-1f Messpunkt direkt nach Operation des Tumors benötigen um zu beurteilen, inwieweit das RNU2-1f Signal ein direktes Korrelat zur chirurgischen Entfernung bzw. Verminderung der Tumormasse darstellt. Ebenfalls sollte angemerkt werden, dass reaktives Tumorstroma in der Tumorumgebung oder Blutzellen als ergänzender möglicher Ursprung aktuell nicht ausgeschlossen werden können.

Abgesehen von Patientinnen, die durchgehend RNU2-1f negativ waren, oder Patientinnen, die nach vollendeter Chemotherapie diagnostisch-negativ wurden, konnte in dieser Arbeit eine Subgruppe identifiziert werden, die entweder persistierende RNU2-1f Positivität aufwies, oder nach Chemotherapie „neuerlich“ RNU2-1f Positivität erwarb. Interessanterweise zeichnete sich diese Patientinnengruppe tendenziell durch ein verkürztes OS aus. Diese Beobachtung befand sich jedoch an der Grenze zur statistischen Signifikanz (Log-rank (Mantel-Cox) Test:  $p = 0,056$ ; Gehan-Breslow-Wilcoxon Test:  $p = 0,042$ ). Somit wird an dieser Stelle eine weitere prospektive Akquisition und Evaluierung von Serumproben in Bezug auf die RNU2-1f Expressionsveränderung notwendig sein, um eine statistisch fundierte Aussage zu treffen. Trotz anfänglich gut ausgeprägter Sensitivität gegenüber platinbasierter Chemotherapie, wird jedoch bei mehr als der Hälfte der Ovarialkarzinompatientinnen die Entwicklung eines Rezidivs erwartet (Bookman, 1999; Martin and Schilder, 2009). Angesichts dieser klinischen Situation und der hier beobachteten Tendenz könnte die Beurteilung der RNU2-1f Expression zum Zeitpunkt der Primärdiagnose sowie korrespondierend nach Chemotherapie einen entscheidenden Beitrag im Sinne eines Therapiemonitoring, liefern. Die Messung des RNU2-1f Score könnte bei einer Stratifizierung von Patientinnen helfen eine Subgruppe mit hohem Rezidivrisiko und schlechter Prognose zu identifizieren. Möglicherweise sind es genau diese Patientinnen, die von einem zusätzlichen therapeutischen Konzept, wie z.B. einer Erhaltungstherapie direkt nach Chemotherapie, profitieren könnten. Persistierende oder „neuerlich“ erworbene RNU2-1f Positivität nach vollendeter Chemotherapie könnte durch Zellen aus residuellem reaktivem Tumorstroma oder okkulten mikrometastatischen Tumorzellen, wie etwa ZTZ, verursacht werden. Möglicherweise sind dies platinresistente Zellen, die im Zuge der zytotoxischen Therapie persistieren bzw. sich unter Therapie neu entwickeln. Anhand der vorliegenden Pilotdaten kann jedoch noch nicht beurteilt werden, inwieweit RNU2-1f ein Korrelat zur Platinresistenz gemäß klinischer Definition dar-

stellt, da die Anzahl resistenter Patientinnen (9/91, 10%) zu gering war, um eine statistisch fundierte Aussage zu treffen.

#### **4.3.5 Weiterführende Charakterisierung zirkulierender RNU2-1f**

Zirkulierende miRNA, bislang die am meisten beschriebene Subgruppe der nicht kodierenden RNA-Sequenzen, liegt in der Zirkulation in einer sehr stabilen Form vor und ist äußerst resistent gegenüber endogener RNase Aktivität im Blut (Mitchell et al., 2008). Für einen Großteil der miRNA wurde diese Stabilität auf eine direkte Assoziation mit Argonaute2 Proteinen in der Zirkulation zurückgeführt (Arroyo et al., 2011). RNU2-1f gehört ebenfalls zur Gruppe der nicht kodierenden RNA-Moleküle und ist Teil des sogenannten „Spliceosom“, einem markomolekularen Komplex aus RNA und Proteinen. Dieser Komplex ist aus fünf kleinen nukleären Ribonukleoproteinen (*small nuclear ribonuclear proteins*, snRNP) zusammengesetzt (U1, U2, U4, U5 und U6) und katalysiert den *Splicing*-Prozess von prä-mRNA (Will and Luhrmann, 2001). Im Rahmen früherer Untersuchungen der Kooperationsgruppe konnte gezeigt werden, dass RNU2-1f ebenfalls hohe allgemeine Stabilität im Serum aufweist, vergleichbar mit der einer miRNA und sich zusätzlich noch resistent gegenüber einem Proteaseverdau verhielt (Mitchell et al., 2008; Baraniskin et al., 2012). Diese Daten konnten jedoch nur tendenziell in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Das RNU2-1f Signal verringerte sich unter Proteinase K Einwirkung, jedoch in einem wesentlich geringeren Maße als das Signal der miR-16, die in der Literatur als Argonaute2-assoziiert beschrieben wird und somit als „Sensitivkontrolle“ galt (Arroyo et al., 2011). Als „Resistenzkontrolle“ wurde let-7a ausgewählt, die in der Literatur als „Vesicle-Type-miRNA“ diskutiert wird und mit protektiven vesikulären Strukturen, wie z.B. Exosomen assoziiert sein soll (Arroyo et al., 2011). In den untersuchten Normal-spenderseren zeigte zirkulierende let-7a jedoch nur eine sehr schwache endogene Expression mit einem Ct-Wert >30 und es wurde keine Proteaseresistenz beobachtet. Dies könnte mit dem niedrigen basalen Expressionsniveau und daraus resultierenden Messungenauigkeiten erklärt werden. Eine hohe endogene Thermostabilität von RNU2-1f im Humanserum konnte bereits im Rahmen der Kooperationsgruppe gezeigt werden (Baraniskin et al., 2012). Dieses Charakteristikum ist prinzipiell vorteilhaft für die Anwendung dieser snRNA, im Sinne eines blutbasierten Biomarkers. Die zusätzliche Resistenz gegenüber einem Proteinase K Verdau jedoch spricht gegen die Assoziation mit Argonaute2 Proteinen im Serum und impliziert eher eine In-

klusion von RNU2-1f in eine schützende vesikelähnliche Struktur in der Zirkulation. Ausgehend von der Tatsache, dass ovarielle Karzinome generell eine hohe Apoptoseinzidenz aufweisen und dass RNU2-1f ausschließlich in fragmentierter Form im Serum detektiert wurde, könnte man vermuten, dass RNU2-1f im Zuge der apoptotischen zellulären Degradation von U2 snRNP in das Blut gelangt (Liu et al., 2002). In diesem Zusammenhang erscheint eine Inklusion von RNU2-1f in sogenannte „*apoptotic bodies*“ als mögliche Erklärung, da diese Strukturen nachgewiesenen U2 snRNA enthalten und im Tumorgewebe durch ein verändertes kapillares Netzwerk in das Blut gelangen (Biggiogera et al., 1997; Halicka et al., 2000). Ferner wurde auf Zellkulturebene gezeigt, dass eine Apoptoseinduktion zu einer vermehrten Abgabe von RNU2-1f in das Kulturmedium führt (Baraniskin et al., 2012). An dieser Stelle sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um den molekularen Mechanismus der zellulären Prozessierung von RNU2-1 und dessen Übergang in die Zirkulation im Detail zu verstehen.

#### **4.3.6 Fazit der blutbasierten microRNA-Analyse**

Nach unserem Wissen ist dies die erste Beschreibung einer nicht kodierenden RNA, die als blutbasierter Biomarker für das Ovarialkarzinom fungieren könnte. Die vorliegende Pilotuntersuchung bildet Grundlage für die weitere Evaluierung von RNU2-1f im Rahmen der Konzeption prospektiver Studien in großen Patientinnenkollektiven. In diesem Zusammenhang wird es von großem Interesse sein, ob Patientinnen mit persistierender oder „neuerlich“ erworbener RNU2-1f Positivität nach Chemotherapie von einem zusätzlichen Therapiekonzept bzw. einer Erhaltungstherapie profitieren können und somit ihre Prognose optimiert werden kann. Im Weiteren ist geplant, die Expressionsdynamik von RNU2-1f im direkten Verlauf der Chemotherapie sowie im Zuge eines zeitlich hoch auflösenden Verlaufs zu charakterisieren. Diese Ansätze könnten helfen zu verstehen, ob RNU2-1f prädiktiv für die Platinresistenz des Ovarialkarzinoms ist. Ebenfalls wird es von großem Interesse sein, den Ursprung zirkulierender RNU2-1f zu erkunden und zu untersuchen, ob die kumulative Abgabe von RNU2-1f in die Zirkulation von Tumorpatientinnen einen unspezifischen Effekt im Zuge apoptotischer Degradation darstellt, oder ob dieses Phänomen funktionell mit einem tumorbiologisch relevanten Signalweg assoziiert ist, welcher Grundlage für die Etablierung einer neuen zielgerichteten Therapie darstellen könnte.

## 4.4 Nachweis und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen

### 4.4.1 Charakterisierung der ERCC1-Expression in zirkulierenden Tumorzellen

Die ERCC1-Analysen erfolgten mit der Intention die Hypothese zu überprüfen, inwieweit der bereits beschriebene prognostisch-negative Einfluss von ZTZ im Blut der Ovarialkarzinompatientinnen möglicherweise mit einem platinresistenzassoziierten Phänotyp dieser Zellen in Verbindung stand. ERCC1-Transkripte wurden bei 30% der Patientinnen beobachtet, die keine ZTZ im Blut zeigten. Ferner erwies sich die ERCC1-Positivität nicht als prädiktiv für das Vorliegen einer klinisch definierten Platinresistenz, jedoch identifizierte das Auftreten persistierender ERCC1-Positivität vor Operation bzw. nach Chemotherapie eine Patientinnengruppe mit einem signifikant verkürzten DFS und OS.

Durch vorausgegangene Untersuchungen zum Ovarialkarzinom konnte durch die Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Präsenz von ZTZ im Blut, gemäß *AdnaTest BreastCancer*, inklusive separater Analyse von CA 125, vor Operation sowie nach Chemotherapie prädiktiv für ein verkürztes OS war (Aktas et al., 2011). Dieser Zusammenhang konnte auch im vorliegenden Kollektiv bestätigt werden. Ergänzend wurde gezeigt, dass die Präsenz von ZTZ nach Chemotherapie zusätzlich mit einem verkürzten DFS assoziiert war, was den potentiellen klinischen Nutzen der ZTZ-Detektion im Sinne eines nicht invasiven Therapiemonitoring für das Ovarialkarzinom verdeutlicht. Interessanterweise wurde bei 30% der ZTZ-negativen Patientengruppe ERCC1-Positivität beobachtet. Dieser Befund unterstützt die bereits postulierte Hypothese, dass ZTZ im Blut allgemein eine sehr heterogene Gruppe darstellen (Siewerts et al., 2009; Konigsberg et al., 2011). In diesem Sinne könnte eine implementierte Analyse von ERCC1 in ZTZ eine sinnvolle Ergänzung zu dem bisherigen Marker-Panel von *AdnaTest OvarianCancer* darstellen, mit der Option, noch eine zusätzliche ERCC1-exprimierende ZTZ-Subpopulation zu detektieren.

In der vorliegenden Untersuchung konnte ferner keine Assoziation zwischen der ERCC1-Positivität und einer Platinresistenz gemäß klinischer Definition beobachtet werden. Resistenz gegenüber platinbasierter Chemotherapie kann durch eine erhöhte Toleranz von Platinaddukten oder einer gesteigerten DNA-Reparatur Kapazität begünstigt werden (Johnson et al., 1980). Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) gilt in diesem Zusammenhang als zentraler Mechanismus zur Entfernung von DNA-

Platinaddukten. ERCC1 kodiert für eine Endonuklease, die ein obligates Heterodimer mit dem Protein *Xeroderma pigmentosum group A* (XPF) ausbildet und durch 5'-Inzision beschädigter DNA-Bereiche einen essentiellen Faktor für die NER darstellt (Sijbers et al., 1996; Bessho et al., 1997; Houtsmuller et al., 1999). Gewebebasierte Untersuchungen konnten bereits die klinische Relevanz der ERCC1-Expression zeigen. Im Rahmen des Ovarialkarzinoms sowie im Falle des Kolon- oder Lungenkarzinoms konnte ein hohes Level an ERCC1-mRNA im Primärtumor mit einer Resistenz gegenüber platinhaltiger Chemotherapie assoziiert werden (Dabholkar et al., 1994; Shirota et al., 2001; Lord et al., 2002). Auch auf Proteinebene wurde die ERCC1-Expression in ovariellen Tumoren mit der Platinresistenz in Verbindung gebracht (Arora et al., 2010; Scheil-Bertram et al., 2010; Avraam et al., 2011; Milovic-Kovacevic et al., 2011; Xie et al., 2011). Entgegen dieser vorausgegangenen Befunde im ovariellen Tumorgewebe konnte ERCC1 in der vorliegenden Dissertation auf der Ebene der ZTZ nicht als prädiktiver Faktor für klinisch definierte Platinresistenz beschrieben werden. Dieser Befund könnte mit der klinischen Definition eines platinresistenten Tumors zusammenhängen. Diese Definition beschreibt Patientinnen, bei denen die Gesamtheit der diagnostisch erfassbaren Tumormasse, unter platinhaltiger Chemotherapie, progrediert (platinrefraktär), oder bei denen es innerhalb von 5 Monaten nach Behandlung zu dem Auftreten eines Rezidives kommt (platinresistent). Somit beurteilt diese Definition ausschließlich das Ansprechen der diagnostisch erfassbaren Tumormasse und erlaubt keine Aussage über die Platinsensibilität auf der Ebene einzelner ZTZ im Blut. Ferner ist die Biologie eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms sehr komplex bzw. phänotypische Diskordanzen zwischen Primärtumor und korrespondierenden ZTZ, wie bereits für das Mammakarzinom und den HER-2 Status gezeigt, sind nicht auszuschließen (Fehm et al., 2010). Interessanterweise wurde in dieser Arbeit eine persistierende ERCC1-Positivität vor Operation sowie nach Chemotherapie als prädiktiv für ein verkürztes DFS bzw. OS identifiziert. ERCC1 wurde bisher im Kontext des Ovarialkarzinoms ausschließlich im Primärtumor, jedoch noch nicht auf der Ebene von ZTZ im Blut, untersucht. Lediglich im Rahmen des kleinzelligen Lungenkarzinoms wurde in einem Pilotkollektiv von 17 Patientinnen die ERCC1-Expression in ZTZ untersucht und als prädiktiv für ein verkürztes progressionsfreies Überleben beschrieben (Das et al., 2012). Ausgehend von diesen Befunden könnte die Persistenz von ERCC1-positiven ZTZ mit möglicherweise platinresistentem Charakter ein Indikator für schlechte Prognose der Ovarial-

karzinompatientinnen darstellen, als Biomarker im Rahmen eines Therapiemonitoring genutzt werden oder die Notwendigkeit eines Therapiewechsels implizieren.

#### **4.4.2 Nachweis von EMT- bzw. Stammzellmarkern**

Die Präsenz von DTZ im KM wurde häufiger beobachtet (36%) als die Inzidenz von ZTZ im Blut (19%) und die Übereinstimmung zwischen DTZ- und ZTZ-Status stellte sich in der vorliegenden Untersuchung mit 67% als limitiert heraus. Dies könnte prinzipiell darauf hinweisen, dass die Detektion von DTZ im KM ein etwas sensitiveres Verfahren darstellt. Jedoch angesichts der Tatsache, dass die prognostische Relevanz von ZTZ für den Krankheitsverlauf eines Ovarialkarzinoms bereits gezeigt wurde und dass ZTZ im Vergleich zu DTZ eine völlig unterschiedliche Biologie aufweisen mögen, könnte die ZTZ-Detektion relevante ergänzende Information zur KM-Untersuchung liefern (Fehm et al., 2009; Aktas et al., 2011). Ferner wurde erstmalig die Expression von EMT- und Stammzellmarkern in ZTZ von Ovarialkarzinompatientinnen beschrieben. Interessanterweise zeigten, analog zur ERCC1-Untersuchung, Patientinnen, die gemäß *AdnaTest OvarianCancer* als ZTZ-negativ galten, zu 17% Positivität für EMT-, bzw. zu 4% Positivität für stammzellossoziierte Transkripte. Dies wurde zuvor schon im Rahmen des Mammakarzinoms beobachtet (Aktas et al., 2009; Mego et al., 2011; Kasimir-Bauer et al., 2012). In dieser Untersuchung wiesen 18% bzw. 5% der ZTZ-negativen Fälle EMT- bzw. ALDH1-Expression auf. Auch diese Resultate sprechen allgemein für die phänotypische Heterogenität von ZTZ im Blut und implizieren, dass die ergänzende Analyse von EMT- bzw. stammzellossoziierten Transkripten aus klinischer Sicht von essentieller Bedeutung sein mag, da gerade ZTZ mit EMT- oder Stammzellcharakter für Tumorzell dissemination, Rezidiventwicklung und Therapieresistenz verantwortlich sein könnten (Mani et al., 2008; Aktas et al., 2009; Sieuwerts et al., 2009; Konigsberg et al., 2011; Raimondi et al., 2011; Reuben et al., 2011; Kasimir-Bauer et al., 2012; Sampieri and Fodde, 2012). An dieser Stelle sollte man jedoch anmerken, dass die beobachteten EMT- bzw. stammzellossoziierten Transkripte der Ovarialkarzinompatientinnen nicht aus ZTZ stammen können, die den vollständigen Prozess EMT bereits vollzogen haben, sondern eher aus Zellen, die sich in einem intermediären Zustand auf dem Wege dorthin befinden. Diese Subpopulation der ZTZ besitzen demnach noch ein epithelialassoziertes Profil von Oberflächenantigenen, was sie der immunomagnetischen Anreicherung über EpCAM bzw. MUC-1 zugänglich macht, während sie schon beginnen,

EMT- oder stammzellassozierte Gene zu exprimieren. In diesem Zusammenhang ist eine weiterführende Entwicklung des hier zugrunde liegenden Assays geplant, der die Erfassung und molekulare Charakterisierung von EpCAM bzw. MUC-1 negativen ZTZ mit „vollständig“ mesenchymalem Charakter erlauben soll.

#### **4.4.3 Fazit der Untersuchung zirkulierender Tumorzellen im Blut**

Angesichts der phänotypischen Heterogenität von ZTZ könnte durch implementierte Analyse von ERCC1-Transkripten eine zusätzliche Population von ZTZ detektiert werden. Ferner handelt es sich bei ERCC1-positiven ZTZ um potentiell platinresistente Zellen, deren Persistenz im Rahmen eines Therapiemonitoring eine schlechte Prognose der entsprechenden Ovarialkarzinompatientinnen anzeigen könnte. Analog könnte der ergänzende Nachweis von ovariellen ZTZ, die auf dem Wege sind EMT zu vollziehen bzw. stammzellassozierte Marker exprimieren, das Spektrum der ZTZ-Detektion nochmals erweitern. Ferner könnten ZTZ mit Stammzellcharakter, die für Rezidiventwicklung und Therapieversagen verantwortlich sein mögen, eine Option für neue zielgerichtete Therapien eröffnen (Mani et al., 2008; Aktas et al., 2009; Kasimir-Bauer et al., 2012; Sampieri and Fodde, 2012). In diesem Zusammenhang wäre es möglich, z.B. mit Hilfe von RAD001, dem Inhibitor einer stammzellassozierten Signalwegkomponente (mTOR), gezielt gegen stammzellähnliche ZTZ vorzugehen (Mabuchi et al., 2007; Campone et al., 2009).

## 5 Zusammenfassung

Trotz Fortschritten in der Behandlung erleiden mehr als 50% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom ein Rezidiv, wobei 15 % der Fälle platinresistent sind, was meist jedoch nur retrospektiv erkannt wird. In diesem Zusammenhang war Ziel dieser Dissertation, neue primärtumor- sowie blutbasierte Biomarkerkonzepte im Hinblick auf Platinresistenz und Prognose zu etablieren. Dies wurde zunächst im Rahmen einer primärtumorbasierten LOH-Analyse an vier tumorbiologisch relevanten chromosomalen Regionen realisiert. In diesem Zusammenhang erwies sich LOH proximal zum M6P/IGF2R-Lokus als neuer Biomarkerkandidat für die Tumorzell dissemination in das KM. Da Tumorgewebe jedoch nur einmal zum Zeitpunkt der Primärdiagnose zur Verfügung steht und sich nicht für ein Therapiemonitoring eignet, wurden nachfolgend experimentelle Strategien zur Biomarkeridentifikation auf ein blutbasiertes System transferiert. In diesem Sinne wurde die Methodik der primärtumorbasierten LOH-Detektion auf zirDNA im Blutserum der Patientinnen übertragen. Im Rahmen einer zusätzlichen Fraktionierung der zirDNA in HMF bzw. NMF, konnte die Sensitivität der LOH-Detektion deutlich verbessert werden. Des Weiteren zeigte sich nach Chemotherapie eine signifikante Reduktion des zirDNA Gehaltes in der NMF, jedoch nicht in der HMF. Diese Befunde implizierten, dass tumorassoziierte DNA in der Zirkulation vermutlich niedermolekularen Charakter aufweist. Somit könnte die Fraktionierungsmethodik eine selektive Untersuchung tumorassoziierter DNA im Blut erlauben. Ferner wurde LOH am PTEN-Lokus bzw. proximal zum M6P/IGF2R-Lokus als neuer blutbasierte Biomarker für die Tumorzell dissemination in das KM sowie für ein verkürztes OS beschrieben. Ergänzend wurde das Profil zirkulierender miRNA im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen analysiert. In diesem Zusammenhang konnte miR-1246 im Vergleich zu Normalspenderinnen als signifikant hochreguliert identifiziert werden. Interessanterweise wurde während der experimentellen Phase dieser Dissertation durch eine Kooperationsgruppe gezeigt, dass der miR-1246 Detektionsassay eine starke Kreuzreaktivität mit RNU2-1f im Serum aufweist. Somit war das beobachtete miR-1246 Signal mit großer Wahrscheinlichkeit auf RNU2-1f und nicht auf miR-1246 zurückzuführen. Im Weiteren konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der RNU2-1f Expression im Serum und dem FIGO-Stadium bzw. dem verbleibenden Tumorrest nach Operation beschrieben werden. Ferner identifizierte eine persistierende bzw. neu erworbene RNU2-1f Positivität nach Chemotherapie eine

Patientinnengruppe mit tendenziell verkürztem OS. Dies ist die erste Beschreibung einer nicht kodierenden RNA, die als blutbasierter Biomarker für das Ovarialkarzinom fungieren könnte. Abschließend wurde auf die immunomagnetische Isolation bzw. molekulare Charakterisierung intakter ZTZ aus dem Blut fokussiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Präsenz von ZTZ im Blut vor Operation bzw. nach Chemotherapie mit einem verkürzten OS korrelierte. Weiterführend sollte die Hypothese überprüft werden, inwieweit der beobachtete prognostisch-negative Einfluss der ZTZ im Blut auf einen platinresistenzassoziierten Phänotyp dieser Zellen zurückzuführen sein mag. Daher wurde die Expression der DNA-Reparatur Endonuklease ERCC1, die bereits mit Platinsensitivität ovarieller Tumoren in Verbindung gebracht werden konnte, in ZTZ untersucht. ERCC1-Positivität wurde mit einer Inzidenz von 36 % vor Operation und 35% nach Chemotherapie beobachtet, interessanterweise auch in 30% der Patientinnen, die gemäß *AdnaTest OvarianCancer*, als ZTZ-negativ galten. Ein statistischer Zusammenhang zwischen der ERCC1-Expression und klinisch definierter Platinsensitivität ergab sich nicht, jedoch zeigte sich bei Patientinnen mit persistierend ERCC1-positiven ZTZ ein signifikant verkürztes DFS bzw. OS. Diese Befunde sprechen für eine Implementierung von ERCC1 in die ZTZ-Analyse und beschreiben ERCC1 als möglichen klinisch relevanten Biomarker, der Patientinnen mit besonders schlechter Prognose identifizieren könnte bzw. die Notwendigkeit einer Therapieänderung voraussagen mag. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ZTZ von Ovarialkarzinompatientinnen zu etwa 14% EMT- bzw. stammzellassozierte Marker exprimieren. Dies wurde auch bei Patientinnen beobachtet, die gemäß *Adna-Test OvarianCancer* ZTZ-negativ galten, was für die Heterogenität der ZTZ im Blut spricht. Die Detektion sowie das zielgerichtete Vorgehen gegen stammzellähnliche ZTZ könnte von großer klinischer Relevanz sein, da diese ZTZ-Subgruppe bereits mit Therapieversagen und Rezidiventwicklung in Verbindung gebracht wurde.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Dissertation einen relevanten Beitrag zur Etablierung neuer primärtumorbasierter Biomarkerkonzepte für das Ovarialkarzinom liefern und die Hypothese unterstützen, dass Patientinnenblut im Sinne einer „*Real-Time-Liquid-Biopsy*“ genutzt werden könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. 2005. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 11:1154-1159.
- Aguirre-Ghiso JA. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7:834-846.
- Aktas B, Kasimir-Bauer S, Heubner M, Kimmig R, Wimberger P. 2011. Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 21:822-830.
- Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2009. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 11:R46.
- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. 2003. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* 13:807-818.
- Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcahy HE, Farthing MJ. 1997. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 112:1114-1120.
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. 1999. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 18:65-73.
- Arai N, Mitomi H, Ohtani Y, Igarashi M, Kakita A, Okayasu I. 1999. Enhanced epithelial cell turnover associated with p53 accumulation and high p21WAF1/CIP1 expression in ulcerative colitis. *Mod Pathol* 12:604-611.
- Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM. 2010. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)* 9:745-753.

- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5003-5008.
- Avraam K, Pavlakis K, Papadimitriou C, Vrekoussis T, Panoskaltsis T, Messini I, Patsouris E. 2011. The prognostic and predictive value of ERCC-1, p53, bcl-2 and bax in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 32:516-520.
- Bansal A, Lee IH, Hong X, Anand V, Mathur SC, Gaddam S, Rastogi A, Wani SB, Gupta N, Visvanathan M, Sharma P, Christenson LK. 2011. Feasibility of microRNAs as biomarkers for Barrett's Esophagus progression: a pilot cross-sectional, phase 2 biomarker study. *Am J Gastroenterol* 106:1055-1063.
- Banys M, Solomayer EF, Becker S, Krawczyk N, Gardanis K, Staebler A, Neubauer H, Wallwiener D, Fehm T. 2009. Disseminated tumor cells in bone marrow may affect prognosis of patients with gynecologic malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 19:948-952.
- Baraniskin A, Nopel-Dunnebacke S, Ahrens M, Jensen SG, Zollner H, Maghnouj A, Wos A, Mayerle J, Munding J, Kost D, Reinacher-Schick A, Liffers S, Schroers R, Chromik AM, Meyer HE, Uhl W, Klein-Scory S, Weiss FU, Stephan C, Schwarte-Waldhoff I, Lerch MM, Tannapfel A, Schmiegel W, Andersen CL, Hahn SA. 2012. Circulating U2 small nuclear RNA fragments as a novel diagnostic biomarker for pancreatic and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. *Epub ahead of print.*
- Barkan D, Kleinman H, Simmons JL, Asmussen H, Kamaraju AK, Hoehorhoff MJ, Liu ZY, Costes SV, Cho EH, Lockett S, Khanna C, Chambers AF, Green JE. 2008. Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Res* 68:6241-6250.
- Berek J, Taylor P, McGuire W, Smith LM, Schultes B, Nicodemus CF. 2009. Oregovomab maintenance monoimmunotherapy does not improve outcomes in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 27:418-425.

- Bessho T, Sancar A, Thompson LH, Thelen MP. 1997. Reconstitution of human excision nuclease with recombinant XPF-ERCC1 complex. *J Biol Chem* 272:3833-3837.
- Biggiogera M, Bottone MG, Martin TE, Uchiumi T, Pellicciari. 1997. Still immunodetectable nuclear RNPs are extruded from the cytoplasm of spontaneously apoptotic thymocytes. *Exp Cell Res* 234:512-520.
- Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. 2001. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14428-14433.
- Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. 1997. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 33:1075-1107.
- Bookman MA. 1999. Extending the platinum-free interval in recurrent ovarian cancer: the role of topotecan in second-line chemotherapy. *Oncologist* 4:87-94.
- Boren T, Xiong Y, Hakam A, Wenham R, Apte S, Chan G, Kamath SG, Chen DT, Dressman H, Lancaster JM. 2009. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with ovarian cancer response to chemotherapy. *Gynecol Oncol* 113:249-255.
- Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, Diel I, Solomayer EF, Theocharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder E, Marolleau JP, Garcia J, Pantel K. 1999. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* 1:377-388.
- Bragado P, Sosa MS, Keely P, Condeelis J, Aguirre-Ghiso JA. 2012. Microenvironments dictating tumor cell dormancy. *Recent Results Cancer Res* 195:25-39.
- Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. 2010. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 9:306.

- Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, Janni W, Kentenich C, Riethmuller G, Pantel K. 2001. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol* 19:368-375.
- Bremnes RM, Sirera R, Camps C. 2005. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 49:1-12.
- Brown J, Delaine C, Zaccheo OJ, Siebold C, Gilbert RJ, van Boxel G, Denley A, Wallace JC, Hassan AB, Forbes BE, Jones EY. 2008. Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction. *EMBO J* 27:265-276.
- Brown MR, Chuaqui R, Vocke CD, Berchuck A, Middleton LP, Emmert-Buck MR, Kohn EC. 1999. Allelic loss on chromosome arm 8p: analysis of sporadic epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 74:98-102.
- Brozek I, Ochman K, Debniak J, Morzuch L, Ratajska M, Stepnowska M, Stukan M, Emerich J, Limon J. 2009. Loss of heterozygosity at BRCA1/2 loci in hereditary and sporadic ovarian cancers. *J Appl Genet* 50:379-384.
- Burger RA, Sill MW, Monk BJ, Greer BE, Sorosky JI. 2007. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 25:5165-5171.
- Burges A, Wimberger P, Kumper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B, Pfisterer J, Lichinitser M, Makhson A, Moiseyenko V, Lahr A, Schulze E, Jager M, Strohlein MA, Heiss MM, Gottwald T, Lindhofer H, Kimmig R. 2007. Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study. *Clin Cancer Res* 13:3899-3905.
- Byrom J, Mudaliar V, Redman CW, Jones P, Strange RC, Hoban PR. 2004. Loss of heterozygosity at chromosome 9q22-31 is a frequent and early event in ovarian tumors. *Int J Oncol* 24:1271-1277.

- Campone M, Levy V, Bourbouloux E, Berton Rigaud D, Bootle D, Dutreix C, Zoellner U, Shand N, Calvo F, Raymond E. 2009. Safety and pharmacokinetics of paclitaxel and the oral mTOR inhibitor everolimus in advanced solid tumours. *Br J Cancer* 100:315-321.
- Cannistra SA. 1993. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 329:1550-1559.
- Carpagnano GE, Spanevello A, Carpagnano F, Palladino GP, Prato R, Martinelli D, Digiioia G, Foschino-Barbaro MP. 2009. Prognostic value of exhaled microsatellite alterations at 3p in NSCLC patients. *Lung Cancer* 64:334-340.
- Chan JK, Cheung MK, Husain A, Teng NN, West D, Whittemore AS, Berek JS, Osann K. 2006. Patterns and progress in ovarian cancer over 14 years. *Obstet Gynecol* 108:521-528.
- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. 1996. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 2:1033-1035.
- Choi JJ, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. 2005. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* 115:55-62.
- Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, Lecomte T, Lacourreye O, Brasnu D, Beaune P, Zucman J, Laurent-Puig P. 2000. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res* 60:707-711.
- Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. 1994. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 94:703-708.
- Das M, Riess JW, Frankel P, Schwartz E, Bennis R, Hsieh HB, Liu X, Ly JC, Zhou L, Nieva JJ, Wakelee HA, Bruce RH. 2012. ERCC1 expression in circulating tumor cells (CTCs) using a novel detection platform correlates with progression-free survival (PFS) in patients with metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) receiving platinum chemotherapy. *Lung Cancer* 77:421-426.
- De Souza AT, Yamada T, Mills JJ, Jirtle RL. 1997. Imprinted genes in liver carcinogenesis. *FASEB J* 11:60-67.

- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Jr., Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. 2005. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16368-16373.
- Ding H, Liao G, Wang H, Zhou Y. 2007. Asymmetrically designed siRNAs and shRNAs enhance the strand specificity and efficacy in RNAi. *J RNAi Gene Silencing* 4:269-280.
- du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall-Lundqvist E, Bookman M, Bowtell D, Brady M, Casado A, Cervantes A, Eisenhauer E, Friedlaender M, Fujiwara K, Grenman S, Guastalla JP, Harper P, Hogberg T, Kaye S, Kitchener H, Kristensen G, Mannel R, Meier W, Miller B, Neijt JP, Oza A, Ozols R, Parmar M, Pecorelli S, Pfisterer J, Poveda A, Provencher D, Pujade-Lauraine E, Randall M, Rochon J, Rustin G, Sagae S, Stehman F, Stuart G, Trimble E, Vasey P, Vergote I, Verheijen R, Wagner U. 2005. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCC 2004). *Ann Oncol* 16 Suppl 8:viii7-viii12.
- du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. 2009. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 115:1234-1244.
- du Bois A, Schlaich M, Luck HJ, Mollenkopf A, Wechsel U, Rauchholz M, Bauknecht T, Meerpohl HG. 1999. Evaluation of neurotoxicity induced by paclitaxel second-line chemotherapy. *Support Care Cancer* 7:354-361.
- Eccles DM, Russell SE, Haites NE, Atkinson R, Bell DW, Gruber L, Hickey I, Kelly K, Kitchener H, Leonard R, et al. 1992. Early loss of heterozygosity on 17q in ovarian cancer. The Abe Ovarian Cancer Genetics Group. *Oncogene* 7:2069-2072.

- Ehlen TG, Hoskins PJ, Miller D, Whiteside TL, Nicodemus CF, Schultes BC, Swenerton KD. 2005. A pilot phase 2 study of oregovomab murine monoclonal antibody to CA125 as an immunotherapeutic agent for recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 15:1023-1034.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269.
- Fehm T, Becker S, Bachmann C, Beck V, Gebauer G, Banys M, Wallwiener D, Solomayer EF. 2006. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol* 103:942-947.
- Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, Schindlbeck C, Wallwiener D, Borgen E, Naume B, Pantel K, Solomayer E. 2006. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 107:885-892.
- Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2009. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res* 11:R59.
- Fehm T, Muller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, Lattrich C, Lohberg CR, Solomayer E, Rack B, Riethdorf S, Klein C, Schindlbeck C, Brocker K, Kasimir-Bauer S, Wallwiener D, Pantel K. 2010. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat* 124:403-412.
- Fleischhacker M, Schmidt B. 2007. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775:181-232.
- Foulkes WD, Black DM, Stamp GW, Solomon E, Trowsdale J. 1993. Very frequent loss of heterozygosity throughout chromosome 17 in sporadic ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 54:220-225.
- Fryer JP, Oetting WS, Brott MJ, King RA. 2001. Alternative splicing of the tyrosinase gene transcript in normal human melanocytes and lymphocytes. *J Invest Dermatol* 117:1261-1265.

- Gahan PB, Swaminathan R. 2008. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Ann N Y Acad Sci* 1137:1-6.
- Gallion HH, Pieretti M, DePriest PD, van Nagell JR, Jr. 1995. The molecular basis of ovarian cancer. *Cancer* 76:1992-1997.
- Garcia-Olmo DC, Dominguez C, Garcia-Arranz M, Anker P, Stroun M, Garcia-Verdugo JM, Garcia-Olmo D. 2010. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* 70:560-567.
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. 2004. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 64:3014-3021.
- Gonzalez R, Silva JM, Sanchez A, Dominguez G, Garcia JM, Chen XQ, Stroun M, Provencio M, Espana P, Anker P, Bonilla F. 2000. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. *Ann Oncol* 11:1097-1104.
- Guo L, Liang T, Gu W, Xu Y, Bai Y, Lu Z. 2011. Cross-mapping events in miRNAs reveal potential miRNA-mimics and evolutionary implications. *PLoS One* 6:e20517.
- Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. 2000. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 260:248-256.
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250:1684-1689.
- Hamana K, Uzawa K, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. 2005. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 92:2181-2184.

- Hasselmann DO, Rappl G, Rossler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. 2001. Detection of tumor-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma. *Oncol Rep* 8:115-118.
- Hibi K, Robinson CR, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D, Jen J. 1998. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res* 58:1405-1407.
- Hickey KP, Boyle KP, Jepps HM, Andrew AC, Buxton EJ, Burns PA. 1999. Molecular detection of tumour DNA in serum and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 80:1803-1808.
- Ho CM, Lin MC, Huang SH, Huang CJ, Lai HC, Chien TY, Chang SF. 2009. PTEN promoter methylation and LOH of 10q22-23 locus in PTEN expression of ovarian clear cell adenocarcinomas. *Gynecol Oncol* 112:307-313.
- Hofmann W, Schlag PM. 2000. BRCA1 and BRCA2--breast cancer susceptibility genes. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:487-496.
- Hogdall EV, Ryan A, Kjaer SK, Blaakaer J, Christensen L, Bock JE, Glud E, Jacobs IJ, Hogdall CK. 2004. Loss of heterozygosity on the X chromosome is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma: from the Danish "MALOVA" Ovarian Carcinoma Study. *Cancer* 100:2387-2395.
- Houtsmuller AB, Rademakers S, Nigg AL, Hoogstraten D, Hoeijmakers JH, Vermeulen W. 1999. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* 284:958-961.
- Hu X, Macdonald DM, Huettner PC, Feng Z, El Naqa IM, Schwarz JK, Mutch DG, Grigsby PW, Powell SN, Wang X. 2009. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 114:457-464.
- Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR. 1998. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 58:1120-1123.
- Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM. 2007. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67:8699-8707.

- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61:1659-1665.
- Johnson NP, Hoeschele JD, Rahn RO. 1980. Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chem Biol Interact* 30:151-169.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420-1428.
- Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. 2012. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 14:R15.
- Konigsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, de Santis M, Zeillinger R, Hudc M, Dittrich C. 2011. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol* 50:700-710.
- Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, Gocke CD. 1997. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 76:1293-1299.
- Kozlowski L, Filipowski T, Rucinska M, Pepinski W, Janica J, Skawronska M, Poznanski J, Wojtukiewicz MZ. 2006. Loss of heterozygosity on chromosomes 2p, 3p, 18q21.3 and 11p15.5 as a poor prognostic factor in stage II and III (FIGO) cervical cancer treated by radiotherapy. *Neoplasma* 53:440-443.
- Kuhlmann JD, Rasch J, Wimberger P, Kasimir-Bauer S. 2012. microRNA and the pathogenesis of ovarian cancer--a new horizon for molecular diagnostics and treatment? *Clin Chem Lab Med* 50:601-615.
- Kuhlmann JD, Schwarzenbach H, Otterbach F, Heubner M, Wimberger P, Worm KH, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2011. Loss of heterozygosity proximal to the M6P/IGF2R locus is predictive for the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow of ovarian cancer patients before and after chemotherapy. *Genes Chromosomes Cancer* 50:598-605.

- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862.
- Lee AV, Hilsenbeck SG, Yee D. 1998. IGF system components as prognostic markers in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 47:295-302.
- Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP. 1999. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99:323-334.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. 1977. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37:646-650.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275:1943-1947.
- Lianidou ES, Markou A. 2012. Molecular assays for the detection and characterization of CTCs. *Recent Results Cancer Res* 195:111-123.
- Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PLM, Wang SI, Zheng ZM, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R. 1997. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genetics* 16:64-67.
- Liu A, Chen L, Ngan HY, Khoo US, Zhao Y, Cheung AN. 2002. Apoptotic and proliferative activity in ovarian benign, borderline and malignant tumors. *Chin Med Sci J* 17:106-111.

- Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, Cardenal F, Sanchez JM, Gumerlock PH, Taron M, Sanchez JJ, Danenberg KD, Danenberg PV, Rosell R. 2002. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 8:2286-2291.
- Mabuchi S, Altomare DA, Connolly DC, Klein-Szanto A, Litwin S, Hoelzle MK, Hensley HH, Hamilton TC, Testa JR. 2007. RAD001 (Everolimus) delays tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer. *Cancer Res* 67:2408-2413.
- Makhija S, Sit A, Edwards R, Aufman K, Weiss H, Kanbour-Shakir A, Gooding W, D'Angelo G, Ferrell R, Raja S, Godfrey TE. 2003. Identification of genetic alterations related to chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 90:3-9.
- Mandel P, Metais P. 1948. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 142:241-243.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-715.
- Marme A, Strauss G, Bastert G, Grischke EM, Moldenhauer G. 2002. Intraperitoneal bispecific antibody (HEA125xOKT3) therapy inhibits malignant ascites production in advanced ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 101:183-189.
- Martin LP, Schilder RJ. 2009. Management of recurrent ovarian carcinoma: current status and future directions. *Semin Oncol* 36:112-125.
- Mego M, De Giorgi U, Dawood S, Wang X, Valero V, Andreopoulou E, Handy B, Ueno NT, Reuben JM, Cristofanilli M. 2011. Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. *Int J Cancer* 129:417-423.
- Milovic-Kovacevic M, Srdic-Rajic T, Radulovic S, Bjelogrljic S, Gavrilovic D. 2011. Expression of ERCC1 protein in biopsy specimen predicts survival in advanced ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *J BUON* 16:708-714.

- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513-10518.
- Muller I, Beeger C, Alix-Panabieres C, Rebillard X, Pantel K, Schwarzenbach H. 2008. Identification of loss of heterozygosity on circulating free DNA in peripheral blood of prostate cancer patients: potential and technical improvements. *Clin Chem* 54:688-696.
- Nakamura T, Sakai T, Nariya S. 1995. Cell death in colorectal polyps as evaluated by in situ 3'-tailing reaction and its relationship to BCL-2 expression. *Pathol Int* 45:721-728.
- Neijt JP, Engelholm SA, Witteveen PO, Tuxen MK, Sorensen PG, Hansen M, Hirsch F, Sessa C, de Swart C, van Houwelingen HC, Lund B, Hansen SW. 1997. Paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup> over 3 hours) with cisplatin or carboplatin in previously untreated ovarian cancer: an interim analysis. *Semin Oncol* 24:S15-36-S15-39.
- Noujaim AA, Schultes BC, Baum RP, Madiyalakan R. 2001. Induction of CA125-specific B and T cell responses in patients injected with MAb-B43.13--evidence for antibody-mediated antigen-processing and presentation of CA125 in vivo. *Cancer Biother Radiopharm* 16:187-203.
- Oates AJ, Schumaker LM, Jenkins SB, Pearce AA, DaCosta SA, Arun B, Ellis MJ. 1998. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. *Breast Cancer Res Treat* 47:269-281.
- Paakkonen K, Sauramo S, Sarantaus L, Vahteristo P, Hartikainen A, Vehmanen P, Ignatius J, Ollikainen V, Kaariainen H, Vauramo E, Nevanlinna H, Krahe R, Holli K, Kere J. 2001. Involvement of BRCA1 and BRCA2 in breast cancer in a western Finnish sub-population. *Genet Epidemiol* 20:239-246.
- Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. 2009. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 6:339-351.

- Pfisterer J, du Bois A, Sehouli J, Loibl S, Reinartz S, Reuss A, Canzler U, Belau A, Jackisch C, Kimmig R, Wollschlaeger K, Heilmann V, Hilpert F. 2006. The anti-idiotypic antibody abagovomab in patients with recurrent ovarian cancer. A phase I trial of the AGO-OVAR. *Ann Oncol* 17:1568-1577.
- Piepoli A, Tavano F, Copetti M, Mazza T, Palumbo O, Panza A, di Mola FF, Paziienza V, Mazzocchi G, Biscaglia G, Gentile A, Mastrodonato N, Carella M, Pellegrini F, di Sebastiano P, Andriulli A. 2012. Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers. *PLoS One* 7:e33663.
- Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. 2010. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 5:e13515.
- Powell SN, Kachnic LA. 2003. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 22:5784-5791.
- Qu H, Xu W, Huang Y, Yang S. 2011. Circulating miRNAs: Promising Biomarkers of Human Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 12:1117-1125.
- Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, Palazzo A, Saltarelli R, Spremberg F, Cortesi E, Gazzaniga P. 2011. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 130:449-455.
- Rawnaq T, Schwarzenbach H, Schurr PG, Freise K, Brandl S, Izbicki JR, Kaifi JT. 2011. Monitoring of loss of heterozygosity in serum microsatellite DNA among patients with gastrointestinal stromal tumors indicates tumor recurrence. *J Surg Res* 169:31-35.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16:1616-1626.
- Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. 2009. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 112:55-59.

- Reuben JM, Lee BN, Gao H, Cohen EN, Mego M, Giordano A, Wang X, Lodhi A, Krishnamurthy S, Hortobagyi GN, Cristofanilli M, Lucci A, Woodward WA. 2011. Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44(+)CD24<sup>lo</sup> cancer stem cell phenotype. *Eur J Cancer* 47:1527-1536.
- Rey JM, Theillet C, Brouillet JP, Rochefort H. 2000. Stable amino-acid sequence of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor in ovarian carcinomas with loss of heterozygosity and in breast-cancer cell lines. *Int J Cancer* 85:466-473.
- Rizzo S, Hersey JM, Mellor P, Dai W, Santos-Silva A, Liber D, Luk L, Titley I, Carden CP, Box G, Hudson DL, Kaye SB, Brown R. 2011. Ovarian cancer stem cell-like side populations are enriched following chemotherapy and overexpress EZH2. *Mol Cancer Ther* 10:325-335.
- Ross AA, Miller GW, Moss TJ, Kahn DG, Warner NE, Sweet DL, Louie KG, Schneidermann E, Pecora AL, Meagher RC, et al. 1995. Immunocytochemical detection of tumor cells in bone marrow and peripheral blood stem cell collections from patients with ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant* 15:929-933.
- Roth C, Pantel K, Muller V, Rack B, Kasimir-Bauer S, Janni W, Schwarzenbach H. 2011. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer* 11:4.
- Sampieri K, Fodde R. 2012. Cancer stem cells and metastasis. *Semin Cancer Biol* 22:187-193.
- Scheil-Bertram S, Tylus-Schaaf P, du Bois A, Harter P, Oppitz M, Ewald-Riegler N, Fisseler-Eckhoff A. 2010. Excision repair cross-complementation group 1 protein overexpression as a predictor of poor survival for high-grade serous ovarian adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 119:325-331.

- Schindlbeck C, Hantschmann P, Zerzer M, Jahns B, Rjosk D, Janni W, Rack B, Sommer H, Friese K. 2007. Prognostic impact of KI67, p53, human epithelial growth factor receptor 2, topoisomerase IIalpha, epidermal growth factor receptor, and nm23 expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow. *Int J Gynecol Cancer* 17:1047-1055.
- Schulte-Hermann R, Bursch W, Grasl-Kraupp B, Torok L, Ellinger A, Mullauer L. 1995. Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol Lett* 82-83:143-148.
- Schwarzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X, Pantel K. 2009. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15:1032-1038.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11:426-437.
- Schwarzenbach H, Muller V, Beeger C, Gottberg M, Stahmann N, Pantel K. 2007. A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 9:R66.
- Schwarzenbach H, Pantel K, Kemper B, Beeger C, Otterbach F, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2009. Comparative evaluation of cell-free tumor DNA in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 11:R71.
- Seidman JD, Kurman RJ. 2003. Pathology of ovarian carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 17:909-925, vii.
- Sharma G, Mirza S, Parshad R, Srivastava A, Datta Gupta S, Pandya P, Ralhan R. 2010. CpG hypomethylation of MDR1 gene in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients. *Clin Biochem* 43:373-379.
- Shinozaki M, O'Day SJ, Kitago M, Amersi F, Kuo C, Kim J, Wang HJ, Hoon DS. 2007. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin Cancer Res* 13:2068-2074.

- Shirota Y, Stoehmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, Groshen S, Tsao-Wei DD, Danenberg PV, Lenz HJ. 2001. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 19:4298-4304.
- Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA. 2009. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 101:61-66.
- Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD. 1996. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* 86:811-822.
- Silva JM, Garcia JM, Dominguez G, Silva J, Miralles C, Cantos B, Coca S, Provencio M, Espana P, Bonilla F. 2002. Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy. *Ann Surg Oncol* 9:71-76.
- Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. 1987. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23:707-712.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. 1989. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46:318-322.
- Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. 2000. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 906:161-168.
- Sunami E, Shinozaki M, Higano CS, Wollman R, Dorff TB, Tucker SJ, Martinez SR, Mizuno R, Singer FR, Hoon DS. 2009. Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients. *Clin Chem* 55:559-567.
- Taylor DD, Gercel-Taylor C. 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110:13-21.

- Tsui NB, Ng EK, Lo YM. 2002. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 48:1647-1653.
- Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK. 2007. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21:744-749.
- Wang M, Block TM, Steel L, Brenner DE, Su YH. 2004. Preferential isolation of fragmented DNA enhances the detection of circulating mutated k-ras DNA. *Clin Chem* 50:211-213.
- Wang Q, Larson PS, Schlechter BL, Zahid N, Finnemore E, de las Morenas A, Blanchard RA, Rosenberg CL. 2003. Loss of heterozygosity in serial plasma DNA samples during follow-up of women with breast cancer. *Int J Cancer* 106:923-929.
- Wang W, Li YF, Sun XW, Chen G, Zhan YQ, Huang CY, Wan DS, Pan ZZ, Zhou ZW. 2010. Correlation analysis between loss of heterozygosity at chromosome 18q and prognosis in the stage-II colon cancer patients. *Chin J Cancer* 29:761-767.
- Weberpals JI, Clark-Knowles KV, Vanderhyden BC. 2008. Sporadic epithelial ovarian cancer: clinical relevance of BRCA1 inhibition in the DNA damage and repair pathway. *J Clin Oncol* 26:3259-3267.
- Will CL, Luhrmann R. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13:290-301.
- Wimberger P, Heubner M, Lindhofer H, Jager M, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2009. Influence of catumaxomab on tumor cells in bone marrow and blood in ovarian cancer. *Anticancer Res* 29:1787-1791.
- Wimberger P, Heubner M, Otterbach F, Fehm T, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2007. Influence of platinum-based chemotherapy on disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 107:331-338.

- Wimberger P, Roth C, Pantel K, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, Schwarzenbach H. 2011. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 128:2572-2580.
- Wood TL, Richert MM, Stull MA, Allar MA. 2000. The insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in postnatal development of murine mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:31-42.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4034-4039.
- Xie C, Yin RT, Li YL, Kang DY, Xu L, Yang KX. 2011. [The protein expression of ERCC1 and survivin in epithelial ovarian carcinoma and their clinical significance]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 42:86-89.
- Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, Wenham RM, Coppola D, Kruk PA, Nicosia SV, Cheng JQ. 2008. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 68:425-433.
- Zeng Y. 2006. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 25:6156-6162.
- Zhang S, Yu D. 2010. PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res* 16:4325-4330.
- Zheng JP, Robinson WR, Ehlen T, Yu MC, Dubeau L. 1991. Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification. *Cancer Res* 51:4045-4051.

# 7 Anhang

## 7.1 Eigene Publikationen

Teilergebnisse aus dieser Dissertation wurden wie folgt publiziert:

### 7.1.1 Internationale Publikationen

Loss of heterozygosity proximal to the M6P/IGF2R locus is predictive for the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow of ovarian cancer patients before and after chemotherapy. **Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Otterbach F, Heubner M, Wimberger P, Worm KH, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Aug;50(8):598-605. doi: 10.1002/gcc.20882.

LOH at 6q and 10q in Fractionated Circulating DNA of Ovarian Cancer Patients is Predictive for Tumor Cell Spread and Reduced Disease-Free and Overall Survival. **Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Wimberger P, Poetsch M, Kimmig R, Sabine Kasimir-Bauer S. *BMC Cancer*. 2012 Jul 31;12(1):325.

microRNA And The Pathogenesis Of Ovarian Cancer – A New Horizon For Molecular Diagnostics And Treatment? Review. **Kuhlmann JD**, Rasch J, Wimberger P, Kasimir-Bauer S. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med*. 2012 Jan 13;50(4):601-15. doi: 10.1515/cclm-2011-0847.

### 7.1.2 Vorträge

**Kuhlmann JD**. Korrelation zwischen dem Verlust der Heterozygotie (LOH) im Primärtumor und disseminierten Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark von Ovarialkarzinompatientinnen vor und nach Chemotherapie. (Vortrag, Winterseminar der medizinischen Fakultät, Universitätsklinikum Essen, Pichl bei Schladming, 2011)

**Kuhlmann JD**. Primärtumor- und Blut-basierte Analyse des Ovarialkarzinoms zur Identifizierung molekularer Biomarker im Hinblick auf Tumorzell dissemination und Prognose. (Vortrag, **persönliche Einladung am Institut für Hämatologie**, Universitätsklinikum Essen, Herr Prof. Dr. med. Ulrich Dührsen, 2011)

**Kuhlmann JD.** LOH 6q und 10q in fraktionierter zirkulierender DNA von Ovarialkarzinompatientinnen ist prädiktiv für die Tumorzellstreuung in das Knochenmark und ein verkürztes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben. (**Vortrag**, Winterseminar der medizinischen Fakultät, Universitätsklinikum Essen, Pichl bei Schlauding, 2012)

**Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Wimberger P, Poetsch M, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. LOH at Chromosomal Band 6q and 10q in Fractionated Circulating DNA of Ovarian Cancer Patients is Predictive for Tumor Cell Spread and Reduced Disease-Free and Overall Survival. (**Vortrag**, TraFo-Symposium der AGO, 2012, Bergisch Gladbach)

### 7.1.3 Posterpräsentationen

**Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Otterbach F, Heubner M, Wimberger P, Worm K, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Korrelation zwischen dem Verlust der Heterozygotie (LOH) und disseminierten Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark von Ovarialkarzinompatientinnen. (Poster, Forschungstag, Universitätsklinikum Essen, 2010)

**Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Wimberger P, Poetsch M, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. LOH at Chromosomal Band 6q and 10q in Fractionated Circulating DNA of Ovarian Cancer Patients is Predictive for Tumor Cell Spread and Reduced Disease-Free and Overall Survival. (Poster, CNAPS Konferenz Madrid, 2011, Abstract publiziert in: Journal of Nucleic Acid Investigation 2011, Volume 2, Supplement 1)

**Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Otterbach F, Heubner M, Wimberger P, Worm KH, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Loss of Heterozygosity Proximal to the M6P/IGF2R Locus is Predictive for the Presence of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Ovarian Cancer Patients Before and After Chemotherapy. (Poster, COMBAT Meeting, München, 2011)

**Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Wimberger P, Poetsch M, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. LOH at Chromosomal Band 6q and 10q in Fractionated Circulating DNA of Ovarian Cancer Patients is Predictive for Tumor Cell Spread and Reduced Disease-Free and Overall Survival. (Poster, COMBAT Meeting, München, 2011)

**Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Otterbach F, Heubner M, Wimberger P, Worm KH, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Loss of Heterozygosity Proximal to the M6P/IGF2R Locus is Predictive for the Presence of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Ovarian Cancer Patients Before and After Chemotherapy. (Poster, Forschungstag, Universitätsklinikum Essen, 2011)

**Kuhlmann JD**, Schwarzenbach H, Otterbach F, Heubner M, Wimberger P, Worm KH, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Loss of Heterozygosity Proximal to the M6P/IGF2R Locus is Predictive for the Presence of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Ovarian Cancer Patients Before and After Chemotherapy. (Poster, TraFo-Symposium der AGO, 2012, Bergisch Gladbach)

**Kuhlmann JD**, Baraniskin A, Hahn S, Mosel F, Wimberger P, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Zirkulierendes U2 small nuclear RNA Fragment als neuer blutbasierter Biomarker für das Ovarialkarzinom. (Poster, Forschungstag, Universitätsklinikum Essen, 2012)

## 7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2009 bis Dezember 2012 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe angefertigt.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kasimir-Bauer, die es mir ermöglicht hat meine Arbeit im Rahmen einer interessanten Thematik und mit bestmöglicher Betreuung zu verwirklichen.

Frau Prof. Dr. Wimberger, Herrn PD Dr. Heubner und Frau Dr. Aktas danke ich besonders für die ausgezeichnete Betreuung von klinischer Seite.

Herrn Prof. Dr. Hahn und Frau PD Dr. Schwarzenbach möchte ich herzlich für die Kooperationsbereitschaft und die Hilfestellung beim Planen der Methodik sowie beim Erstellen der Publikationen danken. Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Alexander Baraniskin und Maren Bredemeier, die mir im Rahmen des microRNA-Projektes mit viel Engagement und fachlicher Anregung zur Seite standen.

Frau Prof. Dr. Poetsch und Herrn Dr. rer. nat. Worm möchte ich herzlich für die Unterstützung im Rahmen des LOH-Projektes und für die anregenden fachlichen Gespräche danken.

Ganz besonders möchte ich Gisela Koestner, Jens Rasch, Ute Kirsch, Sieglinde Arndt, Ulla Brecklinghaus und Bärbel Hermann für die Einarbeitung in die Methodik und für die Unterstützung meiner Projekte danken.

Birgit Perrey, Britta Redeker, Corinna Eichelser und Jolanthe Kropidlowski danke ich für die engagierte Hilfe und die methodische Unterstützung im Rahmen meiner Disserationsprojekte. Nina Lütscher danke ich für die Bereitschaft zum Korrekturlesen.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die schöne Zeit, die ich am Universitätsklinikum Essen verbringen durfte. Hier konnte ich sowohl auf theoretischer als auch auf praktischer Basis für meine berufliche Zukunft lernen. Ferner habe ich die Hilfsbereitschaft und das kollegiale Klima dieser Arbeitsgruppe sehr geschätzt.

### **7.3. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## 7.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifizierung neuer Biomarker für das Ovarialkarzinom – Primärtumorbasierte Analysen und blutbasierte Real-Time-Liquid-Biopsy“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Jan Dominik Kuhlmann befürworte.

Essen, den 11.12.2012



---

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

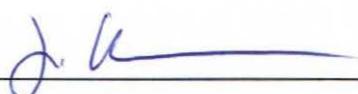
Essen, den 11.12.2012



---

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 11.12.2012



---