

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

Feinkartierung von Loss of Heterozygosity-Intervallen auf Chromosom 11p und
Untersuchungen zum Expressions- und Methylierungsstatus von FANCF beim
Ovariakarzinom

Kathrin Schulze

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle

2. Univ.-Prof. Dr. A. Meindl

Die Dissertation wurde am 29.06.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.10.2010 angenommen

Meinen Großeltern

1	Einleitung	5
1.1	Ovarialkarzinom	5
1.1.1	Klassifikation des Ovarialkarzinoms	5
1.1.2	Epidemiologie, Klinik und Prognose des Ovarialkarzinoms	6
1.1.3	Molekulargenetik des Ovarialkarzinoms	7
1.2	Karzinogenese	8
1.2.1	Knudsons „Two-Hit-Model“	8
1.2.2	Loss of Heterozygosity	9
1.2.3	Beitrag der Methylierung zur Karzinogenese	9
1.3	LOH-Ereignisse auf Chromosom 11p bei Ovarialkarzinomen	10
1.4	Potentielle Kandidatengene für die Tumorprogression des Ovarialkarzinoms auf Chromosom 11p	11
1.4.1	KAI1	12
1.4.2	FANCF	13
1.4.3	Der Fanconi Anämie-BRCA-Pathway	14
1.4.4	Ausblick – Das Leben von Guido Fanconi	17
2	Zielsetzung dieser Dissertation	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Probenkollektiv	19
3.1.2	DNA-Isolierung und – Reinigung	21
3.1.3	Konzentrationsbestimmungen und Beurteilung der RNA-Qualität	21
3.1.4	PCR	22
3.1.5	Mikrosatellitenmarker	22
3.1.6	DHPLC	22
3.1.7	Herstellung von First Strand cDNA	23
3.1.8	Taqman®-System	23
3.1.9	Material für die Untersuchung der Methylierung	24
3.1.10	Sequenziergerät	24
3.1.11	Gelelektrophorese	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	DNA-Isolierung und -Reinigung	25
3.2.2	Loss of Heterozygosity-Analysen	26
3.2.2.1	PCR-Reaktion	26
3.2.2.2	IP-RP HPLC-Analysen	27
3.2.2.3	Identifikation eines LOH mittels der IP-RP-HPLC	28
3.2.2.4	Berechnung des Allelic Imbalance Factors (AIF)	29
3.2.3	Genexpression	33
3.2.3.1	Reverse Transkriptase-PCR	33
3.2.3.2	PCR-Schritt	34
3.2.3.3	Prinzip der TaqMan®- Reaktion	35
3.2.3.4	Relative Quantifizierung der Genexpression mittels „Comparative Ct-Method“	37
3.2.4	Methylierung	40
3.2.4.1	Bisulfitreaktion	40
3.2.4.2	Positivkontrolle für komplette Methylierung	40
3.2.4.3	Methylierungs-spezifische PCR (MSP)	41
3.2.4.4	Etablierung eines PCR-based HpaII restriction enzyme assay	42
3.2.4.5	Methylierungs-spezifische Sequenzierung	43
4	Ergebnisse	46
4.1	Untersuchung von allelischen Imbalancen auf Chromosom 11p	46
4.1.1	Auswahl & Etablierung von Mikrosatellitenmarkern für die Region 11p15.5 bis 11p11.246	46
4.1.2	Allgemeines zur Interpretation der LOH-Intervalle	48
4.1.3	Schematische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Untersuchungen	49
4.1.4	Ergebnisse der LOH-Untersuchungen	54

4.2	Untersuchung der Methylierung des FANCF-Gens	56
4.2.1	Etablierung einer Positivkontrolle für die Methylierungs-Untersuchungen.....	56
4.2.2	Methylierungs-spezifische PCR.....	58
4.2.3	Etablierung eines PCR-based HpaII restriction enzyme assay.....	60
4.2.4	Bisulfitequenzierung.....	61
4.3	Untersuchung der Genexpression von FANCF	65
4.3.1	Ergebnis der TaqMan®-Reaktion.....	65
4.3.2	Relative Quantifizierung der Genexpression von FANCF	69
4.3.3	Interpretation der Ergebnisse der Relativen Quantifizierung.....	69
5	Diskussion	72
5.1	LOH-Analyse auf Chromosom 11p	72
5.1.1	Identifikation von Loss of Heterozygosity mit der IP-RP-HPLC.....	73
5.1.2	Grenzen der LOH-Bestimmung	74
5.1.3	Identifikation eines kleinsten überlappenden Intervalls auf Chromosom 11p	75
5.1.4	Auswahl von Kandidatengenen auf Chromosom 11p	76
5.2	Untersuchungen zur DNA-Methylierung von FANCF	77
5.2.1	Wahl der Methylierungs-spezifischen PCR als Methode für die Untersuchung der Methylierung von FANCF	78
5.2.2	Etablierung der Methylierungs-spezifischen PCR	79
5.2.3	Diskussion des PCR-based HpaII restriction enzyme assay	80
5.2.4	Bisulfitequenzierung.....	81
5.2.5	Diskussion der Ergebnisse zur Methylierung von FANCF	82
5.2.5.1	<i>Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Methylierung von FANCF beim Ovarialkarzinom</i>	82
5.2.5.2	<i>Rolle der Methylierung von FANCF beim Ovarialkarzinom</i>	83
5.2.5.3	<i>Methylierung von FANCF bei anderen Tumorarten</i>	85
5.3	Untersuchung der Genexpression des Kandidatengens FANCF	87
5.3.1	Normalisierung von Genexpressionsdaten.....	87
5.3.1.1	<i>Normalisierung gegen die Gesamt-RNA</i>	88
5.3.1.2	<i>Normalisierung gegen „Housekeeping Genes“</i>	88
5.3.2	Wahl eines Housekeepers für diese Doktorarbeit	90
5.3.3	Diskussion der Ergebnisse der Genexpression von FANCF.....	91
5.4	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse	92
6	Zusammenfassung	94
7	Literaturverzeichnis	96
8	Anhang	102
8.1	Abbildungsverzeichnis	102
8.2	Tabellenverzeichnis.....	103
8.3	Abkürzungen.....	104

1 Einleitung

1.1 Ovarialkarzinom

1.1.1 Klassifikation des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom wird nach der TNM- und der FIGO-Klassifikation (Klassifikation der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) eingeteilt (siehe Tabelle 1).

TNM	FIGO	Befund
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T1	I	Tumor auf Ovarien begrenzt
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; intakte Kapsel; Keine malignen Zellen in Aszites/Peritoneallavage
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; intakte Kapsel Keine malignen Zellen in Aszites/Peritoneallavage
T1c	IC	Tumor begrenzt auf Ovarien, Kapsel rupturiert Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen in Aszites/Peritoneallavage
T2	II	Tumor breitet sich im Becken aus
T2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n); Keine malignen Zellen in Aszites/Peritoneallavage
T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe; Keine malignen Zellen in Aszites/Peritoneallavage
T2c	IIC	Ausbreitung im Becken und maligne Zellen in Aszites/Peritoneallavage
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt beide Ovarien & Ausbreitung außerhalb des Beckens und/oder Regionäre Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, max. 2 cm
T3c und/oder N1	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens > 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (Peritonealmetastasen ausgeschlossen)
N		Regionäre Lymphknoten
NX		Können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionären Lymphknoten betroffen
N1		Regionäre Lymphknotenmetastasen
M		Fernmetastasen
MX		Können nicht beurteilt werden
M0		Keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen (Peritonealmetastasen ausgeschlossen)

Tabelle 1 Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach der TNM- und der FIGO-Klassifikation, modifiziert nach DIEBOLD et al, 2007, S.24

Nach der Klassifikation der WHO (World Health Organization) werden bei Ovarialtumoren drei Hauptgruppen unterschieden:

- Epitheliale Tumoren mit einer Häufigkeit von 90%,
- Keimstrangstroma-Tumoren mit einer Häufigkeit von 5-8%
- Keimzelltumoren mit einer Häufigkeit von 3-5%

Histopathologisch werden die Tumoren mittels *Grading* eingeteilt:

- G1 für gut differenzierte Tumorzellen
- G2 für mäßig differenzierte Tumorzellen
- G3 für schlecht differenzierte Tumorzellen
- G4 für undifferenzierte Tumorzellen

1.1.2 Epidemiologie, Klinik und Prognose des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom ist in Deutschland nach Mammakarzinom, Darmkrebs, Bronchialkarzinom und Endometriumkarzinom die fünfthäufigste Krebsart und der zweithäufigste maligne Genitaltumor der Frau. Jährlich erkranken etwa 9950 Frauen an Eierstockkrebs, das entspricht 4,8 % aller weiblichen Krebserkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter wird mit 68 Jahren angegeben. An einem Ovarialkarzinom versterben jährlich circa 5910 Frauen in Deutschland. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 41 % [GEKID & RKI, 2006]. Die mittlere Überlebenszeit nach der Diagnose von Ovarialkrebs liegt bei 1,9 bis 2,3 Jahren [www.tumorregister-muenchen.de].

Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms steigt mit zunehmendem Lebensalter. Auch Umwelt- und Ernährungsfaktoren, Infertilität, Nulliparität, dauerhafte ovulatorische Zyklen und eine medikamentöse Ovulationsauslösung scheinen Risikofaktoren für die Entwicklung eines malignen Ovarialtumors zu sein. Protektiv soll sich die Zahl der Schwangerschaften und die Dauer der Einnahme von Ovulationshemmern auswirken [SCHMALFELDT, 2007]. 90 % der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf. Der Rest ist hereditär bedingt, wobei der Großteil dieser Fälle (90 %) dem familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom zugeordnet werden kann. 80 % dieser Fälle beruhen auf Mutationen des BRCA1-Gens und 15 % auf Mutationen des BRCA2-Gens [SCHELLING et al, 2007].

Die Prognose der Patientin hängt wesentlich vom Stadium der Erkrankung bei Diagnose und dem postoperativ verbliebenen Tumorrest ab. Auch das Alter, der Allgemeinzustand der Patientin sowie der histologische Typ des Tumors sollen diesbezüglich die Prognose beeinflussen [SCHMALFELDT, 2007].

In frühen Stadien verläuft die Erkrankung symptomarm und bislang gibt es nur unzureichende Screeningmethoden, so dass die Diagnosestellung bei 70 % der Patientinnen erst in den FIGO-Stadien III und IV erfolgt, wenn bereits nachweisbare Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen bestehen. Tumormarker sind aufgrund ihrer zu niedrigen Sensitivität und Spezifität nur für die Verlaufskontrolle von erkrankten Patientinnen geeignet [SCHELLING et al, 2007].

Eine typische Eigenschaft von Ovarialtumoren ist das zunächst gute Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Platin-Taxan-Kombinationen. Viele Patientinnen erleiden im Verlauf jedoch ein Rezidiv und entwickeln eine Resistenz gegen bestimmte Chemotherapeutika.

In ovariellen Krebszellen akkumulieren sich genetische Veränderungen, die es ihnen ermöglichen, Chemotherapeutika zu entgehen und so zunehmend gefährlich zu werden. Die Ursachen dieser im Verlauf insbesondere gegen Platinderivate auftretenden Resistenzen sind bislang ungeklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Ihre Kenntnis ist entscheidend für die Entwicklung neuer Therapiestrategien, um die Prognose der Ovarialkrebs-Patientinnen zu verbessern.

1.1.3 Molekulargenetik des Ovarialkarzinoms

Die Mehrzahl der malignen Ovarialtumoren weist somatisch-genetische Veränderungen auf. In den letzten Jahren sind verschiedene molekulargenetische Marker identifiziert worden, welchen eine Rolle bei der Tumorprogression des Ovarialkarzinoms zugeschrieben wird. Diese werden hinsichtlich ihrer prognostischen oder prädiktiven Aussagekraft geprüft. Zudem sind sie auch als Zielstrukturen für moderne Therapieansätze im Gespräch und es wird an der Umsetzung dieser molekularbiologischen und genetischen Erkenntnisse in neue Therapieformen gearbeitet.

Interessant in diesem Zusammenhang erscheinen unter anderem das Tumorsuppressorgen p53 [HOGDALL et al, 2006], das Onkogen Her2-neu [HOGDALL et al, 2003; CAMILLERI-BROËT et al, 2004], die Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9) [SCHMALFELDT et al, 2001] und der Plasminogenaktivator uPA mit seinem spezifischen Hemmstoff PAI1 [KUHN et al, 1999; SCHMALFELDT et al, 2001]. Derzeit wird in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München auch die Rolle verschiedener Kallikreine als Tumormarker in Serum und Tumorgewebe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom geprüft [DORN et al, 2006].

Die endgültige Bedeutung all dieser Faktoren ist jedoch noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Forschungsarbeit.

1.2 Karzinogenese

Krebs wird als das Ergebnis einer Vielzahl genetischer Veränderungen gesehen. Generell unterscheidet man zwischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die eine Rolle bei der Tumorinitiation und –progression spielen können. Eine Störung der Interaktion zwischen Zellen und ihrer Umgebung kann zu invasivem Wachstum und Metastasierung führen [MARSHALL, 1991]. Im Laufe der Tumorgenese kommt es zu einer zunehmenden chromosomalen Instabilität.

Zur Krebsentstehung beitragen können Mutationen oder gesteigerte Genexpression von Onkogenen und die verminderte Expression oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen. Veränderungen dieser Gene können bereits auf Keimbahnebene entstehen und dann zur Entstehung eines Malignoms prädisponieren. Beispiele hierfür sind jene der Brustkrebs-Suszeptibilitätsgene BRCA1 und 2, die zur Entwicklung von Brust- oder Eierstockkrebs prädisponieren.

1.2.1 Knudsons „Two-Hit-Model“

Knudson hat mit dem „Two-Hit-Model“ ein Modell für die Tumorgenese beschrieben, bei dem für die vollständige Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens zwei Ereignisse (*Hits*) erforderlich sind. Es beschreibt zwei Wege, die zur Transformation einer Zelle in eine Krebszelle führen können: Mutationen und der Verlust von chromosomalem Material, zum Beispiel durch *Loss of heterozygosity* (LOH) oder homozygote Deletionen. Inzwischen ist das Modell durch die DNA-Methylierung ergänzt worden [JONES & LAIRD, 1999; MAIER et al, 2004].

Prinzipiell unterscheidet man zwischen familiären und sporadisch auftretenden Tumoren. Bei den sporadischen Tumoren werden beide „Hits“ in Form von Mutationen, *Loss of Heterozygosity* oder Methylierung nach der Konzeption erworben. Im Gegensatz dazu liegt bei hereditären Tumoren in jeder Körperzelle zumindest ein Ereignis einer Mutation auf Keimbahnebene zugrunde [JONES & LAIRD, 1999; MAIER et al, 2004].

Dieses Modell wird unter Einbeziehung des Fanconi Anämie-BRCA-*Pathways* auch für die Karzinogenese von Brust- und Eierstockkrebs vorgeschlagen. Dabei kann eine ererbte Mutation von BRCA1 oder FANCF ebenso wie eine Promoter-Hypermethylierung das erste Ereignis sein [OLOPADE & WEI, 2003].

1.2.2 Loss of Heterozygosity

Loss of Heterozygosity ist bei verschiedenen Krebsarten häufig und wird als Hinweis auf die Lokalisation eines Tumorsuppressorgens gewertet [PONDER, 1988; MARSHALL, 1991]. Daher werden LOH-Analysen für die Suche nach Tumorsuppressorgenen eingesetzt.

Im Genom des Menschen sind so genannte Mikrosatelliten enthalten, die aus tandemartig wiederholten Sequenzen aus zwei bis vier Basenpaaren bestehen und in der Anzahl ihrer Wiederholungen hochpolymorph sind. Man nennt sie daher auch *Short Tandem Repeat Polymorphisms* (STRP). Ein Individuum erbt oft verschieden lange Allele von seinen Eltern. Durch *Non-disjunction*, subchromosomale Deletionen, nichtbalancierte Translokationen, Genkonversion oder meiotische Rekombination kann es zu einem Verlust dieser Heterozygotie kommen (*Loss of Heterozygosity*, LOH) [MARSHALL, 1991; DEVILEE et al, 2001].

Der Nachweis von *Loss of Heterozygosity* nutzt das Vorhandensein von Längen-Polymorphismen (Mikrosatelliten) innerhalb des Genoms, um zwischen maternalem und paternalem Allel zu unterscheiden [DEVILEE et al, 2001]. Man bedient sich polymorpher Marker, die die entsprechende chromosomale Region flankieren und vergleicht so die DNA von normalen Zellen und von Tumorzellen desselben Patienten.

1.2.3 Beitrag der Methylierung zur Karzinogenese

Der Begriff Epigenetik bezieht sich auf vererbare DNA-Modifikationen, wie zum Beispiel die DNA-Methylierung, die außerhalb der primär durch Basen kodierten Sequenzen liegen [BALCH et al, 2004].

Methyltransferasen katalysieren die Methylierung am C5-Kohlenstoff eines Cytosinrests, dem ein Guanin folgt (CpG-Dinukleotid).

Die Verteilung von CpG-Dinukleotiden ist im menschlichen Genom nicht einheitlich. Es gibt Bereiche, die reich an CpG-Dinukleotiden sind und *CpG-Islands* genannt werden [BIRD, 1986]. Typische *CpG-Islands* sind im Bereich von Genpromotern lokalisiert und normalerweise unmethyliert. Durch ihre Methylierung kann die Transkription eines Gens blockiert werden, das heißt, das Gen wird abgeschaltet [BIRD, 1986].

Methylierung dient bei der Replikation der Unterscheidung zwischen der Matrize und dem neu synthetisierten Tochterstrang. Eine weitere wichtige Aufgabe der DNA-Methylierung ist die Genregulation. Dazu gehören das „Genomic Imprinting“, durch das es zu einer unterschiedlichen Expression von maternalem und paternalem Allel eines Gens kommt, die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosome der Frau und die gewebespezifische differenzielle Genexpression. Auch die korrekte Organisation des Chromatins und die Unterdrückung parasitärer Sequenzen werden als normale Funktionen der Methylierung beschrieben [ESTELLER & HERMAN, 2001].

Viele Tumoren zeigen ein vom gesunden Gewebe abweichendes Methylierungsmuster: Einerseits ist insbesondere auch für ovariale Tumoren eine globale Verminderung der Methylierung (Hypomethylierung) beschrieben worden [WIDSCHWENDTER et al, 2004], die mit einer chromosomalen Instabilität in Verbindung gebracht wird [CHEN et al, 2005] und zur Aktivierung von Onkogenen und viralen Transposons führen kann. Zum anderen wurde über lokale Regionen von DNA-Hypermethylierung in Tumoren, so genannte „Hot Spots“, berichtet.

Es gibt viele Hinweise darauf, dass eine Hypermethylierung von CpG-Islands im Bereich von Genpromotern zusammen mit einer Deacetylierung von Histonen zu einer Abschaltung der Transkription von Tumorsuppressorgenen führt und so zur Tumorentstehung beiträgt [JONES & LAIRD, 1999]. Dadurch werden wichtige *Pathways*, die zum Beispiel die DNA-Reparatur oder die Apoptose steuern, gestört [ESTELLER & HERMAN, 2001]. Zudem werden für Krebszellen ein Verlust der genomischen Prägung („Loss of imprinting“, LOI), eine Störung der Unterdrückung intragenomischer Parasiten und das Auftreten von genetischen Defekten durch die hohe Mutationsrate von methyliertem Cytosin zu Thymin beschrieben [ESTELLER & HERMAN, 2001].

1.3 LOH-Ereignisse auf Chromosom 11p bei Ovarialkarzinomen

Ovarialkarzinome akkumulieren im Laufe der Tumorprogression eine Vielzahl von chromosomalen und genetischen Alterationen. Diese Veränderungen beeinflussen das maligne Potential und das Ansprechen der Tumoren auf die verschiedenen Behandlungsstrategien.

Ein allelischer Verlust in der Region 11p im Sinne von *Loss of Heterozygosity* ist für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom ein relativ häufiges Ereignis [EHLEN & DUBEAU, 1990; ZHENG et al, 1991; VIEL et al, 1992; KIECHLE-SCHWARZ et al,

1993; KIECHLE-SCHWARZ et al, 1994]. Dieser Verlust korreliert mit einer schlechten Differenzierung [KIECHLE-SCHWARZ et al, 1994; ZHENG et al, 1991] und einem aggressiveren Verhalten von Ovarialtumoren [KIECHLE et al, 2001; VIEL et al, 1992; LEARY et al, 1993; GABRA et al, 1995; LU et al, 1997].

In der Arbeitsgruppe von Frau Professor Kiechle wurden 106 Ovarialkarzinome mittels *Comparative Genome Hybridisation* (CGH)-Analyse auf die Überbeziehungsweise Unterrepräsentation chromosomaler Regionen untersucht.

Dabei zeigten fortgeschrittene Tumoren einen höheren Grad an chromosomaler Instabilität als Tumoren mit geringerem malignen Potential. Es konnte auch gezeigt werden, dass undifferenzierte Tumoren (G3) signifikant häufiger mit Deletionen der Regionen 11p, 13q, 8q und 7p assoziiert waren als gut differenzierte Tumoren (G1). Eine besonders deutliche Korrelation bestand zwischen G3-Tumoren und dem Verlust des kurzen Arms von Chromosom 11 [KIECHLE et al, 2001]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass im Bereich von 11p Gene lokalisiert sein könnten, die bei der Entstehung von Ovarialtumoren bzw. deren Progression eine wichtige Rolle spielen könnten. Auch verschiedene andere Studien gehen von dieser Annahme aus [LEE et al, 1990; VANDAMME et al, 1992; VIEL et al, 1992; KIECHLE-SCHWARZ et al, 1993; KIECHLE-SCHWARZ et al, 1994; CAO et al, 2001]. Die Beobachtung von Allelimbalancen und LOH an bestimmten chromosomalen Loci bei Tumor-DNA im Vergleich zu normaler DNA wird als Hinweis auf die Lokalisation eines Tumorsuppressorgens interpretiert [PONDER, 1988; MARSHALL, 1991].

1.4 Potentielle Kandidatengene für die Tumorprogression des Ovarialkarzinoms auf Chromosom 11p

Insgesamt handelt es sich bei 11p um eine Region, die sehr reich an Genen ist. Wie oben bereits beschrieben, sind allelische Deletionen von Chromosom 11p bei invasiven epithelialen Ovarialtumoren häufig und sind mit einem aggressiveren Verhalten dieser Tumoren assoziiert. Zudem ist der kurze Arm von Chromosom 11 als „Hot Spot“ für DNA-Methylierung bei Krebs bekannt [DE BUSTROS et al, 1988]. Es wird vermutet, dass sich hier für die Progression von Ovarialkarzinomen relevante Tumorsuppressorgene befinden.

In einer vorangegangenen Doktorarbeit [HAUENSTEIN, 2005] wurde mit der Feinkartierung von *Loss of Heterozygosity* (LOH)-Intervallen auf Chromosom 11p (11pter – 11p14) mittels Mikrosatellitenanalyse an 25 mittels CGH vorselektierten

Ovarialkarzinomen [JACOBSEN, 2000] begonnen, um die Lokalisation potenzieller Kandidatengene mittels Mikrosatellitenmarkern genauer eingrenzen zu können. Bei diesen aus dem Kollektiv der Studie von KIECHLE et al 2001 stammenden Proben war ein Verlust genetischen Materials in der Region 11p aufgefallen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde diese Feinkartierung mit zusätzlichen Markern auf den Bereich 11pter bis 11p11 ausgedehnt. Zudem wurde das Probenkollektiv um nicht durch CGH vorselektierte Proben erweitert.

Im Zuge einer Literaturrecherche fielen zum Beispiel das Metastasierungs-Suppressor-Gen KAI1 (CD82) [DONG et al, 1995; KAWANA et al, 1997] (11p11.2), das Fanconi Anämie-Gen FANCF [TANIGUCHI et al, 2003] (11p15), oder das CD44-Gen (35,1 MB vom Telomer entfernt) als interessante Kandidatengene in der voruntersuchten Region auf.

1.4.1 KAI1

Das KAI1 (CD82) Gen ist als Metastasierungs-Suppressor-Gen erstmalig beim Prostatakarzinom beschrieben worden [DONG et al, 1995]. Es liegt auf 11p11.2 (44,6 MB vom Telomer entfernt gelegen) und kodiert ein aus 267 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das zur *Transmembrane-4 Superfamily* (TM4SF) gehört [LIU et al, 2000, HOULE et al, 2002]. Es wird vermutet, dass KAI1 als Membranprotein an Interaktionen zwischen Zellen untereinander und zur extrazellulären Matrix mitwirkt.

Dadurch soll es Einfluss auf die Fähigkeit von Krebszellen zur Invasion und Metastasierung nehmen [DONG et al, 1995; LIU et al, 2000]. Eine Herabregulation der Expression von KAI1 ist für verschiedene Krebsarten, unter anderem für das epitheliale Ovarialzellkarzinom beschrieben worden [LIU et al, 2000; HOULE et al, 2002]. LIU et al [2000] haben die verminderte Expression von KAI1 vor allem bei Tumoren im Frühstadium beobachtet. HOULE et al [2002] berichten über eine niedrige KAI1-Expression bei Tumoren hohen Gradings und bei Metastasen. Auch wird eine Veränderung der Lokalisation in der Zelle von der Membran bei G1-Tumoren ins Zytoplasma bei G3-Tumoren dokumentiert [HOULE et al, 2002]. Angesichts dieser Literaturdaten wird davon ausgegangen, dass KAI1 eine wichtige Rolle bei der malignen Progression des Ovarialkarzinoms spielt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Region 11p11.2 mit einem Mikrosatellitenmarker auf allelische Imbalanzen bei ovariellen Tumorproben untersucht.

Die Herabregulation von KAI1 scheint nicht durch eine Mutation verursacht zu sein [LIU et al, 2000]. JACKSON et al [2000] konnten an einem größeren Kollektiv von Tumorproben und Zelllinien keine Methylierung von KAI1 nachweisen. Daher wurde auf eine Untersuchung der Methylierung an unserem Probenkollektiv verzichtet.

Die Expression von KAI1 war Gegenstand einer parallel von Simone Schleger durchgeführten Doktorarbeit.

1.4.2 FANCF

Das Fanconi Anämie Gen-FANCF ist auf Chromosom 11p15 (22,6 MB vom Telomer entfernt) lokalisiert und liegt in einer Region, in der in Vorstudien allelische Imbalancen beobachtet worden waren [KIECHLE et al, 2001, HAUENSTEIN, 2005]. Bei FANCF handelt es sich um ein Gen, das aus einem Exon besteht, und für ein Protein von 42 kD kodiert [DE WINTER et al; 2000] Es enthält ein *CpG-Island* [TANIGUCHI et al, 2003]. Das FANCF-Protein ist Bestandteil des Fanconi Anämie-DNA-Reparatur-*Pathways* [GARCIA-HIGUERA, 2001], der eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden, z.B. durch alkylierende oder interkalierende Chemotherapeutika spielt [GARCIA-HIGUERA, 2001; HAZLEHURST et al, 2003; TANIGUCHI et al, 2003].

Neuere Studien berichten über eine Abschaltung des FANCF-Gens durch Hypermethylierung bei Ovarialkarzinom-Zelllinien und einem kleinen Kollektiv von Ovarialkarzinom-Tumorproben und bringen damit eine Unterbrechung dieses *Pathways* in Verbindung [TANIGUCHI et al, 2003]. Zudem wird ein möglicher Zusammenhang mit dem Ansprechen auf cisplatinhaltige Chemotherapie vermutet [TANIGUCHI et al, 2003; OLOPADE & WEI, 2003; D'ANDREA 2003]. Sequenzanalysen von FANCF bei der ovariellen Zelllinie TOV-21G und einer von einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie abstammenden Zelllinie konnten keine Mutation des Gens nachweisen [TISCHKOWITZ et al, 2003; TANIGUCHI et al, 2003].

Etwa die Hälfte der von Evelyn Hauenstein untersuchten, mittels CGH vorselektierten Tumoren zeigen ein Ereignis für den dem FANCF Gen am nächsten gelegenen Mikrosatellitenmarker „CA14“ [GROSS et al, 2007]. Aufgrund dieser Daten wurde das Fanconi Anämie-Gen FANCF für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Um die Literaturdaten an einem größeren, nicht vorselektierten Kollektiv von Ovarialkarzinomen zu bestätigen, sollte die Promoterregion von FANCF mittels Methylierungs-spezifischer PCR auf ihren DNA-Methylierungsstatus untersucht

werden. Die Genexpression von FANCF sollte parallel mit einem *Realtime*-PCR-Verfahren in einem ausgewählten Probenkollektiv quantifiziert werden.

1.4.3 Der Fanconi Anämie-BRCA-Pathway

Bei der Fanconi Anämie (FA) handelt es sich um eine sehr heterogene Erkrankung, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Sie ist gekennzeichnet durch angeborene Fehlbildungen und eine Prädisposition für Neoplasien.

Bei der FA vom Subtyp D1 sind bialleleische Mutationen von BRCA2, einem der beiden Suszeptibilitätsgene für Brust- und Eierstockkrebs gefunden worden [HOWLETT et al, 2002]. Deshalb geht man davon aus, dass die Fanconi Anämie-Proteine zusammen mit den Proteinen BRCA1 und 2 in einem gemeinsamen *Pathway* kooperieren.

Defekte der DNA-Reparatur und von „*Checkpoints*“ im Zellzyklus, also zum Beispiel Defekte des *FA-Pathways*, führen möglicherweise zu einer genetischen Instabilität und damit zu Krebs. Störungen des *FA-Pathways* sind für viele Krebsarten, zum Beispiel für maligne Ovarialtumoren, das Zervixkarzinom oder Lungentumoren [TANIGUCHI et al, 2003; DHILLON et al, 2004; NARAYAN et al, 2004; MARSIT et al, 2004] identifiziert worden. Darüber hinaus könnte ein aberranter FA *Pathway* das Ansprechen von Tumoren auf Chemotherapeutika und Bestrahlung beeinflussen [TANIGUCHI & D'ANDREA, 2006, TANIGUCHI et al, 2003; HAZLEHURST et al, 2003; CHEN et al, 2005].

Der Fanconi Anämie-BRCA-*Pathway* moduliert die DNA-Reparatur durch homologe Rekombination [D'ANDREA, 2003]. Eine DNA-Schädigung, zum Beispiel durch Cisplatin, Mitomycin C, Melphalan oder ionisierende Strahlung führt zur Formation eines Multi-Proteinkomplexes (FA-Komplex), der für die Monoubiquitylierung des weiter abwärts gelegenen FANCD2 an einem Lysinrest benötigt wird [GARCIA-HIGUERA et al, 2001]. FANCF operiert dabei als flexibles Adaptorprotein, dem eine Schlüsselrolle bei der Bildung und der Stabilisierung des Fanconi Anämie-Kernkomplexes zugerechnet wird [LÉVEILLÉ et al, 2004].

Monoubiquityliertes FANCD2 interagiert mit BRCA1 und dem als FANCD1 identifizierten BRCA2 und bewirkt deren Rekrutierung mit RAD51 in DNA-Reparaturfoci. Diese Rekrutierung ist Voraussetzung für die Reparatur der durch interkalierende Substanzen verursachten DNA-Schäden. [OLOPADE & WEI, 2003; NIEMEYER et al, 2006;]. Eine Unterbrechung des *Pathways* führt zu den für Fanconi Anämie charakteristischen Chromosomenbrüchen, zu einer Überempfindlichkeit für

DNA-Crosslinker und einer erhöhten Transformationsrate der Zellen [TANIGUCHI et al, 2003; D'ANDREA, 2003].

Ovariale Tumorzellen haben oft ein instabiles Genom und zeigen eine Überempfindlichkeit für Cisplatin. Im Verlauf entwickeln viele Patientinnen jedoch eine Resistenz gegen Chemotherapeutika. Die Gruppe um Taniguchi untersuchte in einer 2003 veröffentlichten Studie die Integrität des Fanconi Anämie-BRCA-Pathways in Ovarialtumorzellen [TANIGUCHI et al, 2003]. Sie beschreibt, dass dieser Pfad, der die Cisplatin-Empfindlichkeit von Zellen beeinflussen soll, bei einigen ovariellen Tumorzelllinien durch biallelische Methylierung des FANCF-Gens unterbrochen sei. Maß für einen funktionierenden Pathway war dabei die Monoubiquitylierung von FANCD2.

TANIGUCHI et al [2003] zeigen, dass diese zusammen mit der Resistenz gegen Cisplatin durch eine funktionelle Komplementierung mit dem weiter oben im Pathway (*upstream*) gelegenen FANCF wiederhergestellt werden kann. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass eine Inaktivierung von FANCF bei Ovarialtumoren auf einer Methylierung bestimmter CpG-Islands im Promoter beruht und eine erworbene Cisplatinresistenz mit einer Demethylierung dieser CpG-Islands korreliert. Zudem könnte eine somatische Inaktivierung des Pathways infolge der Methylierung von FANCF zum sporadisch auftretenden Ovarialkarzinom beitragen. In Anbetracht dieser Ergebnisse wird ein Modell für die Progression von Ovarialtumoren vorgeschlagen (siehe Abbildung 1), bei dem der initialen Methylierung von FANCF eine Demethylierung von FANCF folgt und schließlich zu einer Cisplatin-Resistenz führt.

Bei diesem Modell ist FANCF bei der frühen Tumor-Progression methyliert und somit inaktiv. Das führt zu einer chromosomalen Instabilität und Akkumulierung von anderen, Tumor begünstigenden Mutationen. Die meisten der wachsenden Tumorzellen bleiben aufgrund ihres Defekts im FA-Pathway überempfindlich für Cisplatin, so dass Cisplatin in diesen Zellen eine ausgesprochene Tumor-Lyse bewirken kann. In vereinzelten Tumorzellen wird FANCF demethyliert, was zu einer Wiederherstellung des Pathways und durch einen selektiven Vorteil bei Therapie mit Cisplatin zum Heranwachsen Cisplatin-resistenter Tumorzellen führt. Dieser Mechanismus könnte eine plausible Erklärung bieten für die Neigung von Ovarialtumoren, eine Cisplatin-Resistenz zu entwickeln.

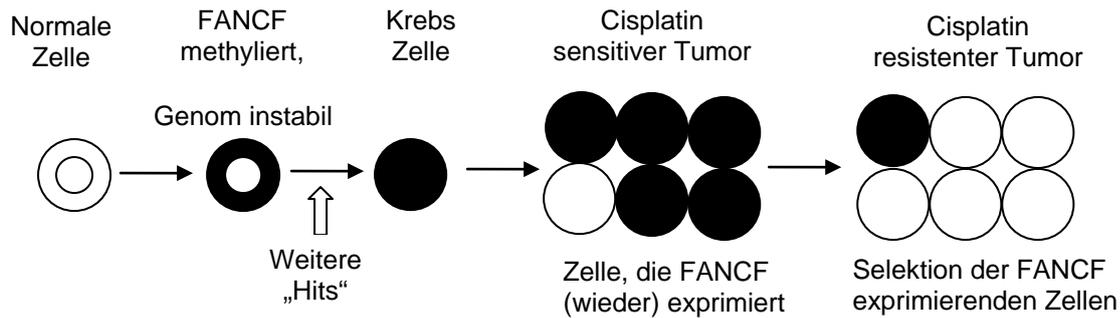


Abbildung 1 Modell für die Tumorentstehung und Progression von Ovarialtumoren nach TANIGUCHI et al, 2003

TANIGUCHI et al [2003] sehen in diesem Modell mögliche therapeutische Ansätze für Cisplatin-resistente Tumoren. So schlagen sie vor, dass ein kleinmolekularer Hemmstoff des FA-Pathways die Monoubiquitylierung von FANCD2 verhindern könnte und den erneut wachsenden Tumor wieder gegen Cisplatin empfindlich machen könnte. Voraussetzung wäre jedoch, dass solch ein Medikament selektiv in die Tumorzellen gelangt, da es gleichzeitig die Zytotoxizität von Cisplatin auf normale Zellen verstärken würde.

1.4.4 Ausblick – Das Leben von Guido Fanconi

Guido Fanconi wurde am 1. Januar 1892 in Poschiavo, Graubünden geboren. Bereits in seiner Schulzeit hatte der von den Naturwissenschaften, insbesondere der Biochemie, begeisterte Fanconi ein eigenes kleines Labor. Nach Abschluss des 1911 begonnenen Medizinstudiums trat er 1918 in Zürich seine erste Stelle in der Pathologie und Physiologie an. Im Kinderspital der Universität Zürich war er ab 1918 tätig. Dort habilitiert Fanconi sich 1926 über Scharlach. Später wurde er zum Professor der Pädiatrie berufen und Chef des Zürcher Kinderspitals [LOBITZ & VELLEUER, 2006].

In einer 1927 veröffentlichten Fallstudie berichtete Fanconi von drei Brüdern, die an einer der perniziösen Anämie ähnlichen Erkrankung verstorben waren [NIEMEYER et al, 2006]. Er ging davon aus, dass dabei eine konsitutive, also genetische Erkrankung vorlag [DEMUTH et al, 2002]. 1931 wurde dieses Krankheitsbild als „Fanconi Anämie“ bezeichnet. Fanconi beschäftigte sich die darauf folgenden 40 Jahre mit dieser Erkrankung.

Er kämpfte für die Einführung von Labormethoden in den klinischen Alltag und vertrat die seinerzeit eher unpopuläre Ansicht, dass chromosomale Aberrationen und ein Versagen von Immunmechanismen die Hauptursachen für die maligne Degeneration einer Zelle seien. Fanconi glaubte, dass Krebs an sich keine Erbkrankheit sei, sondern dass hereditäre prädisponierende und protektive Faktoren existieren.

Am 10. Oktober 1979 verstarb Guido Fanconi in Zürich [LOBITZ & VELLEUER, 2006]. Als Erstbeschreiber der Fanconi Anämie, der Cystischen Fibrose und des De Toni-Debré-Fanconi Syndroms sowie zahlreicher anderer Erkrankungen ist er auch im heutigen klinischen Alltag präsent.

2 Zielsetzung dieser Dissertation

Ziel dieser Dissertation war die Suche nach potentiellen Tumorsuppressorgenen, die eine Rolle bei der Tumorinitiation und –progression des Ovarialkarzinoms spielen könnten. Bei dem vorhandenen Probenkollektiv handelte es sich um mittels *Comparative Genomic Hybridisation* vorselektierte Proben von Ovarialkarzinomen, die durch chromosomale Deletionen in der Region 11pter bis 11p13 aufgefallen waren. Verluste von Genmaterial am Chromosom 11p sind mit der Progression des Ovarialkarzinoms assoziiert. Man vermutet deshalb die Existenz von einem oder mehreren relevanten Tumorsuppressorgenen in dieser Region, die im Zuge der Entdifferenzierung von malignen Ovarialtumoren verloren gehen.

Das vorhandene Kollektiv sollte um nicht vorselektierte Tumorproben aus der Gewebekbank der Frauenklinik der TU München erweitert werden. Die in einer vorangegangenen Doktorarbeit begonnene Feinkartierung von Chromosom 11p mittels IP-RP-HPLC (*Ion Pair-Reversed Phase-High Pressure Liquid Chromatography*) sollte mit zusätzlichen polymorphen Mikrosatellitenmarkern (Di- und Tetranukleotidmarker) fortgeführt werden mit dem Ziel die komplette Region von 11p15 bis 11p11 (Intervall von etwa 55 Megabasen) zu überspannen. Das Ziel dieser Feinkartierung war es, ein kleinstes überlappendes Intervall („smallest region of overlap“) auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 abzugrenzen, für das bei einem großen Anteil der untersuchten Tumorproben ein *Loss of Heterozygosity* nachweisbar ist. In dieser Region sollten dann mit Hilfe von Literaturdaten Kandidatengene für eine weiterführende Untersuchung ausgewählt werden.

Ein weiteres Ziel war es, quantitative Genexpressionsanalysen und Methoden zur Untersuchung der DNA-Methylierung in Promoterregionen in unserem Labor zu etablieren. Mithilfe dieser Methoden sollten die ausgewählten Gene dann genauer untersucht werden, um herauszufinden, ob sie eine Rolle bei der Tumorinitiation und –progression spielen könnten.

Da sich bei der Feinkartierung kein eindeutiges kleinstes überlappendes Intervall auf Chromosom 11p abgrenzen ließ, wurde später mit Hilfe des Literaturstudiums ein vielversprechendes Gen ausgewählt: Das Fanconi Anämie-Gen FANCF, dem außerdem eine Rolle bei der Entstehung der Chemotherapieresistenz des Ovarialkarzinoms zugeschrieben wird.

3 Material und Methoden

3.1 *Material*

3.1.1 Probenkollektiv

Das untersuchte Tumorkollektiv umfasst Proben von 44 malignen epithelialen Ovarialtumoren, einem benignen Ovarialtumor (Thekom) und vier Netzmetastasen. Zu jeder Tumorprobe stand ein Normalgewebe (Peritoneum) der jeweiligen Patientin zur Verfügung. Alle Tumoren wurden parallel vom Pathologen charakterisiert. Die klinischen Daten der jeweiligen Patientinnen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

25 der Tumoren stammen aus einem Set von 55 Ovarialtumoren, die in vorangegangenen Studien in Zusammenarbeit mit der Universitätsfrauenklinik Kiel (Prof. Dr. N. Arnold) mittels Comparative Genome Hybridisation (CGH-) Analyse untersucht worden waren und bei denen eine Unterrepräsentation von chromosomalem Material der Region 11p aufgefallen war [KIECHLE et al, 2001]. Des Weiteren stand DNA von sechs weiteren Patientinnen aus Kiel zur Verfügung, die in der CGH-Analyse keine Aberrationen auf Chromosom 11 gezeigt hatten [Prof. Dr. N. Arnold, unpublizierte Daten].

Dieses Kollektiv wurde um 13 weitere, nicht vorselektierte Gewebeproben von Ovarialtumoren und vier Proben korrespondierender extraovarialer Tumorgewebe (Netzmetastasen) aus dem Probenkollektiv der Frauenklinik an der TU München erweitert. Die Proben stammen aus Tumoren, die mit den Standardmethoden operativ entfernt wurden und dann in Stickstoff bei - 80°C schockgefroren und gelagert wurden. Aus diesen Geweben wurde im Rahmen dieser Arbeit DNA isoliert.

Für die Etablierung der Genexpressionsanalyse mittels Taqman® lag RNA zu neun der in dieser Doktorarbeit verwendeten Gewebeproben aus Ovarialtumoren sowie zu einem Normalgewebe aus dem Probenkollektiv der Frauenklinik an der TU München vor. Zudem wurde die Zelllinie OvCa-R3 (ATCC® Nummer HTB-161) verwendet. Sie stammt von einer 60-jährigen kaukasischen Patientin mit einem epithelialen Ovarialtumor (Adenokarzinom) [www.atcc.org].

Für die Etablierung der verschiedenen Methoden stand DNA aus einem Kollektiv von Normalpatientinnen zur Verfügung.

Probe	Alter bei Diagnose	FIGO Stadium	Grading	Histologie	Auffälligkeit Chromosom 11p in CGH
K 1	57	IV	2	serös/papillär	ja
K 2	74	IIIc	2	endometroid	ja
K 3	51			Thekom	ja
K 4	63	IIIc	3	serös/papillär	ja
K 5	37	Ia	3	endometroid	ja
K 7	61	IIIb	2	endometroid	ja
K 9	63	IIIc	2	serös/papillär	ja
K 10	45	IIIc	2	serös/papillär	ja
K 11	43	IIIc	3	serös/papillär	ja
K 12	46	Rezidiv von K 10			
K 13	43	IV	3	serös/papillär	ja
K 14	58	IIIc	2	serös/papillär	ja
K 15	73	IIIb	2	serös/papillär	ja
K 16	66	IIIc	2	serös/papillär	ja
K 17	77	IV	3	serös/papillär	ja
K 18	62	IIIc	3	serös/papillär	ja
K 20	74	IIIc	3	serös/papillär	ja
K 23	71	Ia	3	serös/papillär	ja
K 25	83	IV	3	endometroid	ja
K 28	29	IIIc	3	serös/papillär	ja
K 30	57	IIIc	2	serös/papillär	ja
K 31	69	IV	3	serös/papillär	ja
K 32	64	Ia	2	endometroid	ja
K 33	80	Ic	3	endometroid	ja
K 34	81	IIIb	2	serös/papillär	ja
K 35	unbekannt				
K 36	64	Ia	1	mucinöses Cystadenom	nein
K 37	44	IIIc	2	serös/papillär	nein
K 38	49	IIIa	2	endometroid	nein
K 39	65	IIIc	2	serös/papillär	nein
K 40	62	IV	2	serös/papillär	nein
Muc 1	63	IIIc	3	serös	n.b.
Muc 2	48	IV	3	serös	n.b.
Muc 3	70	IV	3	serös	n.b.
Muc 4	22	IIIc	1	niedrig differenziert	n.b.
Muc 5	48	IIIc	3	serös	n.b.
Muc 6	61	IIIc	3	serös	n.b.
Muc 7	68	IV	3	serös	n.b.
Muc 8	53	Ic	2	mucinös	n.b.
Muc 9	70	IIIc	3	serös	n.b.
Muc 10	44	IIIc	3	embryonaler Tumor	n.b.
Muc 11	35	IIIa	3	serös	n.b.
Muc 12	81	IIIc	3	serös	n.b.
Muc 13	64	IIIc	3	undifferenziert	n.b.
Muc 14	67	Ic	2		n.b.

Tabelle 2 Klinische Daten zu den verwendeten Tumorproben. n.b. = nicht bestimmt

3.1.2 DNA-Isolierung und – Reinigung

DNA wurde mit dem Puregene[®] DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA) isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg).

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die anschließende DNA-Reinigung verwendet:

- Proteinase K (Roche, Penzberg), gelöst in 10 mM Tris (Roth, Karlsruhe)
- 1 M Tris: 60,55 g Tris add 500 ml H₂O; pH 7,4
- Proteinase K Puffer: 100 mM TrisCl; pH 8
50 mM EDTA
5% SDS (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA)
- 4 M LiCl: 8,478 g LiCl (Merck, Darmstadt) add 50 ml H₂O
- Phenol-Chloroform-Isoamyl (PCI) (Sigma, Steinheim)

3.1.3 Konzentrationsbestimmungen und Beurteilung der RNA-Qualität

Für die Konzentrationsbestimmung der aus den Gewebeproben isolierten DNA wurde das BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Das Gerät errechnet das Verhältnis der UV-Absorption bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) (A_{260}/A_{280}). Bei reinen DNA-Proben sollte der Wert $> 1,8$ liegen. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung der Probe mit Protein oder Phenol hin.

Um die Qualität und die Konzentration der eingesetzten RNA und cDNA zu messen, wurde das Spektralphotometer NanoDrop ND-3300 (PeqLab, Erlangen) eingesetzt. Das Gerät misst über einen Wellenlängenbereich von 220 – 750 nm. Das gesamte Spektrum wird in Form einer Kurve wiedergegeben. Die Konzentration der RNA wird basierend auf der Absorption bei 260 nm (A_{260}) berechnet. Die Absorption bei 280 nm (A_{280}) misst den Proteingehalt der Probe. Die Ratios $A_{260}/280$ und $A_{260}/230$ spiegeln beide die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure wieder. Für die 260/280-Ratio wird ein Wert > 2 , für die 260/230-Ratio werden Werte zwischen 2 und 2,2 angestrebt [THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2009].

Um die Qualität der gereinigten Gesamt-RNA-Fraktionen zu prüfen, wurden die Proben außerdem gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden nur Proben mit intakten 18S rRNA- und 28S rRNA- Banden für die Experimente eingesetzt. Zusätzlich wurden mit dem NanoDrop (PeqLab, Erlangen) die Qualität und Konzentration der RNA und der aus der RNA synthetisierten cDNA gemessen.

3.1.4 PCR

Für die PCR-Reaktionen wurde ein MJ Research PTC 200 Thermocycler (Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. PCRs wurden mit Reagenzien aus dem *Expand High Fidelity System* von Roche durchgeführt. Der darin enthaltene *Expand High Fidelity Enzyme Mix* besteht aus einer thermostabilen Taq DNA-Polymerase und der thermostabilen Tgo DNA-Polymerase, die eine *Proofreading*-Aktivität besitzt.

Für einen dNTP-Mix, wurden je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP aus dem peqGOLD dNTP-Set (peqLab, Erlangen) in 1 mM Tris-HCL-Lösung (pH 7,5) gelöst.

3.1.5 Mikrosatellitenmarker

Ein Set von Mikrosatellitenmarkern für die Untersuchung der Region 11p wurde in einer vorangehenden Doktorarbeit etabliert [HAUENSTEIN, 2005]. Neben diesen Markern wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzliche Mikrosatellitenregionen für die Feinkartierung der chromosomalen Region 11p ausgewählt (siehe Tabelle 15).

Bei den gewählten Markern handelt es sich um Mikrosatellitenrepeatregionen, die in der Datenbank Goldenpath (www.genome.ucsc.edu) gesucht wurden beziehungsweise aus der Genome Database (www.gdb.org) entnommen wurden. Neun Marker wurden aus der Genome Database entnommen. Die Heterozygotität der verwendeten Marker wird dort mit 48,21 – 81% angegeben. Die Marker CA 14 und CA 21 sind im Rahmen der vorangegangenen Doktorarbeit entworfen worden [HAUENSTEIN, 2005]. Für die in der Goldenpath Datenbank gefundenen Repeatregionen wurden eigens Primersets entworfen. Alle *Primer* wurden von Metabion (Metabion International AG, Martinsried) angefertigt.

3.1.6 DHPLC

Die *Ion-Pair Reversed-Pair* HPLC wurde mit einem WAVE[®] *DNA Fragment Analysis System* (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA) durchgeführt.

Als Puffer wurden fertig gemischte Puffer von Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA verwendet:

Puffer A: 0,1 M Triethylammoniumacetat, pH 7,0

Puffer B: 0,1 M Triethylammoniumacetat, pH 7,0
25 % Acetonitril

Die Puffergradienten für die Längenauftrennung der Fragmente wurden mit der WAVEMaker[®] Software (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA) berechnet.

3.1.7 Herstellung von First Strand cDNA

Für die Reverse Transkriptase-PCR zur Synthese von Einzelstrang-cDNA aus RNA (*1st Strand*) wurde der *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (AMV) (Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, USA) verwendet. Für jede der so hergestellten cDNAs wurde eine Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop ND-3300 (PeqLab, Erlangen) durchgeführt (siehe Tabelle 3).

Probe	A260	A280	A260/280	A260/230	ng/ μ l
NG (Bi3)	64,64	36,64	1,76	2,08	3232,3
2T	47,431	26,337	1,8	2,09	2371,6
2ex	52,685	28,926	1,82	2,11	2634,3
3T	50,914	27,827	1,83	2,15	2534,7
3ex	49,838	27,366	1,82	2,09	2491,9
5ex	51,894	28,52	1,82	1,94	2594,7
7T	50,009	27,298	1,82	2,08	2500,5
11T	55,061	30,134	1,83	2,12	2753,1
12T	38,189	20,876	1,83	2,11	1909,4
14T	45,848	25,325	1,81	2,09	2292,4
OvCa-R3	44,711	24,43	1,82	2,09	2235,5

Tabelle 3 Konzentrationsbestimmung der eingesetzten cDNA-Proben mit dem Nanodrop

3.1.8 Taqman[®]-System

Die Quantifizierung der Genexpression wurde mit einem ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System („Taqman[®]“, Applied Biosystems, Darmstadt) und der dazugehörigen Sequence Detection System Software (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Es wurden folgende von Applied Biosystems (Darmstadt) hergestellte und getestete *Gene Expression Assays* verwendet:

- FANCF *Assay-on-demand™* Applied Biosystems
- HPRT TaqMan[®] Predeveloped Assay Reagents, Applied Biosystems
- 18S RNA TaqMan[®] Predeveloped Assay Reagents, Applied Biosystems

Diese vorgefertigten Assays enthalten einen 20x Mix aus zwei unmarkierten *Primern* (Endkonzentration 900 nM) und einer *TaqMan[®] MGB probe* als Sonde (Endkonzentration 250 nM). Die Assays für FANCF und HPRT wurden in der gelieferten Konzentration (20x) verwendet. Der Assay-Mix für 18S RNA wurde auf eine 10x Konzentration verdünnt.

- Beladungspuffer 6x Ladepuffer, peqLab, Erlangen
- Marker 50 µl peqGold 100 bp DNA-Ladder (peqLab, Erlangen)
 450 µl H₂O
 100 µl Ladepuffer

In dieser Arbeit wurden für die MSP Gele mit 2,0 % Agarose und für den Restriktionsassay Gele mit 1,2 % Agarose eingesetzt. Dafür wird 0,6 bzw. 1g Agarose mit 50 ml 1x TBE-Puffer gemischt und geschmolzen. Das entstandene Gel wird auf circa 50°C abgekühlt. Nach Zugabe von 12,5 µl der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid wird es in Gelkammern mit Taschenkämmen gegossen. Das fertige Gel wird in der Elektrophoresekammer mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Je 5 µl DNA wird mit 1 µl 6x Ladepuffer (peqLab, Erlangen) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich werden 6 µl eines verdünnten Markers (0,5 mg peqGOLD 100 bp DNA-Ladder, peqLab, Erlangen add 12 ml H₂O_{bidest}) in eine Tasche des Gels gegeben.

Die 500 bp-Bande hat einen höheren DNA-Gehalt als die anderen Banden und fungiert auf Grund ihrer größeren Intensität als Referenzbande. Die Elektrophorese läuft bei 120 Volt und 500 mA 30 Minuten lang. Die Banden werden dann mit Hilfe des zugesetzten Ethidiumbromids durch UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel wird fotografiert.

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Isolierung und -Reinigung

Zunächst werden die Proben mit Hilfe eines Dismembrators zu einem Pulver verarbeitet. Dazu wird ein Gewebestück mit einem Gewicht von 0,1 bis 0,2 g klein geschnitten und mit einer Kugel in einen in Stickstoff vorgekühlten Teflonbehälter gegeben. Der Behälter wird in den Dismembrator eingespannt und das Gewebe wird mittels der zugegebenen Kugel innerhalb von 15 bis 25 Sekunden pulverisiert. Aus dem so gewonnenen Pulver wird die DNA mit dem Puregene[®] DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA) isoliert. Dann wird sie für eine Woche bei 4°C gelagert, damit sie sich gut lösen kann.

Anschließend wird die Konzentration der gelösten DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

Bei der Aufarbeitung der Gewebeproben bereitete die Konsistenz einiger Gewebe Probleme. Manche Gewebe tauen sehr schnell an und „zerfließen“ geradezu. Bei einem Teil dieser Proben ließ sich nur wenig DNA isolieren. Insbesondere zeigt sich, dass ein

Großteil der Normalgewebe relativ niedrige DNA-Mengen lieferte. Durch Einsatz von mehr Pulver bei der Zellyse konnte dieses Problem für einen Teil der Proben behoben werden. Die übrigen niedrig konzentrierten Proben wurden unverdünnt eingesetzt und konnten so zumindest für die LOH-Untersuchungen verwendet werden.

Um die DNA bei zu großem Proteinanteil zu reinigen wird zunächst ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Dazu wird die Probe mit 1/10 Volumen 10x Proteinase K-Puffer und 1/50 Volumen Proteinase K (20 mg/ml) (Roche, Penzberg) gemischt. Die Probe wird 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Dann folgt eine Hitzeinaktivierung der Proteinase K durch eine zehnmütige Inkubation bei 68°C. Anschließend findet eine Phenol-Chloroform-Isoamyl Extraktion (PCI) statt. Dazu wird das Volumen der Probe auf 100 µl aufgefüllt.

Zur Probe werden dann 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl (PCI) (Sigma, Steinheim) aus der unteren Phase im Glas pipettiert. Die Probe wird jetzt 10 Sekunden lang gevortext und dann drei Minuten lang zentrifugiert. Im Cup finden sich dann zwei Phasen: eine wässrige, obere Phase, in der sich die DNA befindet und eine untere Phase, die Proteine enthält. Die obere Phase wird mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Cup überführt.

Im Anschluss wird eine Ethanol-fällung durchgeführt. Hierfür werden zur Probe 1/10 Volumen 4 M LiCl und 2 Volumen 100% Ethanol (Ethanol p.a., Merck, Darmstadt) gegeben. Die Proben werden 20 Minuten lang bei – 20°C inkubiert. Dann werden die Proben für 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die DNA bildet ein Pellet, der Überstand wird verworfen. Zum DNA-Pellet wird 1 ml 70 % Ethanol gegeben. Die Probe wird 5 Minuten lang bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen. Dann wird die Probe in der Vakuumzentrifuge zentrifugiert, bis kein Ethanol mehr im Cup vorhanden ist. Alkoholreste können bei der späteren Verwendung der DNA zum Beispiel die Polymerase in der PCR stören. Die gereinigte DNA wird in 20 µl gereinigtem Wasser gelöst.

3.2.2 Loss of Heterozygosity-Analysen

3.2.2.1 PCR-Reaktion

Für jede im Rahmen dieser Arbeit gemachte Loss of Heterozygosity (LOH)-Untersuchung wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die PCRs fanden in einem Endvolumen von 25 µl statt. In jedem Ansatz waren 25 ng genomische DNA, 1,5 - 2,5 mM MgCl₂, 100 µM Deoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), je 500 nM *Forward*- und

Reverse-Primer und 1 U Polymerase (Expand High Fidelity Enzyme Mix) enthalten. Einige der in der vorliegenden Arbeit neu isolierten DNA-Proben zeigten bei der Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer auch nach mehrfacher Isolation sehr niedrige Werte, so dass eine Verdünnung auf 10 µg/µl nicht möglich war. Diese Proben wurden unverdünnt in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Im ersten Schritt der PCR erfolgt die Denaturierung der Doppelstrang-DNA bei 94°C zu Einzelsträngen. Dann findet bei der spezifischen *Primer*-Temperatur (T_m) die Anlagerung der *Primer* an die jeweiligen Einzelstränge (*Annealing*) statt. Je nach *Primer*-Pärchen lag T_m zwischen 55 und 69°C.

Im nächsten Schritt wird die Temperatur eine Minute lang auf 72°C erhöht. Bei dieser Temperatur findet die Elongation der von den *Primern* bestimmten Sequenz in Gegenwart von Deoxynukleotiden durch die hitzebeständige Polymerase statt.

Nach 32 Zyklen folgt die finale Elongation für 8 Minuten bei 72°C. Die Polymerase amplifiziert die komplementären Stränge (siehe Tabelle 4).

	Temperatur	Zeit (min)
1	94,0°C	05:00
2	94,0°C	00:30
3	T_m	00:30
4	72,0°C	01:00
5	Go to 2	32 cycles
6	72,0°C	08:00
7	04,0°C	forever
8	End	

Tabelle 4 PCR-Programm für LOH-Analysen, T_m = spezifische Schmelztemperatur der Primer

3.2.2.2 *IP-RP HPLC-Analysen*

Das Prinzip der IP-RP HPLC ist von XIAO & OEFFNER 2001 in einem *Review* ausführlich zusammengefasst worden. Bei der Ion-Pair Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography (IP-RP HPLC) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und quantifiziert werden. Diese Größenbestimmung ist unabhängig von der Fragmentsequenz [MUNSON et al, 2000].

Das in den verwendeten Puffern enthaltene Triethylammoniumacetat (TEAA) ist positiv geladen und ermöglicht Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphat-Ionen der DNA-Moleküle und dem unpolaren Säulenmaterial. Längere DNA-Moleküle adsorbieren also stärker an die Säule, da sie mehr TEAA-Moleküle binden und werden

langsamer von ihr gelöst als kürzere Moleküle, da sie durch mehr TEAA eine stärkere Affinität zur Säule haben.

Die Höhe der *Peaks* korreliert mit dem DNA-Gehalt der Probe. Die Zeit, die die DNA an der Säule bleibt, bis sie durch Acetonitril eluiert wird (Retentionszeit) hängt von ihrer Länge ab. Über die DNA-Sep[®]-Säule (bestehend aus nichtporösen Poly-(Styrene-Divinylbenzen)-Copolymeren) läuft ein kontinuierlicher Gradient von Puffer A und B. Der prozentuale Anteil des acetonitrilhaltigen Puffers B, der die DNA von der Säule eluiert, nimmt während der Analyse kontinuierlich zu [XIAO & OEFFNER, 2001]. Der optimale Puffergradient für ein DNA Fragment bestimmter Länge kann mit der WaveMaker[®] Software berechnet werden.

Die LOH-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden bei einer Puffer-Flussrate von 0,75 ml/min durchgeführt. Die Säulentemperatur lag mit 50°C im nicht-denaturierenden Bereich. Von jeder Probe wurden – je nach DNA-Konzentration – 5 oder 7 µl eingespritzt. Die Laufzeit lag je nach Marker bei zehn bis fünfzehn Minuten, die Retentionszeit betrug vier bis fünf Minuten. Mit dem eingebauten Detektor wird anschließend die UV-Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm [DEVANY et al, 2000] gemessen. Das analoge Signal wird mittels der WaveMaker[®] - Software in einen digitalen Wert umgerechnet, die Ergebnisse werden als Chromatogramme dargestellt.

3.2.2.3 Identifikation eines LOH mittels der IP-RP-HPLC

Durch den Vergleich der Chromatogramme von Tumor- und Normal-DNA kann ein *Loss of Heterozygosity* im Tumorgewebe identifiziert werden. Eine heterozygote Probe zeigt im Chromatogramm der IP-RP-HPLC einen Heteroduplex-*Peak* und für jedes der beiden Allele einen Homoduplex-*Peak*. Wenn die Chromatogramme der Tumor- und der Normalprobe ähnliche Intensitäten der *Peaks* aufweisen, liegt kein LOH vor (siehe Abbildung 2 a).

Bei einem *Loss of Heterozygosity* ist im Chromatogramm der Tumorprobe im Vergleich zur Normalprobe einer der beiden Homoduplex-*Peaks* und auch der Heteroduplex signifikant vermindert, während bei der Normal-DNA ein Heteroduplex und zwei Homoduplices nachweisbar sind (siehe Abbildung 2 b).

Wenn eine Probe sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe einen einzelnen *Peak* zeigt, wird die Probe als „nicht informativ“ bezeichnet, da zwischen den beiden Allelen nicht unterschieden werden kann (siehe Abbildung 2 c).

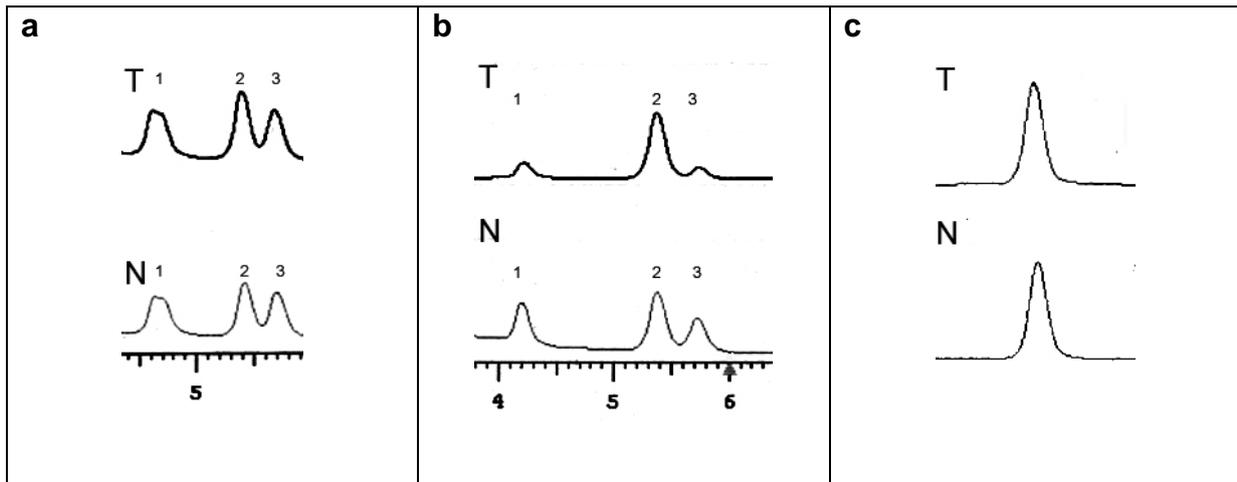


Abbildung 2 Beispiele für IP-RP-HPLC-Chromatogramme (T = Tumor-, N = Normalgewebe, 1 = Heteroduplex, 2 = Allel 1, 3 = Allel 2)

a Beispiel für eine heterozygote Probe. Analyse der Probe K 36 mit dem Marker UT691.

b Beispiel für ein LOH. Analyse der Probe K 13 mit UT691. Hier liegt beim Tumorgewebe ein Verlust von Allel 2 vor und der Heteroduplex ist vermindert

c Beispiel für eine nichtinformativ informative Probe. Analyse der Probe Mü 4 mit UT691.

3.2.2.4 Berechnung des Allelic Imbalance Factors (AIF)

Um den Grad eines LOHs zu bestimmen kann man den *Allelic Imbalance Factor* AIF nach DEVILEE berechnen:

$$\text{AIF} = A_t \times B_n / B_t \times A_n$$

Dabei sind A und B die beiden Allele einer für einen bestimmten Mikrosatellitenmarker heterozygoten Probe in der DNA des Tumorgewebes (t) und der normalen Vergleichsprobe (n) [DEVILEE et al, 2001] (siehe Abbildung 3).

Bei den HPLC-Chromatogrammen müssen die jeweiligen *Peaks* angeklickt werden. Die WaveMaker[®] Software berechnet dann die Fläche unter den Kurven. Je die Hälfte der Fläche des Heteroduplex wird zu den Flächen der Homoduplices hinzugerechnet.

Für das Vorliegen eines LOHs wurde ein AIF von $\geq 1,70$ oder $\leq 0,59$, die Grenze für die Retention eines Allels bei einem AIF von 0,76-1,3 definiert. Proben mit einem AIF von 0,60-0,75 oder 1,31-1,69 liegen im „grauen Bereich“ [CLETON-JANSEN et al, 2001]. Für diese Proben kann weder mit Sicherheit eine Heterozygotie noch der definitive Verlust eines Allels bescheinigt werden. Sie zeigen jedoch oftmals eine in den Chromatogrammen deutlich sichtbare Allelimbalanz.

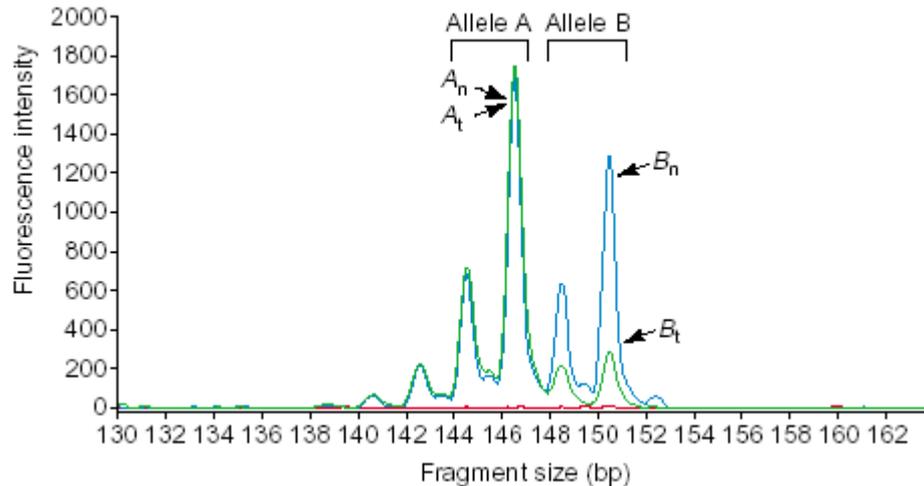


Abbildung 3 Berechnung des Allelic Imbalance Factor (AIF): Im Tumorgewebe (t) liegt im Vergleich zum Normalgewebe (n) ein Verlust des Allels B vor [nach DEVILLEE et al, 2001; S. 571]

Das Vorliegen eines LOHs kann auch angenommen werden, wenn der Heteroduplex-*Peak* im Tumorgewebe reduziert ist und/oder wenn sich bei der DNA der Tumorprobe das Größenverhältnis der beiden *Peaks* umkehrt. Auch wenn sich ein LOH nicht immer eindeutig quantifizieren ließ, konnte auf diese Weise in vielen Fällen eine Aussage über das Vorliegen einer Allelimbalanz im Gegensatz zur Retention der Allele getroffen werden

Bei den Direpeatmarkern werden die beiden Allele aufgrund der oftmals sehr geringen Längenunterschiede von nur einem oder zwei Basenpaaren mit der IP-RP-HPLC nicht so deutlich aufgetrennt und es treten häufiger Stotterbanden auf (siehe Abbildung 4 a - c). Wenn sie sich in ihrer Länge nur in wenigen Basenpaare unterscheiden, können die Allele in einem einzelnen Peak, dem ein Heteroduplex-*Peak* aus beiden Allelen vorangeht, ko-eluiieren (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6). In diesen Fällen ist es nicht möglich, im WaveMaker[®] die jeweiligen Allel-*Peaks* zu markieren und so die Flächen der *Peaks* getrennt voneinander zu berechnen.

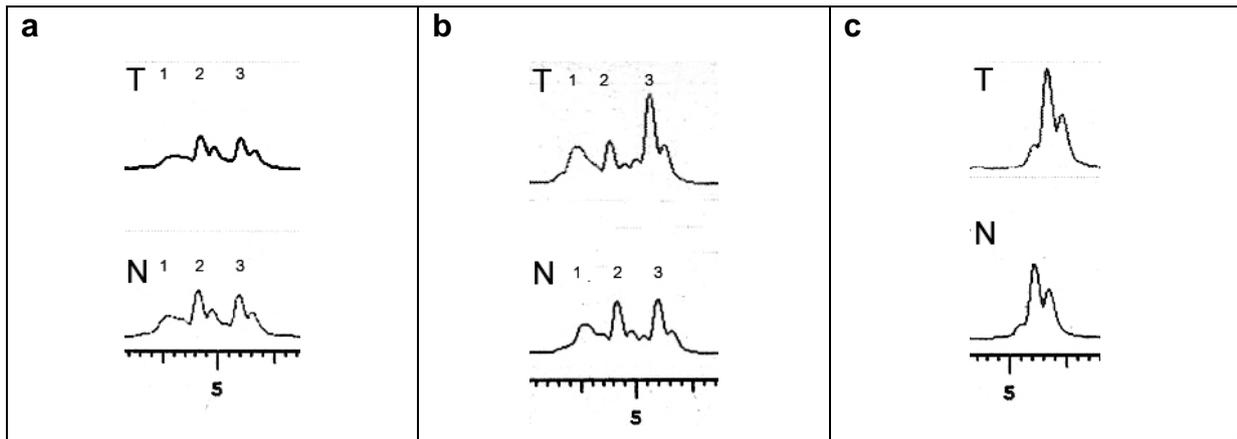


Abbildung 4 Beispiele für IP-RP-HPLC-Chromatogramme für den Direpeatmarker ST5

a Die Probe K 36 ist heterozygot für ST5. 1 = Heteroduplex. Die beiden großen Peaks (2 und 3) entsprechen den Allelen 1 und 2. Bei den jeweils nachfolgenden kleineren Peaks handelt es sich um Stotterbanden.

b Bei der Probe K 39 liegt im Tumorgewebe (T) für ST5 ein LOH von Allel 2 vor. Auch hier sind die Allele von Stotterbanden umgeben.

c Die Probe K 40 ist für den Marker ST 5 nichtinformativ. Bei den äußeren, kleineren Peaks handelt es sich um Stotterbanden.

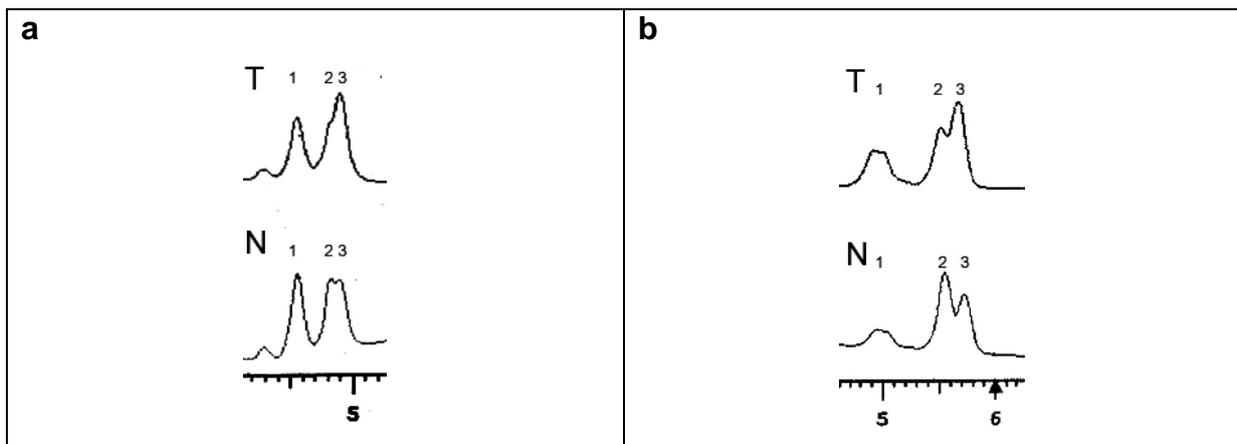


Abbildung 5 Beispiele für Chromatogramme mit in einem Peak ko-eluierenden Allelen

a Die Analyse der Probe Muc 13 mit dem Marker CA21 zeigt ein Beispiel für ein nicht quantifizierbares LOH. Die beiden Allele (2 und 3) ko-eluieren in einem Peak.

b Untersuchung von K 39 mit UT1916. Die Höhe der Peaks kehrt sich im Tumorgewebe um. Probe K 39T, Marker UT1916. Der AIF liegt bei dieser Probe bei 2,05, so dass hier ein quantifizierbares LOH vorliegt.

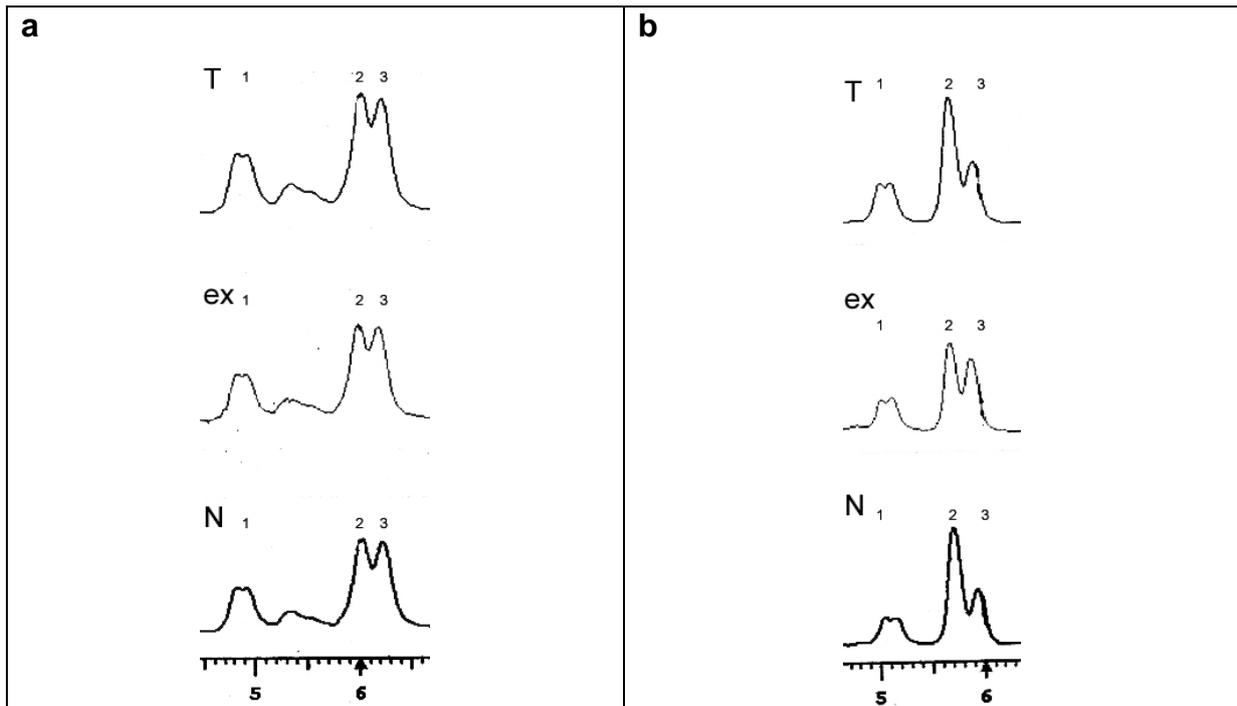


Abbildung 6 Beispiele für in einem Peak ko-eluierende Allele. Ex = Netzmetastase

a Die Probe Muc 2 ist für den Marker UT691 heterozygot. Die Allele trennen sich schlecht auf.

b Beispiel für eine Imbalanz bei Analyse mit UT1916. Das Tumorgewebe ist heterozygot. Für die Netzmetastase liegt eine Imbalanz vor. Das erste Allel (2) ist im Vergleich zum Normalgewebe vermindert.

Bei den bereits etablierten Direpeatmarkern wurden die in der vorangegangenen Doktorarbeit angefertigten Chromatogramme der HPLC mit den Elektropherogrammen der Kapillarelektrophorese verglichen und so konnte für die meisten Proben eine Entscheidung über das Vorhandensein eines LOHs ohne eine zusätzliche Analyse mit der Kapillarelektrophorese gefällt werden.

Es wurde versucht, den AIF grob zu berechnen, indem die Höhe der jeweiligen Homo- und Heteroduplices per Hand mit dem Lineal ausgemessen wurde und die so ermittelten Werte in die Formel eingesetzt wurden.

Bei umgekehrten *Peak*-Größenverhältnissen ergibt sich häufig ein AIF-Wert, der nach den genannten Kriterien im Bereich einer heterozygoten Probe oder im „grauen Bereich“ liegt. Die Chromatogramme zeigen jedoch deutlich erkennbare Veränderungen der Allel-Verhältnisse. Wenn sich der AIF bei einem deutlich erkennbaren LOH nicht quantifizieren ließ, wurden die Proben in den Tabellen mit einem Sternchen (LOH*) markiert.

3.2.3 Genexpression

Um die Genexpression zu quantifizieren sind zwei Schritte nötig: Der Reverse Transkriptase-Schritt (*RT Step*) und der PCR-Schritt (siehe Abbildung 7). Beim RT-Schritt wird mit Hilfe von *Random Primern* aus Gesamt-RNA *First strand cDNA* hergestellt. Beim PCR-Schritt erfolgt die Quantifizierung der in cDNA umgewandelten RNA mittels *Realtime-PCR*.

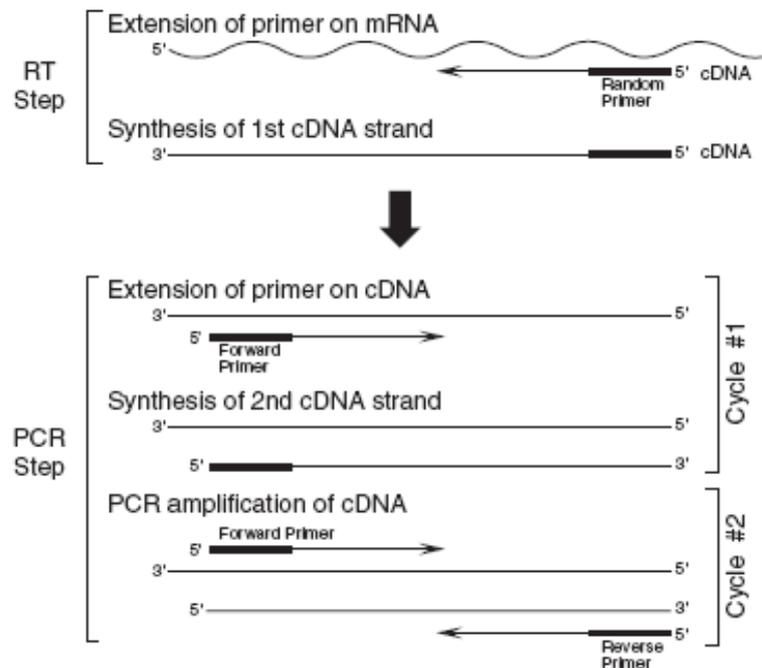


Abbildung 7 Reverse Transkriptase-Schritt (RT Step) und PCR-Schritt (PCR Step) [aus APPLIED BIOSYSTEMS, 2002, S. 3]

3.2.3.1 Reverse Transkriptase-PCR

Für die Synthese der *First Strand-cDNA* wird zunächst die RNA auf 0,7µg aliquotiert. Aus dem *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* von Roche (Indianapolis) werden zur RNA-Probe die in Tabelle 5 aufgelisteten Bestandteile zugegeben. Das Endvolumen beträgt 20 µl. Die Proben werden 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 95°C und dann bei 4°C in der PCR-Maschine inkubiert. Beim ersten Inkubationsschritt (bei 25°) erfolgt die Anlagerung der *Primer* an die RNA-Probe. Anschließend findet die Reverse Transkription der RNA statt, die während der zweiten Inkubation (bei 42°C) zur cDNA-Synthese führt. Danach wird die *AMV Reverse Transcriptase* durch fünfminütige Inkubation bei 95°C denaturiert. Dieser Schritt ist nötig, da sich die Transkriptase sonst in der nachfolgenden Anwendung der cDNA störend auswirken kann. Im Anschluss wird die Probe zum Herunterkühlen bei 4°C

inkubiert. Die so synthetisierte cDNA wird in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert.

Vol	Substanz	Endkonzentration
2 µl	10X Puffer	1X
4 µl	25 mM MgCl ₂	5 mM
2 µl	Deoxynucleotide Mix	1 mM
2 µl	Random Primer p(dN) ₆	3,2 µg
1 µl	RNAse Inhibitor (50 U/µl)	50 U
0,8 µl	AMV Reverse Transcriptase	> 20 U
8,2 µl	RNA- Probe	
	Add 8,2 µl Steriles Wasser	
20 µl		

Tabelle 5 Pipettierschema für 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR

3.2.3.2 PCR-Schritt

Beim PCR-Schritt wird die in cDNA umgeschriebene mRNA mittels Realtime-PCR („TaqMan[®]“, ABI PRISM 7700, Applied Biosystems, Darmstadt) quantifiziert. Bei dieser Reaktion werden spezifische *Primer* und eine spezifische *TaqMan[®] MGB* Sonde („probe“) (*6-FAM dye-labeled*) sowie eine DNA-Polymerase benötigt. Diese Bestandteile sind in den *Gene Expression Assays* von Applied Biosystems enthalten. Für die Untersuchung der Expression von FANCF wurden der FANCF Assay-on-demand[™] und ein TaqMan[®] Universal PCR Master Mix von Applied Biosystems verwendet. Im PCR Master Mix ist eine AmpliTaq Gold[®] DNA-Polymerase enthalten, die eine Nukleaseaktivität von 5' nach 3' besitzt, aber nicht von 3' nach 5'. Für FANCF und HPRT wurden Ansätze mit 40 µl (siehe Tabelle 6) und mit 30 µl (siehe Tabelle 7) Endvolumen verwendet.

Vol	Substanz (Konzentration)
20,0 µl	TaqMan [®] Universal PCR Master Mix (2X)
2,0 µl	Gene Expression Assay Mix (20X)
14,0 µl	H ₂ O
4,0 µl	cDNA (500 ng)
40,0 µl	

Tabelle 6 Pipettierschema für FANCF und HPRT, Endvolumen 40 µl

Vol	Substanz (Konzentration)
15,0 µl	TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)
1,5 µl	Gene Expression Assay Mix (20X)
13,5 µl	H ₂ O
4,0 µl	cDNA (500 ng)
30,0 µl	

Tabelle 7 Pipettierschema für FANCF und HPRT, Endvolumen 30 µl

Für 18S RNA wurde zunächst der 20x *Assay Mix* zu einem 10x *Assay Mix* verdünnt. Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 40 µl ausgeführt (siehe Tabelle 8):

Vol	Substanz
20,0 µl	TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)
6,0 µl	Gene Expression Assay Mix (10X)
10,0 µl	H ₂ O
4,0 µl	cDNA
40,0 µl	

Tabelle 8 Pipettierschema für 18S RNA, Endvolumen 40 µl

Die Reaktion wurde im TaqMan® unter den in Tabelle 9 beschriebenen Bedingungen durchgeführt:

Stage	Repetitions	Temperature	Time (min)	RampRate
1	1	50 °C	02:00	100
2	1	95 °C	10:00	100
3	45	95 °C	00:15	100
		60 °C	01:00	100

Tabelle 9 TaqMan®-Bedingungen

3.2.3.3 Prinzip der TaqMan®- Reaktion

Die TaqMan® MGB probe enthält eine Reporter dye (6-FAM), die mit dem 5' Ende der Sonde verknüpft ist, einen minor groove binder (MGB) und einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3' Ende der Sonde (siehe Abbildung 8). MGBs erhöhen die Schmelztemperatur, ohne die Sonde zu verlängern. So lange die Sonde intakt ist, unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) [SCHILD, 1998].

Reporter und Quencher werden von der TaqMan® Sonde durch die 5'-3' Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgespalten und so voneinander getrennt, wenn

während der Reaktion die Zielsequenz („*target*“) vorhanden ist. Durch diese Trennung fluoresziert der *Reporter* stärker. Die Anreicherung des PCR-Produkts wird direkt durch Aufzeichnung der erhöhten Fluoreszenz nachgewiesen. Ein verstärktes Fluoreszenz-Signal kann nur detektiert werden, wenn die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und während der Reaktion amplifiziert wird. So wird der Nachweis unspezifischer Amplifizierungen verhindert. Das Fluoreszenzsignal ist sequenzspezifisch, da Sondenmoleküle, die nicht vollständig an das *target* binden, verdrängt werden, bevor die Exonukleaseaktivität der Polymerase aktiviert wird. Um eine Verlängerung der Sonde während der PCR-Reaktion zu verhindern, ist ihr 3' Ende durch einen Phosphatrest blockiert. [SCHILD, 1998]. Abbildung 8 zeigt das Prinzip der TaqMan®-Reaktion.

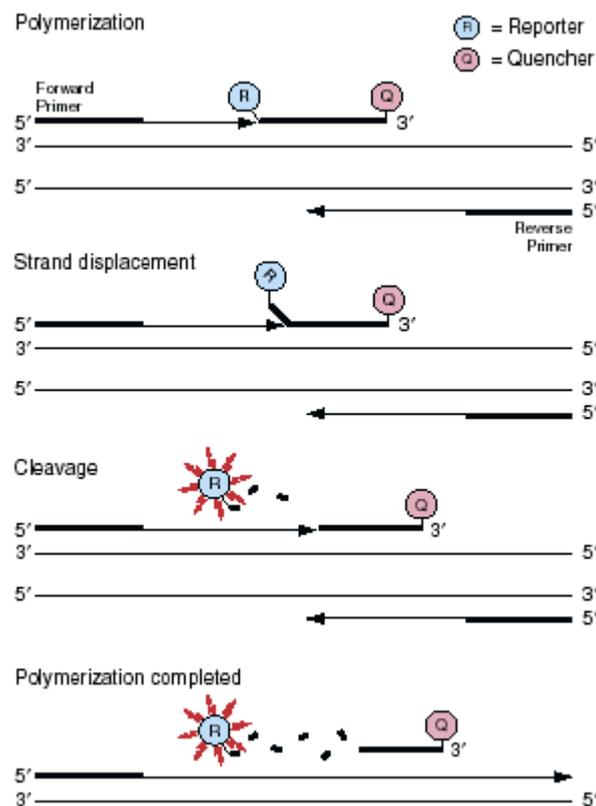


Abbildung 8 5'-3' Prinzip der TaqMan®-Reaktion [aus APPLIED BIOSYSTEMS; 2002, S. 6]

3.2.3.4 **Relative Quantifizierung der Genexpression mittels „Comparative Ct-Method“**

Die Genexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels relativer Quantifizierung mit der vergleichenden Ct-Methode („*comparative Ct-method*“) bestimmt. Dabei werden die Daten der Proben als die x-fache Veränderung der Genexpression, normalisiert gegen eine endogene Referenz und relativ zu einem Kalibrator, präsentiert [LIVAK & SCHMITTGEN, 2001]. Vorteil dieser Methode ist, dass keine Standardkurve benötigt wird.

Voraussetzung für die Anwendung der *Comparative-Ct*-Methode ist, dass die Effizienzen für die Amplifizierung von Zielgenen und endogener Kontrolle ungefähr gleich sind. Für die von Applied Biosystems hergestellten und optimierten TaqMan® *Gene Expression Assays* liegt die Effizienz bei annähernd eins [APPLIED BIOSYSTEMS, 2001]. Auf die Ermittlung der Effizienz mit Hilfe von Standardkurven wurde auf Anraten von Herrn Dr. Rügus, Produktspezialist der Firma Applied Biosystems verzichtet, da diese erfahrungsgemäß zu ungenau sind.

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt nach dem PCR-Schritt durch den Vergleich der *Cycle threshold*-Werte (Schwellenwert-Zyklen, Ct-Werte), die mit dem Auto-Ct-Modus der AIB Software ermittelt wurden. Der Ct-Wert gibt an, wie viele Zyklen der jeweilige PCR-Ansatz benötigt, bis das Fluoreszenzsignal einen zuvor definierten Schwellenwert, den so genannten *Cycle threshold* oder Schwellenwert-Zyklus schneidet. Man bedient sich dieses Wertes, um die in einer zu Beginn der PCR in einer Probe vorhandene Menge an cDNA-Molekülen zu quantifizieren. Ein quantifizierbarer Anstieg des PCR-Produkts und somit der Fluoreszenz ist nur in der exponentiell ansteigenden Phase der PCR möglich.

Von der Menge der zu Beginn der PCR eingesetzten cDNA-Moleküle (*targets*) hängt die Zahl der PCR-Zyklen ab, die benötigt werden um den Ct-Wert zu erreichen [SCHILD, 1998]. Proben, die mehr cDNA enthalten, was einer höheren mRNA Menge und somit einer höheren Genexpression entspricht, erreichen diesen Schwellenwert-Zyklus also schneller als Proben mit einer geringeren Ausgangsmenge an cDNA.

Um eine relative Quantifizierung der Genexpression durchzuführen sind zunächst die Normalisierung der Proben gegen eine endogene Kontrolle sowie die Normalisierung der Proben gegen eine Kalibratorprobe (Kalibrierung) notwendig. Als Kalibrator wurde das Normalgewebe verwendet.

Die Normalisierung der Proben gegen ein Referenzgen dient dazu, Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge, der RNA-Qualität und der Effizienz der Reverse Transkriptase-Reaktion auszugleichen. Die endogene Kontrolle reflektiert also den cDNA-Gehalt pro Probe. Man verwendet hierfür Gene, die ubiquitäre Basisfunktionen in der Zelle kodieren und somit in allen Zellen aktiv sind und in allen Proben gleich exprimiert werden sollen („*Housekeeping Genes*“) [WIEDEMANN ET AL, 2004].

Im Rahmen einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Doktorarbeit wurden Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), 18S ribosomale RNA, GUS β , ALAS1 und β 2-Mikroglobulin auf ihre Eignung als *Housekeeper* untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit führten uns zusammen mit den Ergebnissen von DE KOK et al [2005] zu dem Entschluss, HPRT als *Housekeeper* zu verwenden.

Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgt nach Ermittlung der Mittelwerte der Ct-Werte aus Triplikaten für jedes Gewebe und jedes Referenzgen in folgenden Schritten von APPLIED BIOSYSTEMS 2001 veröffentlichten Schritten:

1. Normalisierung der Proben durch Berechnung des Δ Ct-Werts:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{endogene Kontrolle}}$$

2. Kalibrierung der Proben durch Berechnung des $\Delta\Delta$ Ct-Werts:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$$

3. Berechnung der relativen Expression:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ gibt also die Menge des Zielgens, normalisiert gegen eine endogene Referenz und relativ zu einem Kalibrator wieder. Für den Kalibrator ergibt $\Delta\Delta\text{Ct}$ immer null. Somit ist die relative Genexpression für diese Probe immer eins ($2^0 = 1$). Für die anderen Proben ergibt die $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Berechnung die x-fache Veränderung der Genexpression relativ zur Kalibratorprobe. Die Tumorproben zeigen also eine höhere oder niedrigere Expression des untersuchten Gens als der Kalibrator (das Normalgewebe).

Die Verwendung von Triplikaten ermöglicht es, die Genauigkeit der PCR-Amplifikation und der Nachweisschritte sowie die Homogenität der Probe (*template*) zu kontrollieren. Zudem kann überprüft werden, wie akkurat pipettiert worden ist [LIVAK & SCHMITTGEN, 2001] und die Korrektur von potentiellen Ungenauigkeiten oder Fehlern beim Pipettieren der Platten ist möglich. Aus den Ct-Werten der Triplikate wird der Mittelwert berechnet. Dieser wird dann für die Berechnung der relativen Genexpression eingesetzt. Die Standardabweichung für die identischen Replikate sollte unter 0,3

liegen, um eine akkurate Berechnung der Genexpression zu gewährleisten. Für die Messung von niedrig-gradigen Unterschieden sollte nur eine möglichst geringe Varianz der Ct-Werte der Triplikate toleriert werden [APPLIED BIOSYSTEMS, 2004]. Die Standardabweichung für die aus den Triplikaten berechneten Mittelwerte wird jeweils für *Target* und endogene Kontrolle errechnet. Für ΔCt ergibt sich die Standardabweichung aus den Standardabweichungen von *Target* und Kontrolle nach folgender Formel:

$$Sd_{\Delta Ct} = \sqrt{Sd_{target}^2 + Sd_{control}^2}.$$

Die Berechnung von $\Delta\Delta Ct$ beinhaltet die Subtraktion des ΔCt -Werts des Kalibrators. Da es sich dabei um eine willkürliche Konstante handelt, ist die Standardabweichung für $\Delta\Delta Ct$ gleich der Standardabweichung des ΔCt -Werts. Die Varianz für die relative Expression ($=2^{-\Delta\Delta Ct}$) errechnet sich nach den Formeln $2^{-\Delta\Delta Ct - sd\Delta Ct}$ und $2^{-\Delta\Delta Ct + sd\Delta Ct}$ [APPLIED BIOSYSTEMS, 2001].

Rechenbeispiel:

9T	Av Ct <i>target gene</i>	= 30,801;	Sd _{target}	= 0,067	
	Av Ct <i>endogenous control</i>	= 29,809;	Sd _{control}	= 0,092	
Normalgewebe	Av Ct <i>target gene</i>	= 28,457;	Sd _{target}	= 0,083	
	Av Ct <i>endogenous control</i>	= 25,593;	Sd _{control}	= 0,050	

Berechnung der relativen Genexpression für die Tumorprobe 9T

1. $\Delta Ct_{sample} = Av Ct_{target gene} - Av Ct_{endogenous control} = 30,801 - 29,809 = 0,992$
2. $\Delta Ct_{calibrator} = Av Ct_{target gene} - Av Ct_{endogenous control} = 28,457 - 25,593 = 2,864$
3. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Kalibrator} = 0,992 - 2,864 = -1,872$
4. Relative Expression = $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(-1,872)} = 3,660$

Berechnung der Standardabweichung für die Tumorprobe 9T:

$$5. Sd \Delta Ct_{sample} = \sqrt{Sd_{target}^2 + Sd_{control}^2} = \sqrt{0,067^2 + 0,092^2} = 0,114$$

Berechnung der Spannweite der Expression der Tumorprobe 9T:

6. $2^{-\Delta\Delta Ct - sd\Delta Ct} = 2^{-(-1,872 - 0,114)} = 3,383$
- $2^{-\Delta\Delta Ct + sd\Delta Ct} = 2^{-(-1,872) + 0,114} = 3,961$

Die Tumorprobe 9T zeigt also eine im Mittel 3,66-mal höhere relative Expression von FANCF im Vergleich zum als Kalibrator verwendeten Normalgewebe, wobei die Standardabweichung $\pm 0,114$ beträgt.

3.2.4 Methylierung

3.2.4.1 Bisulfitreaktion

Die DNA wird mit Natriumbisulfit behandelt. Dadurch werden unmethylierte Cytosine in Einzelstrang-DNA in Uracil umgewandelt. Die Reaktion erfolgt unter Bedingungen, bei denen methylierte Cytosine (5mC) nicht reagieren. Das heißt, dass alle nach der Behandlung verbliebenen Cytosinreste in der Sequenz zuvor methylierte Cytosine repräsentieren.

Die Bisulfitreaktion erfolgt in drei Schritten:

1. Sulfonierung: Anlagerung von Bisulfit an die 5-6-Doppelbindung von Cytosin
2. Hydrolytische Desaminierung des Uracil-Bisulfit-Derivats, dadurch entsteht ein Uracil-Bisulfit-Derivat
3. Alkali-Desulfonierung: Durch eine nachfolgende Alkalibehandlung wird die Sulfonatgruppe entfernt, es entsteht Uracil [CLARK et al, 1994]

Die Bisulfitbehandlung der DNA wurde mit Hilfe des EZ DNA Methylation Kit™ (Zymo Research, Orange, CA, USA) durchgeführt. Für diese Doktorarbeit wurden 1 µg DNA in das Kit eingesetzt.

3.2.4.2 Positivkontrolle für komplette Methylierung

Für die Methylierungs-spezifische PCR und den *PCR-based HpaII restriction enzyme assay* wurden jeweils Positivkontrollen hergestellt. Mit Hilfe der CpG-Methylase (M.Sss I) (New England Biolabs, Beverly, MA) wurde normale lymphozytäre DNA (aus Blut von Normalpatienten) supermethyliert. Die CpG-Methylase erkennt innerhalb der Doppelstrang-DNA 5'...CG...3'-Sequenzen und methyliert Cytosine am C5. Als Donor von Methylgruppen dient S-Adenosylmethionin (SAM) (siehe Abbildung 9).

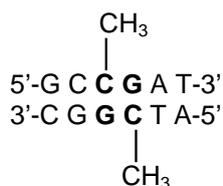


Abbildung 9 Die CpG-Methylase erkennt 5'... CG ...3'-Sequenzen und methyliert Cytosin an C5

Für die Positivkontrolle der Methylierungs-spezifischen PCR wird 1 µg normaler genomischer DNA mit 1x NE Buffer 2 und 1 U CpG Methylase in einem Endvolumen

von 20 µl über Nacht bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten null Stunden, vier Stunden und acht Stunden werden jeweils 160 µM SAM zu der Probe gegeben. Nach der Inkubation erfolgt eine Hitzeinaktivierung für 20 Minuten bei 65°C. Die so gewonnene methylierte DNA wird mit Hilfe einer Ethanol-fällung gereinigt. Anschließend werden die Bisulfitbehandlung und die Methylierungs-spezifische PCR durchgeführt.

3.2.4.3 Methylierungs-spezifische PCR (MSP)

Bei der Methylierungs-spezifischen PCR wird die gewünschte Sequenz der zuvor bisulfit-behandelten DNA mittels spezifischer Primer für bisulfit-modifizierte DNA amplifiziert. Zur Anwendung kommen zwei *Primer*-Pärchen: Das eine Paar ist spezifisch für unmethylierte, bisulfitbehandelte DNA (U), das zweite Paar für methylierte bisulfitbehandelte DNA (M). Die in dieser Arbeit verwendeten *Primer* (siehe Tabelle 10) wurden von TANIGUCHI et al 2003 an Ovarialkarzinom-Zelllinien getestet. Bei der methylierten DNA bleiben die Cytosine in den „CpG islands“ durch die Methylierung des 5'-Kohlenstoffs erhalten. Bei der unmethylierten DNA sind die Cytosine durch die Bisulfitreaktion zu Uracil geworden. Uracil verhält sich wie Thymin, bindet also an Adenosin. Dementsprechend unterscheiden sich die korrespondierenden *Primer*-Sequenzen darin, dass in den *Primern* für unmethylierte DNA Cytosin im *Forward-Primer* durch Thymin und Guanin im *Reverse-Primer* durch Adenosin ersetzt ist.

<i>Forward Primer</i>	
FF 280M	5'-TTT TTG CGT TTG TTG GAG AAT CGG GTT TTC-3'
FF 280U	5'-TTT TTG TGT TTG TTG GAG AAT TGG GTT TTT-3'
<i>Reverse Primer</i>	
FR 432M	5'-ATA CAC CGC AAA CCG CCG ACG AAC AAA ACG-3'
FR 432U	5'-ATA CAC CAC AAA CCA CCA ACA AAC AAA ACA-3'

Tabelle 10 Primer für Methylierungs-spezifische PCR

Jede PCR, die im Rahmen der MSP durchgeführt wurde, enthielt in einem Endvolumen von 50 µl 250 ng genomische DNA, 2,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, je 500 nM Forward-Primer und Reverse-Primer sowie 1 U Polymerase.

Für die untersuchte Sequenz des FANCF-Promoters mit den Primern FF280 und FR432 entsteht ein Amplikon von 152 bp Länge. Je Probe wurden zwei Ansätze gemacht, einer mit den Primern für methylierte DNA (M) und einer mit den Primern für unmethylierte DNA (U) (siehe Tabelle 10). Anschließend wurden die Proben auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Für die Amplifizierung der untersuchten Sequenz von FANCF wurde eine PCR im *Touch Down*-Modus durchgeführt, da sich bei herkömmlichen PCR-Methoden nicht genügend Produkt ergab (siehe Tabelle 11 a und b).

a

	Temperatur	Zeit (min)
1	94,0°C	05:00
2	95,0°C	00:30
3	60,0°C	00:30
	-0,4°C	per cycle
4	72,0°C	00:30
5	Go to 2	12 times
6	95°C	00:30
7	50°C	00:30
8	72,0°C	00:30
9	Go to 6	30 times
10	72,0°C	07:00
11	4,0°C	Forever
12	End	

b

	Temperatur	Zeit (min)
1	94,0°C	05:00
2	95,0°C	00:30
3	64,0°C	00:30
	-0,5°C	per cycle
4	72,0°C	00:30
5	Go to 2	18 times
6	95°C	00:30
7	50°C	00:30
8	72,0°C	00:30
9	Go to 6	30 times
10	72,0°C	07:00
11	4,0°C	Forever
12	End	

Tabelle 11 a Touch Down-Modus TD-NEW; **b** Touch Down-Modus TD-High

3.2.4.4 Etablierung eines PCR-based HpaII restriction enzyme assay

Isoschizomere sind Restriktionsendonukleasen, die die gleiche Zielsequenz erkennen und dort auf die gleiche Weise den DNA-Doppelstrang schneiden. Für die Untersuchung der DNA-Methylierung können Isoschizomere verwendet werden, die sich in ihrer Sensitivität gegenüber Methylierung unterscheiden. Der *HpaII restriction enzyme assay* basiert auf dem Gebrauch der Isoschizomere HpaII und MspI. Beide erkennen und schneiden die Sequenz CCGG, reagieren jedoch unterschiedlich auf eine Methylierung (m5CpG) des inneren Cytosins. MspI kann sowohl die unmethylierte als auch die methylierte Sequenz schneiden, während eine Restriktion der Sequenz mit HpaII nur möglich ist, wenn das innere Cytosin nicht methyliert ist.

Für den *PCR-based HpaII restriction enzyme assay* wird zunächst die Restriktion durchgeführt. Dabei wird die DNA-Probe in je einem Ansatz mit HpaII bzw. mit MspI verdaut. Ein dritter Ansatz, der kein Enzym enthält, dient als Kontrolle. Im Anschluss an den Verdau werden die Proben gereinigt und anschließend in 20 µl H₂O resuspendiert. Der zweite Schritt besteht aus einer PCR der gereinigten Restriktionsansätze mit spezifischen Primern. Die Primer FF330for (5'-CCTGGTGCAGCAACTCTTTC-3') und FR759rev (5'-GCGACAAA GGCAGCAAAGA-3') [TANIGUCHI 2003] überspannen

eine Sequenz, die aus 430 Basenpaaren besteht und fünf Erkennungsequenzen (CCGG) für die Restriktionsendonukleasen HpaII und MspI überspannt.

Ein PCR-Ansatz enthielt 1,5 mM MgCl₂, 100 µM Deoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), je 500 nM *Forward-* und *Reverse-Primer* und 1 U Polymerase (*Expand High Fidelity Enzyme Mix*). Die PCR wurde mit dem von TANIGUCHI et al [2003] beschriebenen Programm (siehe Tabelle 12) durchgeführt.

Anschließend wurden die PCR Produkte nebeneinander auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen. Da MspI DNA unabhängig vom Methylierungsstatus schneidet und HpaII nur unmethylierte CCGG-Sequenzen schneiden kann, kann anhand der Banden auf dem Gel zwischen methylierten und unmethylierten Proben unterschieden werden.

Um einen *PCR-based HpaII restriction enzyme assay* zu etablieren wurden Ansätze mit verschiedenen Reaktionsvolumina und DNA-Konzentrationen (genomische lymphozytäre DNA von Normalpatienten) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten getestet. Die Restriktion wurde in Volumina von 50, 200 und 300 µl mit 50, 100 und 200 ng DNA durchgeführt. Die Ansätze wurden über Nacht (16 Stunden) oder 24 Stunden lang inkubiert.

	Temperatur	Zeit (min)
1	94,0°C	00:45
2	94,0°C	00:45
3	61,0°C	01:00
4	72,0°C	02:00
5	Go to 2	32 times
6	72,0°C	09:00
7	4,0°C	Forever
8	End	

Tabelle 12 PCR-Programm FANCREs nach TANIGUCHI et al, 2003

3.2.4.5 Methylierungs-spezifische Sequenzierung

Die Methylierungs-spezifische Sequenzierung wurde an vier Proben von Ovarialtumoren (Muc 3T und 12T, Kiel 1 und 2), einer Probe eines extraovariellen Tumors (Muc 3ex) sowie einer Kontrollprobe (DNA von Lymphozyten einer gesunden Frau) vorgenommen.

Zunächst wurde eine Bisulfitbehandlung durchgeführt. Anschließend wurde eine PCR mit den für unmethylierte DNA spezifischen *MSP-Primern* FF280 U und FR 432 U mit

dem bei der Methylierungs-spezifischen PCR beschriebenen PCR-Bedingungen im *Touch Down*-Modus „TD-High“ (siehe Tabelle 11 b) durchgeführt. Jede PCR enthielt in einem Endvolumen von 50 µl 250 ng genomischer DNA, 2,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, je 500 nM Forward-Primer und Reverse-Primer sowie 1 U Polymerase.

Im Anschluss daran wurde eine PCR (PCR-Programm siehe Tabelle 4) mit den von TANIGUCHI et al. 2003 beschriebenen Sequenzierungs-Primern FF183b For (Nukleotide +183 bis +209) und FR 473b REV (Nukleotide +445 bis + 474) (siehe Tabelle 13) durchgeführt.

Anschließend wurden die Proben gereinigt. Dazu wurde in *Vials* auf der Millipore-Platte „MANU 30 PCR“ je 150 µl H₂O vorgelegt. Darauf wurden 50 µl der jeweiligen Probe pipettiert und anschließend wurden weitere 100 µl H₂O zugegeben und die Proben wurden gemischt. Die Proben wurden dann in der Vakuumzentrifuge circa 5 Minuten lang zentrifugiert. Dann wurden die Proben mit 30 µl H₂O resuspendiert und in neue Platten überführt. Nachdem man sich in der Gelelektrophorese versichert hatte, dass in den Ansätzen tatsächlich Amplikon enthalten war, wurde eine Ethanol-Fällung der Proben durchgeführt. Dann erfolgte eine weitere Zentrifugation der Proben bei 3000 g und 20°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Proben wurden 1 Minute lang trocken zentrifugiert (600 g, 20°C). Die Resuspendierung der gereinigten Proben erfolgte in 40 µl H₂O. Für die Methylierungs-spezifische Sequenzierung wurden davon 25 µl verwendet.

<i>Forward Primer</i>	
FF183b	5'-GTT GTA TAA TTA GTG GAG GTA AGA GGG-3'
<i>Reverse Primer</i>	
FR 473b	5'-CTA AAA ATT TAA ATT CTC TCT ATA ACC ATT-3'

Tabelle 13 *Primer* für die Bisulfitsequenzierung [TANIGUCHI et al, 2003]

Die Sequenzierung wurde auf dem ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer der Arbeitsgruppe von Professor Meindl von Heide Hellebrand durchgeführt. Es wurden Proben nach der PCR mit den MSP-Primern für unmethylierte DNA FF280U und FR432U sequenziert. Zudem wurden Ansätze sequenziert, bei denen im Anschluss an die MSP eine weitere PCR mit den Sequenzierungsprimern FF183b und FR437b [TANIGUCHI et al, 2003] durchgeführt worden war (siehe Tabelle 14).

Nummer	Probe	PCR-Bedingungen
1	Muc 3T	PCR nur mit MSP-Primern
2	Muc 3ex	
3	Muc 12T	
4	Kiel 1#	
5	Kiel 2#	
6	Roche 54	
7	Kiel 1#	1. PCR mit MSP Primern 2. PCR mit Sequenzierungsprimern
8	Kiel 2#	
9	Muc 12T	
10	Roche 54	

Tabelle 14 Auflistung der Proben für die Bisulfidsequenzierung

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung von allelischen Imbalanzen auf Chromosom 11p

LOH-Analysen der Region 11p15.5 bis 11p11.2 wurden mit insgesamt elf Di- und Tetrarepeatmarkern an DNA von 44 Ovarialtumorproben, von drei korrespondierenden extraovariellen Tumorgeweben und von korrespondierenden Normalgeweben (normales Peritoneum) auf der IP-RP-HPLC durchgeführt. Ein Teil der Proben stammt aus einem mittels Comparative Genome Hybridisation (CGH) voruntersuchten Kollektiv aus der Universitätsfrauenklinik Kiel, Prof. N. Arnold [KIECHLE et al, 2001]. Bei 25 dieser Proben war in der CGH ein Verlust chromosomalen Materials unter anderem in der Region 11p nachgewiesen worden [JACOBSEN, 2000]. In einer vorangegangenen Doktorarbeit wurde bei diesem Kollektiv eine Feinkartierung der Region 11p15 - 11p13 durch 15 Mikrosatellitenmarker vorgenommen [HAUENSTEIN, 2005]. Dieses Kollektiv wurde um sechs in der CGH voruntersuchte, unauffällige Proben aus Kiel (Prof. Dr. Arnold, unpublizierte Daten) und 17 nicht voruntersuchte Proben aus dem Probenkollektiv der Frauenklinik der TU München erweitert (siehe Tabelle 2).

Ziel der Mikrosatellitenanalysen waren die Feinkartierung des kurzen Arms von Chromosom 11 und die Suche nach kleinsten überlappenden LOH-Intervallen für die Identifizierung von potentiellen Tumorsuppressorgenen für maligne Ovarialtumoren.

4.1.1 Auswahl & Etablierung von Mikrosatellitenmarkern für die Region 11p15.5 bis 11p11.2

Von den in der Doktorarbeit von HAUENSTEIN [2005] etablierten 15 Mikrosatellitenmarkern wurden fünf Tetrarepeatmarker (TH01, ST5, UT691, UT1916 und GATA48) und zwei Direpeatmarker (CA 14 und CA21) ausgewählt, die bei der Untersuchung mit der IP-RP-HPLC gut interpretierbare Chromatogramme geliefert hatten. Zudem wurden vier weitere Direpeatmarker (AFM131, AFM255, AFM298 und AFM344) etabliert. Diese insgesamt elf Mikrosatellitenmarker (siehe Tabelle 15) überspannen den gesamten kurzen Arm von Chromosom 11 und reichen vom Telomer (11p15.5) bis 11p11.2 (siehe Abbildung 10). Das entspricht einer Region von circa 54,25 Megabasen. TH01 liegt mit 2,15 Megabasen Abstand dem Telomer am nächsten. AFM344 hat mit 56,4 Megabasen den größten Abstand zum Telomer.

Marker	D-Nummer	gdb Accession ID	Abstand vom Telomer (MB)	Art des Markers Fragment- länge (bp)	Max. Hetero- zygosi- tät (%) (gdb)	Primersequenz	Schmelz- temperatur der Primer (°C)
TH01	-	212652	2,15	Tetratepeat 179-203	77,3	5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT 5'-ATTCAAAAGGTATCTGGGCTCTGG	63
ST5	-	196698	8,7	Tetratepeat 68-72	54	5'-GACTGGCAGCGGGGACCTCA 5'-AGCCAAACCACCTGATCTTCC	62,9
UT691	D11S1901	312618	15,3	Tetratepeat minimal 300	62,5	5'-CTGAGGTTGTGCTACTGCA 5'-TGCCTGATTAGGGTAAGTTC	55,5
CA 14	-	-	22	Direpeat 183-205	-	5'-GGCAATCCCTCTACACACC 5'-TCTCCATCCCTACTGCCA	58,8
CA 21	-	-	24,4	Direpeat 145-159	-	5'-TAGGTGACTTATGTAAGGTCG 5'-ATTGAGAAGGATCTTGTCTG	55,9
UT1916	D11S1301	198782	33,8	Tetratepeat minimal 336	85,71	5'-GGCAACAGAGTGAGACTCA 5'-GTGTTCTTTTATGTGATGTTCC	55,5
GATA 48E08	D11S2008	685020	34,6	Tetratepeat minimal 135	-	5'-CATCCATCTCATCCCATCAT 5'-TTCACCCTACTGCCAACCTTC	55,5
AFM255ye1	D11S986	195001	44,7	Direpeat 137-169	81	5'-GAAGGACTCGGCTCCAG 5'-GTAAGAGGATGGTAGGAGGG	68,5
AFMa131xd5	D11S1361	200124	44,91	Direpeat minimal 208	48,21	5'-ATCTCAATGCCCTGTTAGGATTACC 5'-AGTCAATTTTCATGCTCTGGAAG	58
AFM298vc9a	D11S1344	200190	46,1	Direpeat minimal 285	81	5'-CCCTGAACCTCTGCATTACAC 5'-GGCCCTGGCTTGTACATATA	57
AFM344zg1	D11S1357	200057	56,4	Direpeat Minimal 133	67,47	5'-CTCCACCTCATTTTGTGTTG 5'-GGCCCTCTGAGAGACAT	53

Tabelle 15 Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker

Die bereits etablierten Marker wurden nur mit der IP-RP-HPLC untersucht. Da Direpeatmarker zum Auftreten von Stotterbanden neigen und daher zum Teil schlecht interpretierbare Ergebnisse liefern, wurden diejenigen neuen Marker, die sich mit der IP-RP-HPLC nicht gut auswerten ließen, zusätzlich mittels Kapillarelektrophorese untersucht.

Für die Analyse der Tumorproben mussten die PCR-Bedingungen für die Mikrosatellitenmarker optimiert werden. Um die optimale Temperatur für das *Annealing* der Primer zu ermitteln wurde zunächst der Mittelwert der für den *Forward*- und den *Reverseprimer* angegebenen Temperaturen getestet und gegebenenfalls nach oben oder unten korrigiert. Außerdem wurde die Magnesiumchlorid-Konzentration von 1,5 bis 2,5 mM variiert.

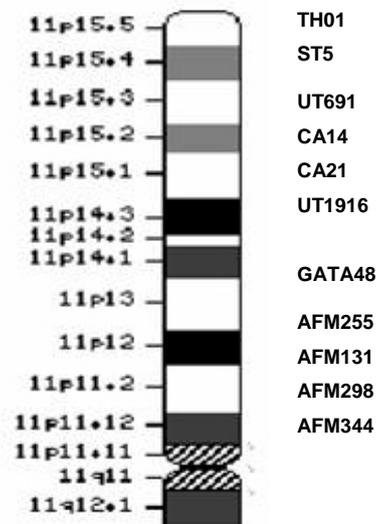


Abbildung 10 Marker für die Untersuchung der Region 11p15.5 bis 11p11.2

4.1.2 Allgemeines zur Interpretation der LOH-Intervalle

Innerhalb eines Tumorgewebes befindet sich ein gewisser Prozentsatz an Normalgewebe. Gewebe von hochgradigen Ovarialtumoren enthält in der Regel mindestens 80% Tumorzellen [GROSS et al, 2007]. Ob für eine Probe ein *Loss of Heterozygosity* vorliegt, kann man durch den Vergleich der Chromatogramme für die Tumor-DNA und die zugehörige Normal-DNA bestimmen. Unter den oben genannten Voraussetzungen sollte so ein *Loss of Heterozygosity* eindeutig nachweisbar sein. Bei den meisten der gewählten Tetrarepeatmarker kann ein LOH bei deutlicher Reduktion eines Allels auf den ersten Blick erkannt werden.

Als Grenze für das Vorliegen eines LOHs wurde nach CLETON-JANSEN et al [2001] die Reduktion eines Allels um 40% definiert. In der Praxis wird selten ein LOH von 100% beobachtet, da der Tumor in der Regel einen bestimmten Anteil nichtmaligner Zellen enthält oder in sich heterogen ist und nicht bei allen Tumorzellen das gleiche Ereignis aufgetreten ist [TOMLINSON et al, 2002; GROSS et al, 2007].

4.1.3 Schematische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Untersuchungen

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse der LOH-Untersuchungen aufgelistet (siehe Tabelle 16 und Tabelle 18) und schematisch dargestellt (siehe Tabelle 17 und Tabelle 19).

In den meisten Fällen waren die Proben gut mittels IP-RP-HPLC auswertbar. In einzelnen Fällen zeigte sich eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von dHPLC und Kapillarelektrophorese. Die Kapillarelektrophorese für Direpeatmarkern eine etwas höhere Trennschärfe, so dass im Falle von unterschiedlichen Ergebnissen für die Gesamtbeurteilung und die Erstellung der Farbtabelle die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese herangezogen wurden.

Alle Proben außer den Proben 35 - 38 aus Kiel und der Probe Mü 7 zeigen allelische Imbalancen. Allein der Tumor Mü 7 zeigt keinerlei Ereignisse, wobei für fünf Marker keine reproduzierbar auswertbaren Chromatogramme vorliegen, bei der korrespondierenden Netzmetastase jedoch für zwei dieser nicht analysierbaren Marker ein Ereignis nachweisbar ist. Bei den Patientinnen Mü 2, Mü 3 und Mü 7 liegen jeweils Gewebe vom Ovarialtumor und korrespondierendes Tumorgewebe von Netzmetastasen vor. Dabei zeigen die Netzmetastasen für alle Marker mit den Proben der zugehörigen Ovarialtumoren übereinstimmende Ergebnisse. Eine Ausnahme bildet der Marker UT1916 bei Patientin Mü 2: Beim Gewebe des Ovarialtumors ist UT1916 heterozygot, während der AIF der Netzmetastase mit einem Wert von 1,94 auf ein LOH hinweist. Dieses Ergebnis war auch in mehreren Wiederholungen der Untersuchung reproduzierbar. Möglicherweise liegt also bei einem der beiden korrespondierenden Gewebe ein im Rahmen der Tumorprogression aufgetretenes zusätzliches Ereignis vor.

Bei den Proben Kiel 35 - 38, bei denen mit der Methode der CGH keine Auffälligkeiten von Chromosom 11p nachweisbar waren (Prof. Dr. Arnold, unpublizierte Daten), liegen nur für den Marker AFM255 LOHs vor. Für die übrigen Marker sind entsprechend den CGH-Ergebnissen keine Ereignisse nachweisbar. Die Kieler Proben 39 und 40 zeigen entgegen ihrer in der CGH unauffälligen Resultate für 5 beziehungsweise 6 der verwendeten Marker ein Ereignis.

Tumor Position	AFM 255 44,7	AFM 131 44,91	AFM 298 46,1	AFM298 KE	AFM 344 56,4	AFM344 KE
1	Ni	n.b.	LOH *	LOH 9,0	LOH *	n.b.
2	n.b.	n.b.	LOH *	LOH 5,1	LOH *	LOH 2,6
3	het	n.b.	het	het 0,99	het	het 1,03
4	LOH *	LOH 0,47	het	het 0,97	Ni	Ni
5	het	Ni	het	het 1,04	het	het
7	LOH *	Ni	het	het 1,02	het	het
9	LOH *	Ni	LOH *	LOH 4,02	Grau 1,4	het 0,93
10	LOH *	Ni	LOH *	Grau 1,63	LOH *	LOH 1,82
11	het	Ni	het	het	Ni	Ni
12	het	Ni	LOH *	LOH *	het	het
13	het	n.b.	het	het 0,99	het	Grau 1,6
14	LOH *	n.b.	Ni	Ni	het	het
15	LOH *	Ni	LOH *	LOH 3,3	LOH *	LOH 2,9
16	het	het	LOH *	LOH 1,74	Ni	Ni
17	LOH *	Ni	LOH *	Grau 1,5	Ni	Ni
18	het	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
20	het	Ni	LOH *	LOH 21,2	het	het
23	het	n.b.	het	het	het	het
25	LOH *	n.b.	het	het 1,0	Ni	Ni
28	het	Grau 0,60	LOH *	LOH 2,1	het	n.b.
30	het	n.b.	het	n.b.	het	het 1,4
31	het	Ni	LOH *	het 1,1	het	het
32	LOH *	LOH 3,0	LOH *	LOH 1,75	LOH	LOH 3,2
33	het	n.b.	Ni	Ni	Ni	Ni
34	het	n.b.	het	het	het	het 0,95

Tabelle 16 Ergebnisse der LOH-Analyse mit dHPLC und Kapillarelektrophorese (KE) für die Proben Kiel 1 - 34: LOH = Loss of Heterozygosity, LOH* = nicht berechenbares, deutlich sichtbares LOH, het = heterozygot, Ni = nicht informativ, Grau = grauer Bereich, n.b. = nicht bestimmt.

Tumor		AFM255	AFM131	AFM298	AFM344
<i>Position (MB)</i>		<i>44,7</i>	<i>44,91</i>	<i>46,1</i>	<i>56,4</i>
K	1	Yellow		Red	Orange
K	2			Red	Orange
K	3	Blue		Blue	Blue
K	4	Orange	Orange	Blue	Yellow
K	5	Blue	Yellow	Blue	Blue
K	7	Orange	Yellow	Orange	Blue
K	9	Orange	Yellow	Orange	Orange
K	10	Orange	Yellow	Orange	Orange
K	11	Blue	Yellow	Blue	Yellow
K	12	Blue	Yellow	Orange	Blue
K	13	Blue		Blue	Grey
K	14	Orange	Yellow	Yellow	Blue
K	15	Orange	Yellow	Orange	Orange
K	16	Blue	Blue	Orange	Orange
K	17	Orange	Yellow	Grey	Yellow
K	18	Blue	Yellow	Yellow	Yellow
K	20	Blue	Yellow	Red	Blue
K	23	Blue		Blue	Blue
K	25	Orange		Blue	Yellow
K	28	Blue	Grey	Red	Blue
K	30	Blue		Blue	Blue
K	31	Blue	Yellow	Blue	Blue
K	32	Orange	Orange	Orange	Orange
K	33	Blue		Yellow	Yellow
K	34	Blue		Blue	Blue

Yellow	Ni
Blue	het
Grey	Grauer Bereich
Red	LOH > 5
Orange	LOH 1,7 - 5 & nicht berechenbare LOH
White	nicht bestimmt

Tabelle 17 Schematische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Analyse mit den 11 verwendeten Mikrosatellitenmarkern für die Proben Kiel 1 - 34. Blau = heterozygot, Grau = grauer Bereich, Rot = LOH, AIF>5, Orange = LOH 1,7 – 5 und nicht berechenbares LOH, Gelb = Nichtinformativ

Tumor	TH01	ST5	UT 691	CA14	CA21	UT 1916	GATA 48	AFM 255	AFM 131	AFM 298	KE	AFM 344	KE
K 35	het	het	het	het	Ni	het	Ni	het	Ni	n.b.	LOH	Ni	LOH
K 36	het	het	het	het	het	het	het	LOH*	n.b.	het	het 1,1	het	het 1,1
K 37	Ni	het	het	het	het	Ni	het	LOH*	n.b.	het	het 0,98	Ni	het 0,98
K 38	het	het	Het	het	het	het	het	LOH*	n.b.	Ni	Ni	Ni	Ni
K 39	LOH*	LOH*	Grau 0,72	Ni	Grau 1,69	LOH 2,05	LOH 0,38	het	Grau 0,75	het	n.b.	n.b.	n.b.
K 40	Ni	Het	LOH 0,45	n.b.	LOH 1,85	LOH 1,75	LOH 0,42	LOH*	Ni	LOH	LOH 1,8	Ni	LOH 1,8
Mü 1	Ni	LOH*	LOH 2,45	LOH*	Ni	n.b.	LOH*	n.b.	n.b.	het	het	Ni	het
Mü 2	het	het	het	het	het	het	Ni	LOH*	Ni	n.b.	het	het	het
Mü 2ex	het	het	het	het	het	LOH 1,94	Ni	LOH*	Ni	n.b.	het	het	het
Mü 3	Ni	het	het	het	LOH*	Ni	Ni	n.b.	het	LOH 2,5	n.b.	het	n.b.
Mü 3ex	Ni	het	het	het	LOH*	Ni	Ni	n.b.	het	n.b.	het	het	het
Mü 4	het	LOH*	Ni	het	Ni	het	het	het	n.b.	n.b.	het	het	het
Mü 5ex	Ni	Het	Ni	het	n.b.	Ni	LOH 2,8	LOH*	Ni	LOH*	Ni	Ni	Ni
Mü 6	het	LOH 1,75	LOH 3,43	het	LOH*	Ni	LOH 0,58	LOH*	n.b.	LOH*	LOH	LOH 1,75	LOH
Mü 7	n.b.	n.b.	Ni	het	n.b.	het	n.b.	n.b.	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
Mü 7ex	het	LOH 2,35	Ni	het	LOH*	n.b.	het	n.b.	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
Mü 8	het	het	het	het	het	het	het	het	Ni	het	het	het	het
Mü 9	het	LOH*	het	LOH*	het	het	het	het	n.b.	Ni	LOH	LOH*	LOH*
Mü 10	Ni	LOH*	Ni	LOH*	Ni	Ni	Grau 1,22	het	Ni	n.b.	LOH	LOH*	LOH
Mü 11	LOH 1,9	LOH*	Ni	het	Grau 1,5	Ni	het	LOH*	Ni	LOH*	Ni	Ni	Ni
Mü 12	Ni	LOH 2,67	Ni	het	LOH 3,3	LOH 2,06	LOH 5,1	LOH*	Ni	LOH*	Ni	het	Ni
Mü 13	Ni	LOH 0,41	LOH 2,25	het	LOH*	LOH 2,0	Ni	LOH*	Grau 1,5	n.b.	het	het	het

Tabelle 18 Ergebnisse der LOH-Analyse mit dHPLC und Kapillarelektrophorese (KE): LOH = Loss of Heterozygosity, AIF, LOH* = nicht berechenbares, deutlich sichtbares LOH, het = heterozygot, Ni = Nichtinformativ, Grau = grauer Bereich, n.b. = nicht bestimmt

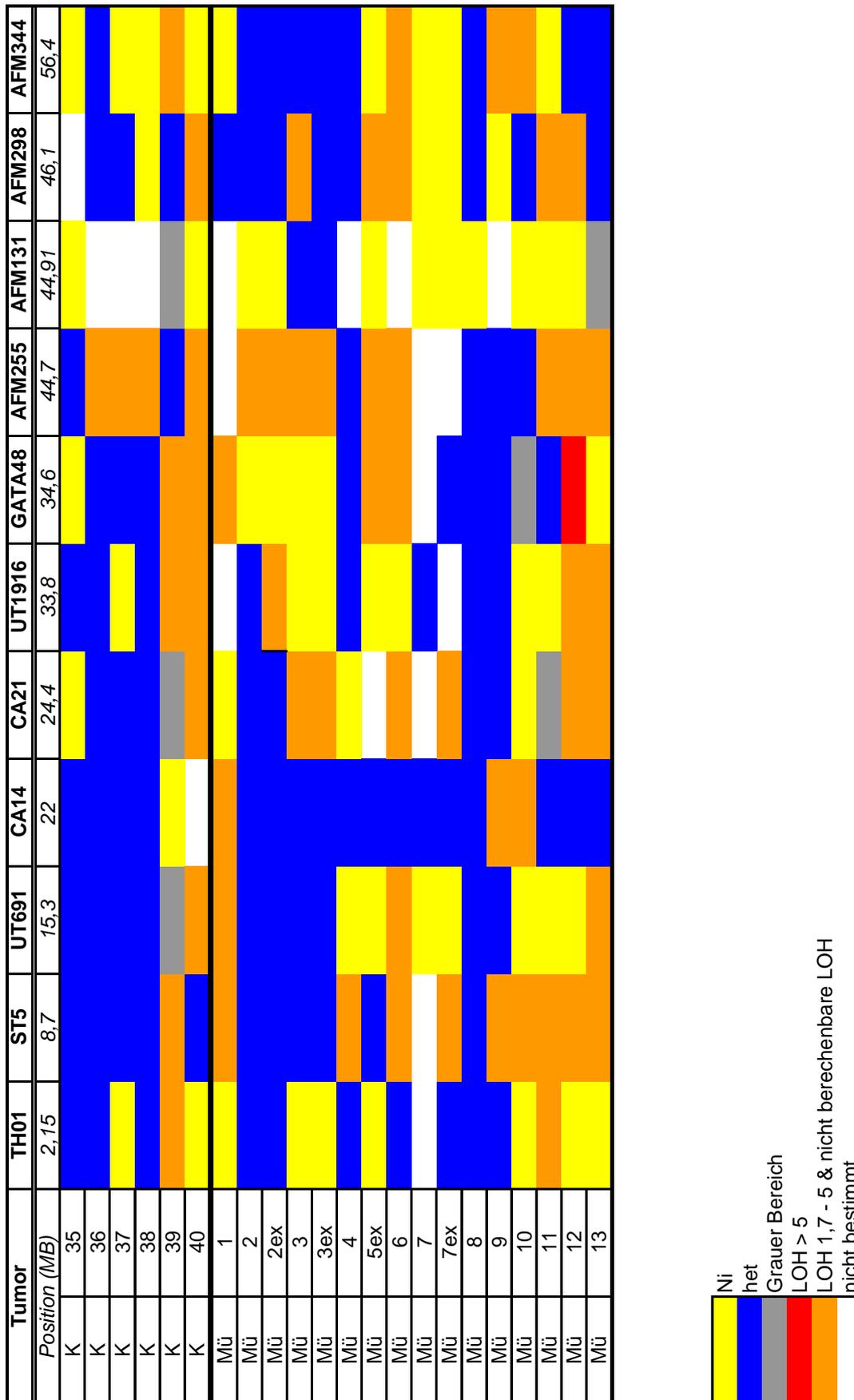


Tabelle 19 Schematische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Analyse für die Proben Kiel 35 – 40 und München 1 - 13. Blau = heterozygot, Grau = grauer Bereich, Rot = LOH, AIF>5, Orange = LOH 1,7 – 5 & nicht berechenbares LOH, Gelb = Nichtinformativ

4.1.4 Ergebnisse der LOH-Untersuchungen

Bei 47 Ovarialtumorproben wurde die Region 11p15.5 bis 11p11.2 mit fünf Tetranukleotid- und sechs Dinukleotidmarkern auf allelische Imbalancen untersucht (siehe Tabelle 16 - Tabelle 19). Für jeden verwendeten Marker lag bei mindestens zwei Proben ein LOH vor.

Von insgesamt 312 an Pärchen von Tumor- und Kontrollgewebe durchgeführten Analysen waren 79 (25%) nicht informativ. Das heißt, das Normalgewebe war homozygot, so dass sich nicht ermitteln ließ, ob bei den entsprechenden Tumorgeweben ein LOH vorliegt. Von den 233 informativen Proben zeigten insgesamt 87 (37%) Proben ein LOH. Davon lag bei fünf Proben ein LOH mit einem AIF von > 5 (2%) vor. Ein LOH mit einem AIF von 1,70 – 5 beziehungsweise von 0,59 oder darunter lag bei 31 Proben (13%) vor. Bei 51 Proben (21%) war das LOH nicht durch die Berechnung eines AIFs quantifizierbar, im Chromatogramm jedoch deutlich erkennbar. Neun Proben lagen im grauen Bereich. Anhand ihres AIFs konnten sie also weder als LOH noch als heterozygot klassifiziert werden.

Für einige Proben ergaben auch wiederholte Messungen keine reproduzierbar auswertbaren Chromatogramme. Diese wurden in den Tabelle 16 und Tabelle 18 als nicht bestimmt (n.b.) bezeichnet und sind in den entsprechenden Farbschemata weiß markiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Feinkartierung vier Marker (AFM131, AFM255, AFM298 und AFM344), die die Region 11p13 – 11p11.2 überspannen, neu etabliert. Die 25 von HAUENSTEIN [2005] untersuchten, in der CGH auffälligen Proben aus dem Kieler Kollektiv wurden ausschließlich mit diesen neuen Markern analysiert. Zwölf dieser Proben (48%) zeigten ein LOH für mindestens einen der vier neuen Marker. Bei neun dieser Tumoren (36%) war kein LOH-Ereignis für die vier neuen Marker nachweisbar. Drei Proben (Kiel 10, 15, 32) (12%) zeigten in den informativen Chromatogrammen für jeden der Marker AFM255, AFM298 und AFM344 ein Ereignis.

Von den in der CGH auffälligen Proben zeigten von 13 untersuchten Proben nur vier Proben informative Chromatogramme für den Marker AMF131. Insgesamt wurden in dieser Doktorarbeit 30 Proben mit AFM131 analysiert, davon waren acht Proben informativ. Zwei der informativen Proben zeigten ein LOH (25%) und für zwei Proben lag der AIF im grauen Bereich.

Aufgrund dieser unbefriedigenden Rate an heterozygoten Proben (27%) für AFM131 wurde der Marker AFM255, der bei einer Lage bei 44,7 MB unmittelbar neben AFM131 (44,91 MB) liegt, etabliert. Mit AFM255 wurden 43 Proben analysiert. Von 42 informativen Chromatogrammen zeigten 22 Proben (52%) ein LOH. Bei neun von 23 informativen Chromatogrammen der in der CGH auffälligen Proben lag ein LOH vor (39%).

Von den 39 für AFM298 informativen Proben zeigten 16 Proben ein LOH (41%). Bei vier dieser Proben war der AIF > 5 (10%), wobei diese vier Proben aus dem mittels CGH vorselektierten, im Bereich 11p auffälligen Kollektiv stammen. Für AFM344 waren 32 von 47 durchgeführten Analysen informativ. Bei insgesamt zehn Proben (31%) lag ein LOH vor, drei dieser LOHs hatten einen AIF im Bereich 1,7 – 5. Die übrigen sieben LOHs waren nicht quantifizierbar.

Eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der LOH-Analysen zeigt Tabelle 20. Eine gewisse Häufung von LOH-Ereignissen deutet sich im Bereich der Marker ST5 und AFM255 sowie im Bereich CA21 bis GATA48 an.

Marker	untersuchte Proben	informativ	%	grauer Bereich	LOH > 5	LOH gesamt	%
TH01	21	12	57	0	0	2	17
ST5	21	21	100	0	0	10	48
UT691	22	15	68	1	0	4	27
CA14	21	20	95	0	0	3	15
CA21	20	16	80	2	0	7	44
UT1916	20	13	65	0	0	5	39
GATA48	21	15	71	1	1	6	40
AFM255	43	42	98	0	0	22	52
AFM131	30	8	27	3	0	2	25
AFM298	46	39	83	1	4	16	41
AFM344	47	32	31	1	0	10	31

Tabelle 20 Übersicht über die Anzahl der mit dem jeweiligen Marker untersuchten Proben. Der Prozentsatz der LOHs bezieht sich auf die informativen Proben.

4.2 Untersuchung der Methylierung des FANCF-Gens

Eine 2003 von TANIGUCHI et al veröffentlichte Studie berichtet über eine Abschaltung des auf 11p15 und damit in der von uns mittels LOH-Analysen voruntersuchten Region gelegenen FANCF-Gens durch Hyper-Methylierung beim Ovarialkarzinom. Eine Unterbrechung des kürzlich beschriebenen Fanconi Anämie-DNA-Reparatur-*Pathways* und ein verändertes Ansprechen auf Cisplatin werden damit in Verbindung gebracht.

Um die an einem kleinen Kollektiv gewonnenen Literaturdaten zu bestätigen wurde in dieser Doktorarbeit die Methylierung der Promoterregion von FANCF mittels Methylierungs-spezifischer PCR (MSP) von 42 Proben auf ihren DNA-Methylierungsstatus untersucht. Hierfür wurden die Primer FF280M und FR432M für methylierte DNA beziehungsweise FF280U und FR432U für unmethylierte DNA verwendet [TANIGUCHI, 2003]. Eine Positivkontrolle für komplette Methylierung wurde durch in vitro Hypermethylierung normaler genomischer DNA erzeugt. Es wurde versucht, einen *PCR-based HpaII restriction enzyme assay* zu etablieren. Die Effektivität der Bisulfitbehandlung wurde durch die Bisulfit-Sequenzierung von vier Tumorproben und einer Normalprobe bestätigt.

4.2.1 Etablierung einer Positivkontrolle für die Methylierungs-Untersuchungen

Für die Untersuchung der Methylierung des FANCF-Gens wurde zunächst eine Positivkontrolle durch in-vitro Hypermethylierung normaler lymphozytärer DNA (gewonnen aus dem Blut gesunder Frauen) mit M.SssI-Methylase (New England Biolabs) hergestellt. Verwendet wurde DNA einer gesunden Probandin (DNA-Probe „51“, Konzentration 846 ng/ μ l). Zur Etablierung wurden verschiedene Bedingungen getestet:

Zunächst wurden die im Protokoll von New England Biolabs angegeben Bedingungen (2 μ l 1x NE Buffer 2, 0,1 μ l 160 μ M SAM sowie 0,25 μ l Methylase (entsprechend 1 U) zu 1 μ g DNA in einem Gesamtvolumen von 20 μ l) mit und ohne vorherige Reinigung der DNA-Probe getestet. Es wurden Inkubationen von einer und vier Stunden Inkubationsdauer bei 37°C getestet. Die anschließend durchgeführte Methylierungs-spezifische PCR zeigte lediglich bei der Probe, die vor der Reaktion gereinigt und vier Stunden inkubiert worden war, eine Methylierung der DNA, die jedoch auch nur unvollständig war.

Wir schlossen daraus, dass die Inkubationsdauer für eine vollständige Hypermethylierung von 1 µg DNA nicht ausreichend war.

Daher wurde zunächst die Inkubationszeit auf acht Stunden beziehungsweise über Nacht verlängert. Um zu gewährleisten, dass in der Reaktion ausreichend Donor von Methylgruppen vorhanden ist, wurden nach vier bzw. acht Stunden Inkubationszeit erneut 160 µM SAM zu den Proben gegeben.

Die achtstündige Inkubation erwies sich weiterhin als ungenügend für eine vollständige Methylierung der Proben (siehe Abbildung 11). Die Bande für methylierte DNA ist jedoch schon deutlich stärker als diejenige für unmethylierte DNA. Das Ergebnis konnte durch den Einsatz von zwei U Methylase nicht verbessert werden.

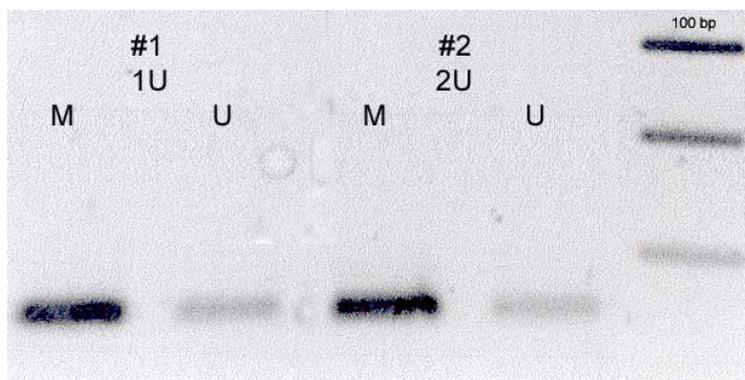


Abbildung 11 Etablierung der Positivkontrolle. Versuchsbedingungen: Inkubationszeit 8 h, Zugabe von SAM zu den Zeitpunkten 0 und 4 h; Ansätze mit 1 U (Probe # 1) und 2 U (Probe # 2) Methylase

Mit Einsatz von 1 µg zuvor gereinigter DNA zu 1 U Methylase, Inkubation über Nacht und zusätzlichem Pipettieren von SAM zum Ansatz zu den Zeitpunkten vier und acht Stunden konnte schließlich eine vollständige und reproduzierbare Methylierung der DNA-Probe erreicht werden (siehe Abbildung 12), bei der MSP waren keine Banden für die Ansätze mit Primern für unmethylierte DNA nachweisbar.

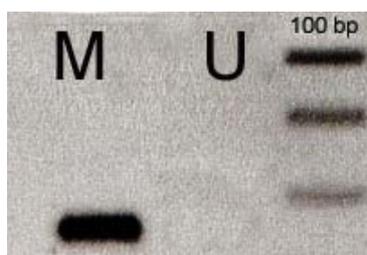


Abbildung 12 Etablierung der Positivkontrolle. Versuchsbedingungen: 1 U Methylase, Inkubation über Nacht, Zugabe von SAM zu den Zeitpunkten, 0, 4 und 8 Stunden

4.2.2 Methylierungs-spezifische PCR

In dieser Doktorarbeit wurde die Methylierung der Promoterregion von FANCF mittels Methylierungs-spezifischer PCR (MSP) untersucht. Nach der dafür erforderlichen Bisulfitmodifikation der DNA wurden von jeder Probe je eine PCR mit den von TANIGUCHI et al 2003 beschriebenen *Primern* FF280M und FR432M für methylierte DNA beziehungsweise FF280U und FR432U für unmethylierte DNA [TANIGUCHI et al, 2003] an 42 Proben durchgeführt. Anhand der anschließenden Gelelektrophorese kann man erkennen, ob die amplifizierte DNA-Sequenz methyliert oder unmethyliert ist. Dafür werden die Ansätze mit den Primern für methylierte DNA und den Primern für unmethylierte DNA nebeneinander aufgetragen.

Bei unmethylierten Proben findet man eine Bande beim Ansatz mit den für unmethylierte DNA spezifischen Primern (U). Der Ansatz mit den für methylierte DNA spezifischen Primern ergibt kein Amplikon. Entsprechend kann man auch keine Bande auf dem Gel sehen.

Bei methylierten Proben erwartet man eine Bande beim Ansatz mit den M-Primern und keine Bande beim Ansatz mit den U-Primern. Es besteht auch die Möglichkeit, dass sowohl beim U- als auch beim M-Ansatz ein Produkt sichtbar ist. Dadurch wird (anhand der Stärke der Banden) der Prozentsatz der Zellen mit Methylierung wiedergespiegelt. Dieser Fall tritt auf, wenn nur eines der beiden Allele methyliert ist, kann aber auch in heterogenen Geweben, in denen nicht alle Zellen methyliert sind, vorkommen.

Die Etablierung der Methylierungs-spezifischen PCR erfolgte mit DNA-Proben von gesunden Frauen, Tumorproben und ihren korrespondierenden Normalgeweben. Anfangs wurden 500 ng DNA für die Bisulfitbehandlung mit dem DNA Methylation KitTM verwendet und die von TANIGUCHI et al 2003 beschriebenen Bedingungen für die MSP getestet.

Die DNA liegt nach der Bisulfitbehandlung in einem Volumen von 10 µl vor. Zymo Research empfiehlt den Einsatz von 2 – 4 µl der gewonnenen DNA je PCR-Reaktion. Bei diesen ersten Versuchsbedingungen wurde die MSP mit je 3 µl der bisulfitbehandelten DNA von vier Tumorgeweben und ihren korrespondierenden Normalgeweben (Proben Kiel 1, 7, 9, 10) durchgeführt. In jedem Ansatz waren 2 mM MgCl₂ enthalten. Unter diesen Bedingungen zeigten 50% der Proben (vier von acht) extrem schwache Banden in der zu erwartenden Länge von 150 bp. Bei den restlichen vier Proben waren keine klaren Banden zu erkennen. Eine erneute

Replikation der Ansätze erbrachte keine besseren Ergebnisse. Teilweise traten danach zusätzliche, unspezifische Banden auf.

Um sicher zu stellen, dass die *Primer* FF280M und FR432 tatsächlich für methylierte DNA spezifisch sind und nicht mit unbehandelter DNA reagieren, wurde eine PCR mit nicht-bisulfitbehandelter DNA mit diesem Primerpärchen durchgeführt. Im Gel zeigten sich weder Banden bei 150 bp noch unspezifische Banden. Somit kann man davon ausgehen, dass die Primer spezifisch sind und nicht mit unbehandelter DNA reagieren.

Nach schrittweiser Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration auf 2,0 mM $MgCl_2$, Änderungen im PCR-Programm und Erhöhung der Ausgangs-DNA-Menge auf 1 μg konnte eine zufrieden stellende PCR-Ausbeute mit spezifischen, reproduzierbaren Banden erreicht werden.

Für drei der selbst isolierten Tumorproben (Mü 4T, Mü 8T und Mü 10T) und zwei der Netzmetastasen (Mü 2ex und Mü 7ex) war eine Durchführung der MSP nicht möglich. Ursächlich dafür war eine zu geringe Konzentration der isolierten DNA der betroffenen Proben. Auch durch eine wiederholte DNA-Isolierung konnten keine besseren Konzentrationen erreicht werden. Für die Probe Mü 10T war eine erneute DNA-Isolierung aus Mangel an Tumormaterial nicht möglich.

Die MSP wurde bei 42 Tumor-Proben von epithelialen ovarialen Tumoren untersucht. Vier dieser Tumor-Proben stammen von Netzmetastasen. Die MSP wurde zudem an fünf korrespondierenden Normalgeweben (nicht betroffenes Peritoneum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom) durchgeführt. Zwei Proben normaler genomischer DNA aus peripheren Lymphozyten wurden analysiert, um zu bestätigen, dass FANCF bei normaler, nicht von Tumoren stammender DNA im Promoter-Bereich keine Methylierung aufweist.

Eine Positivkontrolle wurde in vitro durch vollständige Methylierung normaler genomischer DNA erzeugt. In allen Fällen ergab die MSP für in vitro-methylierte DNA ein positives Produkt (Bande bei M, keine Bande bei U). Die Proben von normaler genomischer DNA zeigten keine Methylierung im untersuchten Bereich des FANCF-Gens. Es zeigte sich, dass neben den Proben von Normalgeweben auch alle Tumorproben im untersuchten Bereich der Promoterregion von FANCF unmethyliert waren. Diese Ergebnisse waren sowohl für unterschiedliche Bisulfitbehandlungen als auch für wiederholte Durchgänge der MSP reproduzierbar. Abbildung 13 und

Abbildung 14 zeigen beispielhaft Gelelektrophoresebilder der MSP mit den Tumorproben, den korrespondierenden Normalgeweben und der Positivkontrolle.

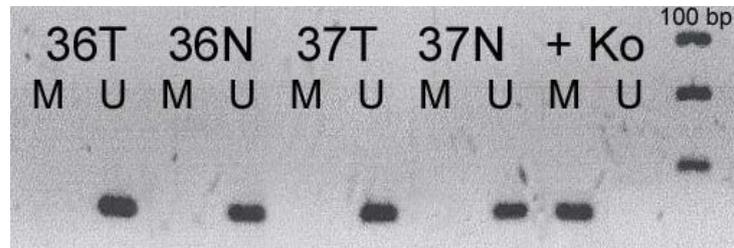


Abbildung 13 Methylierungs-spezifische PCR für FANCF: Die Kieler Tumorproben 36 T und 37 T und ihre korrespondierenden Normalgewebe sind unmethyliert. + Ko = Positivkontrolle.

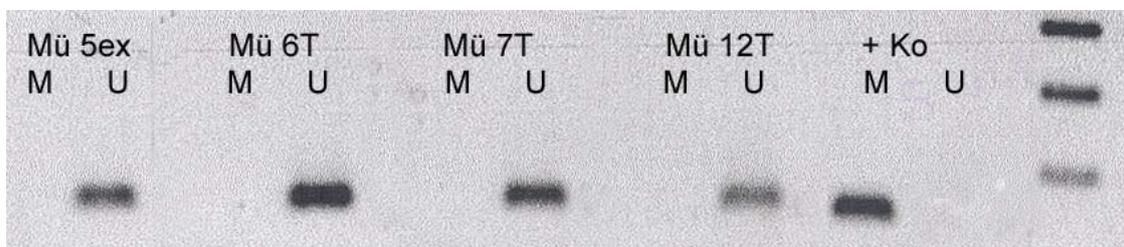


Abbildung 14 MSP für FANCF mit den Münchner Tumorproben 5 ex, 6 T, 7 T und 12 T

4.2.3 Etablierung eines PCR-based HpaII restriction enzyme assay

Da sich in der Methylierungs-spezifischen PCR keine methylierten Proben fanden sollte dieses Ergebnis mit einer zweiten Methode, einem *PCR-based HpaII restriction enzyme assay* bestätigt werden. Dabei kommen die Restriktionsendonukleasen HpaII und MspI zur Anwendung, die beide die Sequenz CCGG schneiden. MspI schneidet sowohl die unmethylierte als auch die methylierte Sequenz, während eine Restriktion der Sequenz mit HpaII nur bei unmethyliertem innerem C möglich ist.

In der anschließenden PCR mit spezifischen Primern (FF330for und FR759rev [TANIGUCHI 2003]) entsteht daher im Falle einer Methylierung im HpaII-Ansatz ein Produkt.

Zunächst wurde die Restriktion in einem Ansatz von 50 µl mit 250 ng genomischer lymphozytärer DNA von Normalpatienten durchgeführt. Es zeigte sich in der Gelelektrophorese, dass die Proben durch HpaII und MspI nur unvollständig verdaut worden waren. In weiteren Tests wurde das Restriktionsvolumen auf 200 µl und 300 µl erhöht. Getestet wurden zudem Ansätze mit einer DNA-Konzentration von 100 bzw. 50 ng und die Erhöhung der Inkubationszeit beim Restriktionsschritt auf 24 Stunden. Diese Maßnahmen führten ebenso wenig wie eine zusätzliche Reinigung

der DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung vor Beginn der Restriktion zu einem kompletten Verdau der DNA.

In der Gelelektrophorese waren die Banden zwar deutlich schwächer als bei den vorangehenden Ansätzen, aber nach wie vor nachweisbar (siehe Abbildung 15).

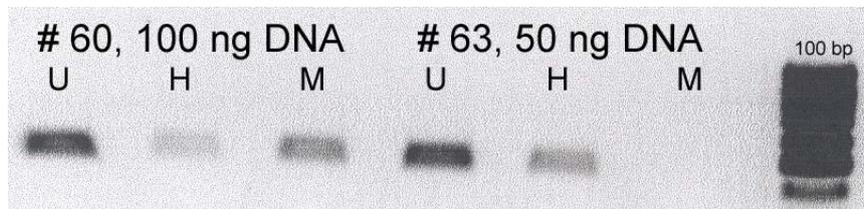


Abbildung 15 HpaII Restriktionsassay mit den unmethylierten Normalproben # 60 und # 63. Einsatz von 100 ng bei Probe # 60 und 50 ng bei Probe # 63. Restriktionsvolumen 200 µl

4.2.4 Bisulfitsequenzierung

Die Bisulfitsequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit Heide Hellebrand auf dem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer der Arbeitsgruppe von Professor Meindl durchgeführt. Es wurden vier Proben von Ovarialtumoren (Mü 3T und 12T, Kiel 1 und 2), eine Probe einer Netzmetastase (Mü 3ex) sowie eine Kontrollprobe (DNA von Lymphozyten einer gesunden Frau) untersucht, um die Wirksamkeit und Vollständigkeit der Bisulfitmodifizierung der DNA zu überprüfen. Alle verwendeten Proben wurden nach der PCR mit den MSP-Primern für unmethylierte DNA FF280U und FR432U sequenziert. Zudem wurden für drei der Tumorproben (Mü 12T, Kiel 1 und 2) und die Normalprobe Ansätze sequenziert, bei denen im Anschluss an die MSP eine weitere PCR mit den Sequenzierungsprimern FF183b und FR437b [TANIGUCHI et al, 2003] durchgeführt worden war.

Die Referenzsequenz von FANCF (NM_022725) muss bearbeitet werden, damit sie mit der bei der Bisulfitsequenzierung ermittelten Sequenz verglichen werden kann. Bei der Bisulfitreaktion werden alle nicht-methylierten Cytosine in Uracil umgewandelt, das sich wie Thymin verhält. Entsprechend muss man in der tatsächlichen Sequenz jedes C durch ein T ersetzen. Dies erfolgte mit dem Programm Methprimer (www.urogene.org/methprimer). Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen die Sequenz des FANCF Gens vor und nach der Bisulfitbehandlung.

```
GCTGCACAACCAAGTGGAGGCAAGAGGGCGGCTTTGGGCGGGGTCAGTTCGGGATTAGCGAACTTCCAGGCCCTCGG
TCACTGTGACGTCTCTCTCTGCGTCTGCTGGAGAACCGGGCCCTCGGGGATGCAGCTCGTTACTACCTGGTGCAGC
AACTCTTTCCCGGCCGGCGTCCGGGACGCCGATGAGGAGACACTCCAAGAGAGCCTGGCCCGCCTTGCCCGCCGGC
GGTCTGTGGTGCACATGTTGCGCTTCAATGGCTATAGAGAGAACCCCAAATCTCCA
```

Abbildung 16 Sequenz von FANCF vor der Bisulfitbehandlung

```
GTTGTATAAATTAGTGGAGGIAAGAGGGIGGTTTTGGGIGGGGTTIAGTTIIGGGATTAGTGAATTTIAGGTTTTGGTIAI
TGTGATGTTTTGTTTTTTTGTGTTTGTGGAGAAITGGGTTTTGGGGATGIAGTTTGTATATTTGGTGIAGTAAATTTTTI
TTGGTTTGGGIGTTTGGGATGTTGATGAGGAGATATTTAAGAGAGTTTGGTTTGTITTTGTTTGGIGGTITGTGGTGTAT
ATGTTGTGTTTAAATGGTTATAGAGAGAAATTTAAATTTTA
```

Abbildung 17 Bisulfitmodifizierte Sequenz von FANCF

Für die Auswertung der Proben müssen die einzelnen Läufe des *Runs* einzeln ausgewertet werden. Die Software ist darauf programmiert, dass die DNA vier Basen enthält und somit bei der Berechnung vier Farben auftreten müssten. Die mit den *Forward Primern* sequenzierte, unmethylierte Sequenz enthält kein Cytosin, die mit den *Reverse Primern* analysierte Sequenz kein Guanosen. Diese fehlenden Basen werden daher von der Software künstlich hochgerechnet. Als Ergebnis zeigen sich sehr komplexe Sequenzen mit starkem *Basecall*. Die Auswertung wird durch diese künstliche Hochrechnung und das Hintergrundrauschen erschwert. Die *Peaks* sind am Anfang der Sequenz sehr hoch und fallen dann stark ab (siehe Abbildung 18).

In diesem Fall muss man für die Läufe mit den *Forward Primern* die Farbe für Cytosin (blau), für die Läufe mit den *Reverse Primern* die Farbe für Guanosen (schwarz) herausnehmen. Für eine bessere Auswertung der Bisulfitsequenzierung wurden die Ergebnisse an Britta Finkelnburg von Applied Biosystems zum Nachrechnen geschickt. Dort können die Sequenzen im so genannten *Flat Profile* dargestellt werden, wodurch die *Peaks* besser zu sehen sind. Die Höhe der *Peaks* ist in diesem Modus relativ gleichmäßig verteilt und ein starker Abfall der *Peaks* kann verhindert werden, wodurch die Auswertung deutlich verbessert wird (siehe Abbildung 19). Es wurde auch beobachtet, dass die Sequenzierung mit den *Reverse Primern* insgesamt sauberere Profile lieferte (siehe Abbildung 20).

Die Normalprobe ließ sich sowohl mit als auch ohne *Flat Profile* sehr gut auswerten, und es zeigten sich keinerlei Cytosine in der Sequenz (siehe Abbildung 21). Bei den Tumorproben war eine Auswertung ohne *Flat Profile* kaum möglich, da die *Peaks* gegen Ende immer flacher wurden. Gegen Ende der Sequenzen erscheinen dort allerdings Cytosine an Stellen, an denen in der tatsächlichen Sequenz von FANCF kein Cytosin vorliegt (siehe Abbildung 21). Diese Beobachtung kann auf das künstliche Hochrechnen der fehlenden vierten Base durch die Software zurückgeführt werden.

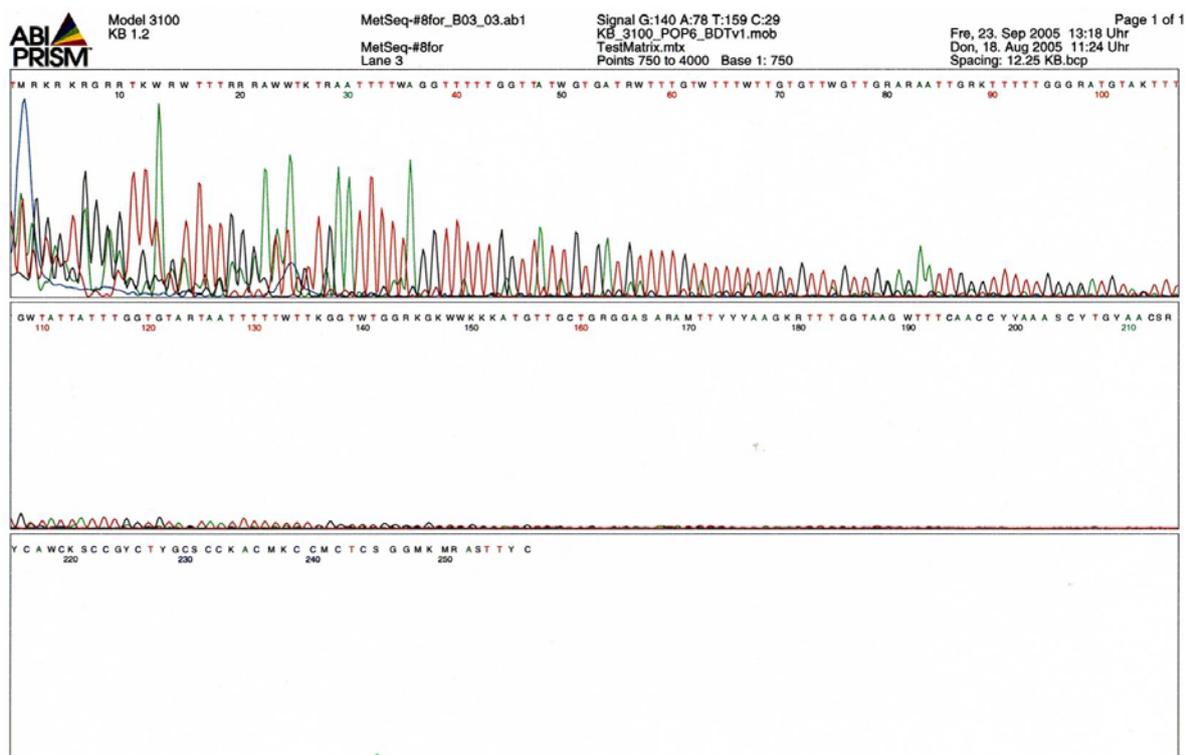


Abbildung 18 Bisulfite Sequenzierung der Probe #8 mit dem Forward Primer, Darstellung im normalen Modus der Software. Die Peaks sind zunächst sehr hoch und fallen dann stark ab, so dass eine Auswertung der Sequenz nicht möglich ist.

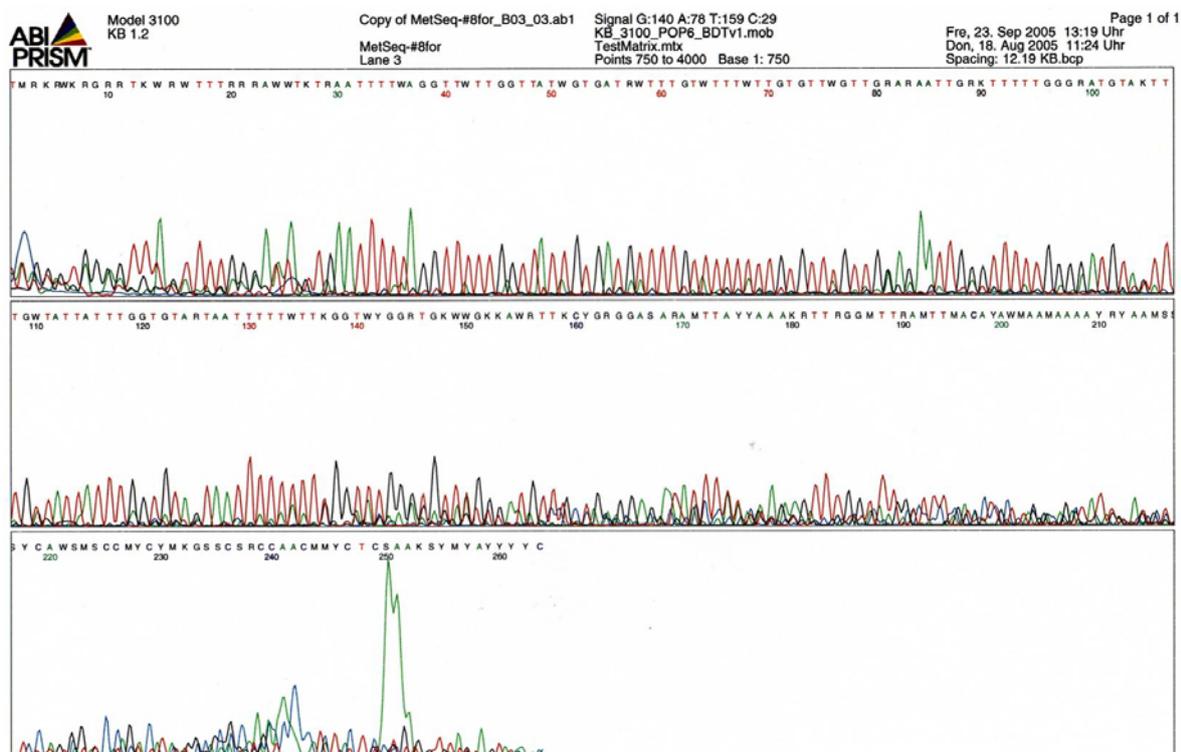


Abbildung 19 Bisulfite Sequenzierung der Tumorphobe #8 mit dem Forward Primer, Darstellung im Flat Profile. Die Peaks fallen hier nicht so stark ab. Die Sequenz erscheint "sauberer" und lässt sich besser auswerten. Gegen Ende der Sequenzierung kommen vereinzelte Cytosin-Peaks hoch, die sich aber außerhalb der analysierten Sequenz befinden.

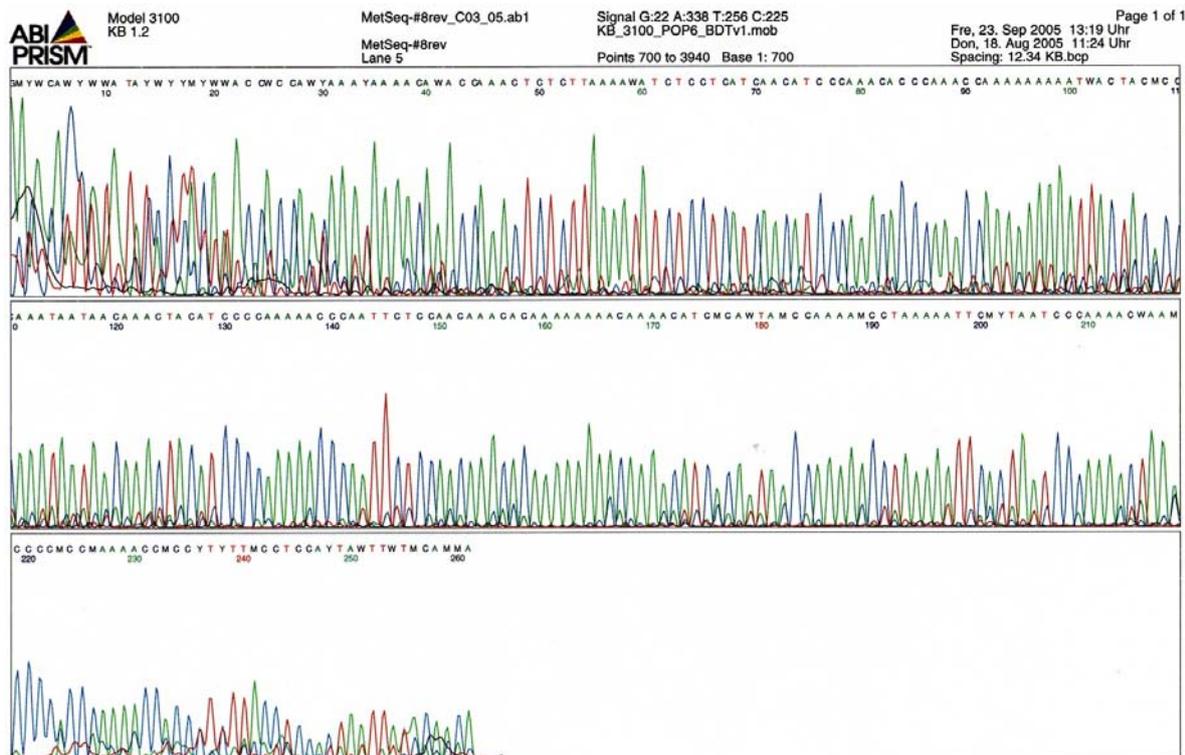


Abbildung 20 Bisulfidsequenzierung der Tumorprobe #8 mit dem Reverse Primer, Darstellung im Flat Profile. Die Sequenz enthält nach erfolgreicher Bisulfidkonversion kein Guanotin. Sie ist unmethyliert.

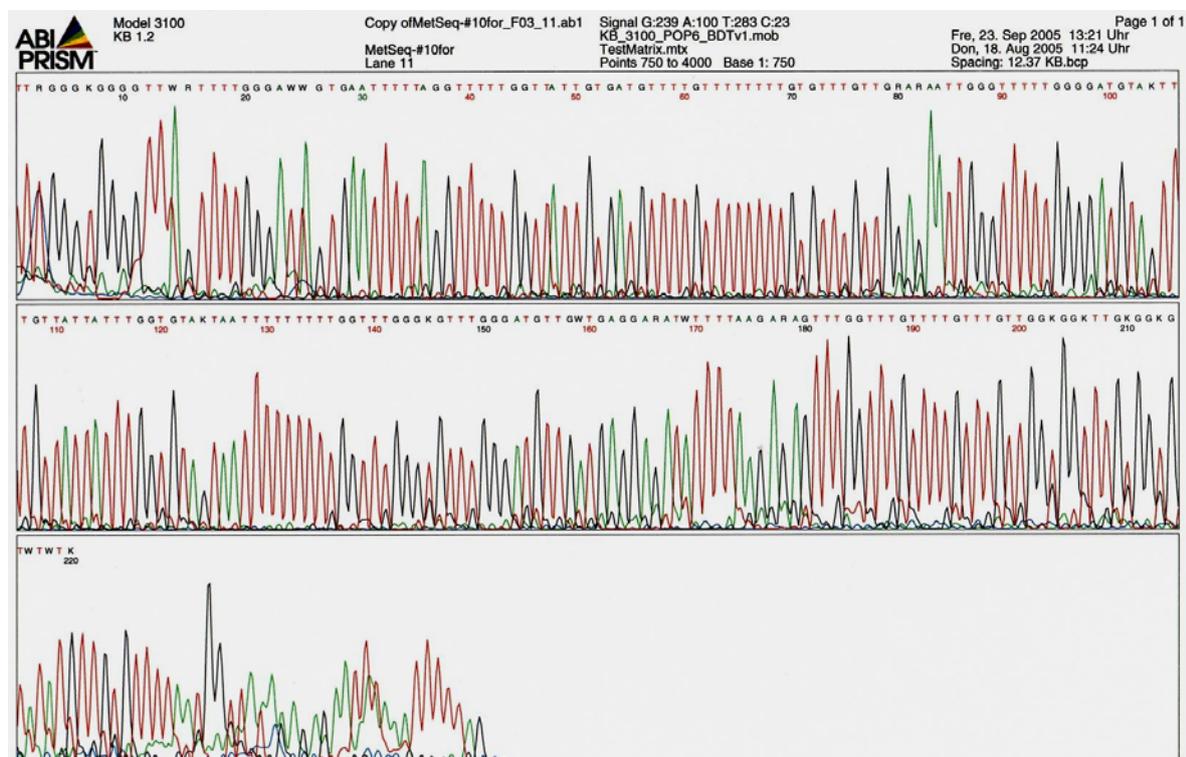


Abbildung 21 Bisulfidsequenzierung der Normalprobe (#10) mit dem Forward Primer im Flat Profile. Die komplette Sequenz enthält kein Cytosin, das heißt die Bisulfidbehandlung war erfolgreich.

Für eine komplett unmethylierte Probe erwartet man bei der Sequenzierung mit dem *Forward Primer* eine vollkommen Cytosin-freie Sequenz. Für den *Reverse Primer* wird entsprechend eine komplett Guanosin-freie Sequenz erwartet. Die Bisulfitsequenzierung ergab sowohl für die untersuchten Tumorproben als auch für die Normalprobe für die *Forward Primer* eine Cytosin-freie beziehungsweise für die *Reverse Primer* eine Guanosin-freie Sequenz.

Anhand der Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung kann man davon ausgehen, dass die Bisulfitbehandlung vollständig und erfolgreich war und die untersuchten Sequenzen, wie erwartet, unmethyliert sind.

4.3 Untersuchung der Genexpression von FANCF

Um die mRNA-Expression des Fanconi Anämie-Gens FANCF zu bestimmen, wurde ein auf der *TaqMan*[®]-Technologie basierender, von Applied Biosystems erhältlicher, *Gene Expression Assay* zur Quantifizierung der relativen FANCF-mRNA-Konzentration (*FANCF Assay-on-demand*[™]) eingesetzt. Als endogene Kontrolle für die Effizienz der reversen Transkription und der PCR-Reaktion wurde das Enzym HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) ausgewählt. Dieses hatte sich in vorhergehenden Experimenten als stabilstes *Housekeeping* Gen erwiesen.

4.3.1 Ergebnis der TaqMan[®]-Reaktion

Ein *Amplification Plot* spiegelt die Erzeugung zunehmender Fluoreszenz des *Reporters* (FAM) während der Amplifikation wieder und steht in direkter Beziehung zur Bildung von PCR-Produkt [APPLIED BIOSYSTEMS]. Die Stelle, an der die Amplifikationskurve eine festgelegte Schwelle („*threshold*“) schneidet, wird als *cycle threshold Ct* oder Schwellenwertzyklus bezeichnet. Der Ct-Wert hängt direkt mit der Menge an gebildetem PCR-Produkt zusammen und erlaubt daher Rückschlüsse auf die ursprünglich in die PCR-Reaktion eingebrachte Menge an Zielsequenz. Proben mit einer höheren Ausgangskonzentration des untersuchten Gens erreichen die Schwelle eher als Proben mit einer geringeren Ausgangskonzentration. Folglich zeigt also eine Probe mit einer höheren Expression des Gens niedrigere Ct-Werte als eine Probe, in der das jeweilige Gen geringer exprimiert ist.

Die von uns für HPRT gemessenen Ct-Werte lagen bei 25 – 32 Zyklen. Für FANCF wurden Werte zwischen 27 und 32 Zyklen bis zum Erreichen des Schwellenwertzyklus gemessen. Somit liegt die Expression von FANCF und dem gewählten *Housekeeper* auf einem vergleichbaren Niveau. Tabelle 21 zeigt die vom

TaqMan[®] im Auto-Ct-Modus ermittelten Ct-Werte für das *Target* FANCF („Ct FANCF“) und die verwendete interne Referenz HPRT („Ct HPRT“). Zusätzlich enthält Tabelle 21 die mit dem Programm Excel aus den Triplikaten berechneten Mittelwerte („FANCF bzw HPRT av Ct“) für jedes Gewebe und die zugehörigen Standardabweichungen („FANCF bzw HPRT Sd“).

Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen durch den TaqMan[®] ermittelte *Amplification Plots* für die pipettierten Triplikate des als Kalibrator dienenden Normalgewebes und der Tumorprobe 9T. Zugehörige Ct-Werte finden sich in Tabelle 21.

Die x-Achse gibt dabei die Zahl der PCR-Zyklen an, die y-Achse das Delta Rn (Intensität des Fluoreszenzsignals des *Reporters*). Die TaqMan[®]-Software berechnet im Auto-Ct-Modus für jedes *Vial* einzeln diese *Cycle threshold*. Eine Messung des Anstiegs des PCR-Produkts ist nur in dieser exponentiellen Phase der PCR möglich. In den Abbildungen ist die Schwelle als waagrechte grüne Linie erkennbar. In der linken unteren Ecke ist die Hintergrundfluoreszenz erkennbar.

Aus den *Amplification Plots* in Abbildung 22 kann man ablesen, dass die Kurven, die die Amplifizierung des Kalibrator-Gewebes (Normalgewebe) für das Gen von Interesse (FANCF) widerspiegeln, die *threshold* bei circa 28,5 Zyklen schneiden. Für die Tumorprobe 9T liegt der Schnittpunkt bei circa 30,5 Zyklen. Für das Referenzgen HPRT liegt der aus Abbildung 23 ermittelte Ct-Wert für das Normalgewebe bei 25,5 und für das Tumorgewebe bei 29,5. Die genauen Werte sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Ein Zyklus Unterschied entspricht bei gleicher RNA-Konzentration der Proben einem zweifachen Unterschied der Expression. Mit der Formel $2^{\Delta n}$ lässt sich der Expressionsunterschied abschätzen, wobei n der Ct-Wert für das entsprechende Gen ist. Diese Abschätzung berücksichtigt allerdings noch nicht die für einen Vergleich von Proben notwendige Normalisierung, die mögliche Unterschiede der eingesetzten Zellmenge, der RNA-Qualität oder der Effizienz der Reversen Transkription korrigiert. Um die Genexpression genauer zu berechnen, wurde in dieser Arbeit eine Relative Quantifizierung vorgenommen.

Ct-Werte für FANCF und HPRT

Sample	Ct FANCF	FANCF av Ct	FANCF Sd	Ct HPRT	HPRT av Ct	HPRT Sd
NG10	28,514			25,642		
NG10	28,494	28,457	0,083	25,594	25,593	0,050
NG10	28,362			25,543		
OvCa R3	28,451			25		
OvCa R3	28,317	28,349	0,090	24,952	24,958	0,039
OvCa R3	28,28			24,923		
2T	33,216			32,015		
2T	33,564	33,353	0,186	32,034	32,032	0,016
2T	33,277			32,046		
2ex	31,976			29,718		
2ex	31,674	31,779	0,171	29,693	29,659	0,083
2ex	31,687			29,564		
3T	29,752			29,197		
3T	30,165	29,969	0,207	29,267	29,193	0,076
3T	29,991			29,115		
3ex	31,636			31,623		
3ex	31,57	31,651	0,090	31,655	31,58	0,103
3ex	31,748			31,462		
4T	29,698			27,996		
4T	29,878	29,825	0,110	28,128	28,074	0,069
4T	29,898			28,098		
5ex	29,916			28,453		
5ex	29,945	29,908	0,042	28,438	28,426	0,034
5ex	29,863			28,388		
7T	29,386			27,241		
7T	29,435	29,505	0,166	27,178	27,222	0,038
7T	29,694			27,247		
9T	30,737			29,792		
9T	30,797	30,801	0,067	29,726	29,809	0,092
9T	30,87			29,908		
11T	27,475			26,278		
11T	27,574	27,537	0,054	26,268	26,295	0,038
11T	27,563			26,339		
12T	29,445			27,786		
12T	29,507	29,531	0,100	28,046	27,896	0,135
12T	29,64			27,855		
14T	32			32,375		
14T	32,337	32,161	0,169	32,404	32,306	0,145
14T	32,146			32,139		

Tabelle 21 Die vom TaqMan[®] ermittelten Ct-Werte für das *Target* FANCF und die interne Kontrolle HPRT mit den aus den Triplikaten berechneten Mittelwerten („av Ct“) und zugehörigen Standardabweichungen („sd“) für jedes Gewebe

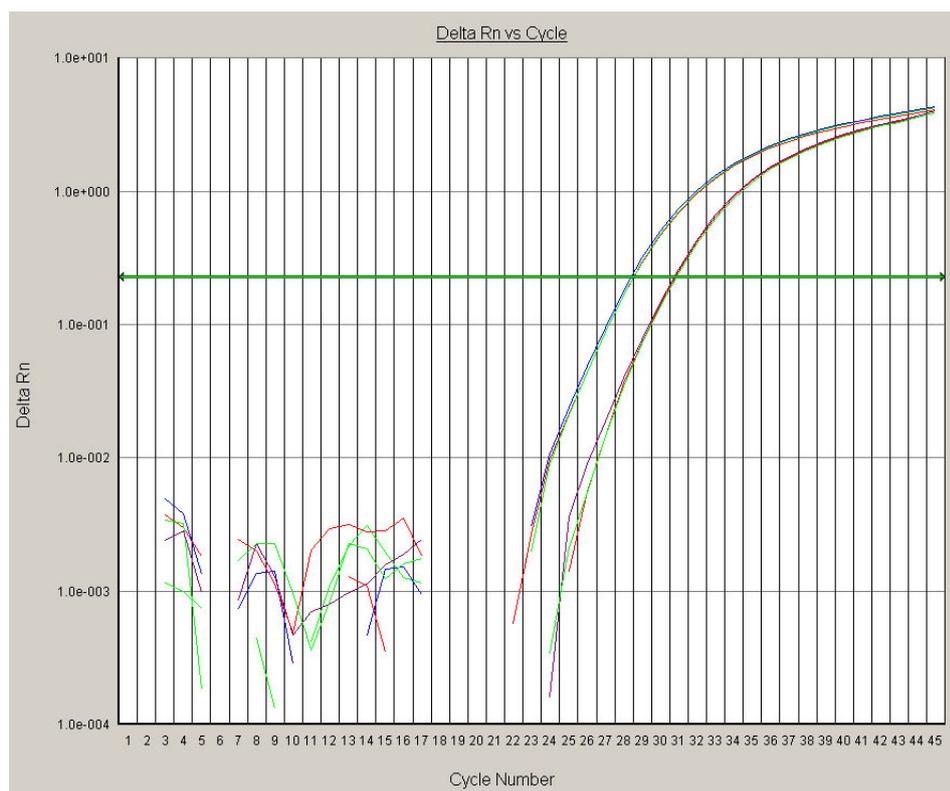


Abbildung 22 FANCF Amplification Plots für das Normalgewebe (links) und die Tumorseite 9T (rechts); Links der Kurven ist die Hintergrundfluoreszenz erkennbar. X-Achse: Zykluszahl; Y-Achse: Delta Rn (Höhe des generierten Fluoreszenzsignals); Grüne Linie: Vom TaqMan[®] im Auto-Ct-Modus ermittelte Schwelle für die Probe 9T. Schnittpunkt zwischen Kurven und Schwelle: *Cycle Threshold Ct*

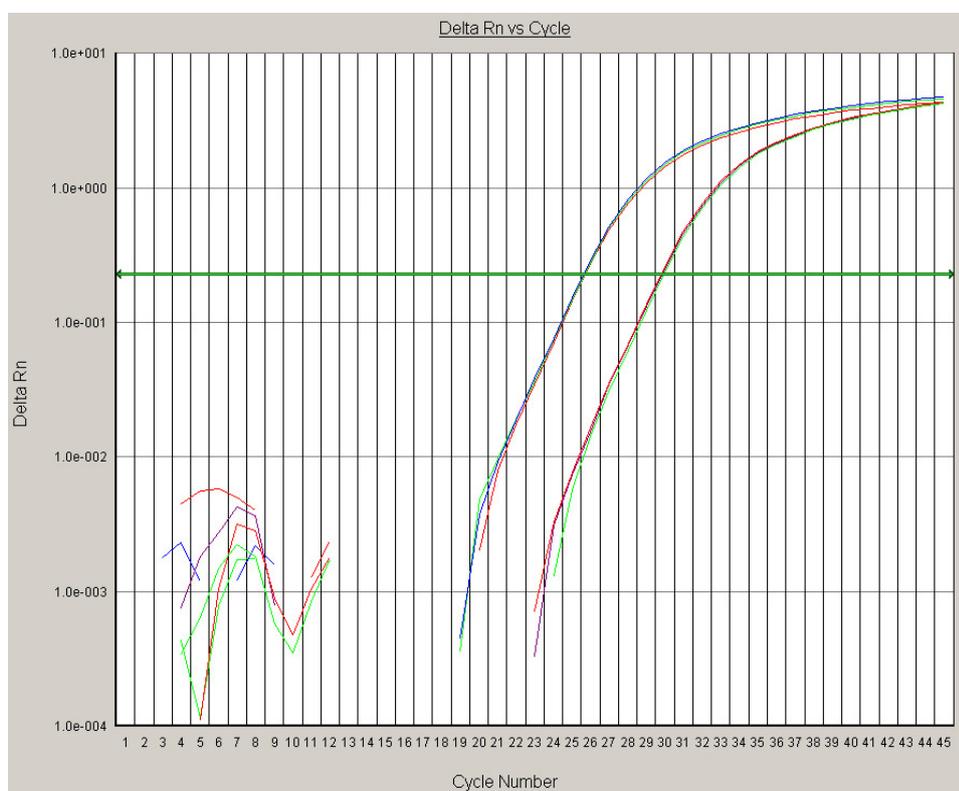


Abbildung 23 HPRT Amplification Plot für die Triplikate des Normalgewebes (links) und der Tumorseite 9T (rechts)

4.3.2 Relative Quantifizierung der Genexpression von FANCF

Die Auswertung des auf dem TaqMan[®] durchgeführten Experiments erfolgt mittels Relativer Quantifizierung der Genexpression in Form eines Vergleichs der bei der Real-Time-PCR ermittelten Ct-Werte („*Comparative Ct method*“). Die Proben werden gegen das verwendete Normalgewebe (tumorfrees Peritoneum) kalibriert. Die Berechnung erfolgt mit den aus den Triplikaten berechneten Mittelwerten der Ct-Werte [APPLIED BIOSYSTEMS, 2001]: Mit der *Comparative Ct method* wird die x-fache Veränderung der Genexpression relativ zur Kalibratorprobe berechnet.

Bei der Berechnung der relativen Genexpression ergaben sich die in Tabelle 22 dargestellten Werte. Abbildung 24 zeigt eine graphische Darstellung der relativen Genexpression von FANCF.

4.3.3 Interpretation der Ergebnisse der Relativen Quantifizierung

Untersucht wurde die Genexpression von FANCF in elf Ovarialkarzinomgeweben und der Ovarialkarzinomzelllinie OvCaR3 im Vergleich zu Normalgewebe mittels Relativer Quantifizierung. Als Normalgewebe wurde tumorfrees Peritoneum verwendet. Acht der elf Tumorproben stammten von ovarialen Primärtumoren. Zudem standen drei Gewebeproben von Netzmetastasen zur Verfügung. In zwei Fällen lagen Paare von Primärtumor und Netzmetastasen der Patientinnen vor (2T und 2 ex, 3T und 3ex). Bei einer weiteren Probe handelte es sich ebenfalls um Gewebe einer Netzmetastase (5ex). Die gewählten Ovarialkarzinomgewebe wurden während der operativen Therapie von noch nicht chemotherapeutisch behandelten Patientinnen mit einem FIGO-Stadium von IIc bis IV gewonnen. Es lag je ein Tumor mit einem *Grading* von 1 beziehungsweise 2 vor. Die übrigen Proben stammten von G3-Tumoren (siehe Tabelle 2).

Im Vergleich zum Referenzgewebe (normales Peritoneum) zeigten alle elf in dieser Doktorarbeit untersuchten Ovarialkarzinomgewebe eine höhere FANCF-m-RNA-Expression. Dabei ist FANCF in den Tumorgeweben 1,5- bis 8-fach höher exprimiert als im Normalgewebe (siehe Tabelle 22 und Abbildung 24). 82% der Tumorproben zeigen bezogen auf den Kalibrator eine über zweifache Steigerung der Expression. Bei drei der Proben (27%) liegt eine über vierfache Erhöhung der Genexpression vor (Proben 3T, 3ex, 14T) vor. Die untersuchte Ovarialkarzinomzelllinie OvCaR3 weist im Vergleich zum Referenzgewebe mit 0,69 eine leichte Reduktion der Expression von FANCF auf.

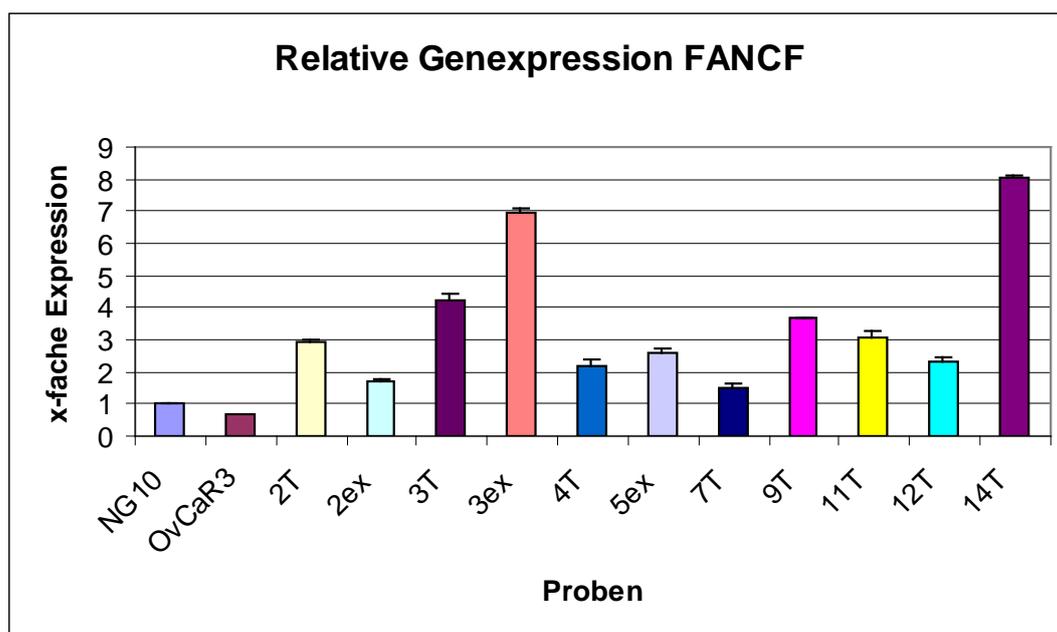


Abbildung 24 Diagramm der Relativen Genexpression von FANCF. Das Normalgewebe dient als Kalibrator und nimmt im Rahmen der Berechnung mit der *Comparative Ct*-Methode den Wert 1 an. Die Expression von FANCF in den Tumorproben wird mit dem Normalgewebe verglichen. Das heißt, die Proben sind im Vergleich zum Normalgewebe höher oder niedriger exprimiert. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung der ΔCt -Werte an.

Relative Quantifizierung - Comparative Ct Methode

Sample	FANCF av Ct	FANCF Sd	HPRT av Ct	HPRT Sd	ΔCt	Sd ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$	$2^{-\Delta \Delta Ct + s.d. \Delta Ct}$	$2^{\Delta \Delta Ct + s.d. \Delta Ct}$
NG10	28,457	0,083	25,593	0,05	2,864	0,097	0	1	0,935	1,069
OvCaR3	28,349	0,090	24,958	0,039	3,391	0,098	0,527	0,694	0,648	0,743
2T	33,353	0,186	32,032	0,016	1,321	0,187	-1,543	2,914	2,560	3,317
2ex	31,779	0,171	29,659	0,083	2,120	0,190	-0,744	1,675	1,468	1,911
3T	29,969	0,207	29,193	0,076	0,776	0,221	-2,088	4,252	3,649	4,954
3ex	31,651	0,090	31,58	0,103	0,071	0,137	-2,793	6,931	6,304	7,620
4T	29,825	0,110	28,074	0,069	1,751	0,130	-1,113	2,163	1,977	2,367
5ex	29,908	0,042	28,426	0,034	1,482	0,054	-1,382	2,606	2,510	2,706
7T	29,505	0,166	27,222	0,038	2,283	0,170	-0,581	1,496	1,329	1,683
9T	30,801	0,067	29,809	0,092	0,992	0,114	-1,872	3,660	3,383	3,961
11T	27,537	0,054	26,295	0,038	1,242	0,066	-1,622	3,078	2,940	3,222
12T	29,531	0,100	27,896	0,135	1,635	0,168	-1,229	2,344	2,086	2,634
14T	32,161	0,169	32,306	0,145	-0,145	0,223	-3,009	8,050	6,899	9,394

Tabelle 22 Berechnung der Relativen Genexpression ($2^{-\Delta \Delta Ct}$) aus den Mittelwerten der pipettierten Triplikate mit der *Comparative Ct*-Methode mit Berechnung der Standardabweichung und der Spannweite/Varianz ($2^{\Delta \Delta Ct + s.d. \Delta Ct}$). HPRT wird als interne Kontrolle für die Normalisierung, das Normalgewebe NG10 als Kalibrator verwendet. Die Standardabweichung $\Delta \Delta Ct$ ist gleich derjenigen für $\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{controll}$; $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{calibrator}$; relative Genexpression = $2^{-\Delta \Delta Ct}$

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde Chromosom 11p bei Ovarialkarzinomgewebeproben mittels Mikrosatellitenmarkern feinkartiert, um Tumorsuppressorgene in dieser Region zu ermitteln. Das Fanconi Anämie-Gen FANCF wurde als Kandidatengene ausgewählt und seine Promotorregion auf Methylierung als „*second hit*“-Ereignis untersucht. Hierfür wurden die Methylierungs-spezifische PCR etabliert. Um die Validität unserer Ergebnisse zu prüfen wurde exemplarisch eine Bisulfitsequenzierung einzelner Proben durchgeführt. Die Genexpression von FANCF wurde parallel mit der TaqMan[®]-Technologie in einem ausgewählten Probenkollektiv quantifiziert. Als weitere Kandidatengene wurde das Metastase-Suppressor-Gen KAI1 [DONG et al, 1995; HOULE et al, 2002] ausgewählt. Bei der Feinanalyse von 11p mittels Mikrosatellitenmarkern wurden Marker gewählt, die in der Nähe des KAI1-Locus gelegen sind. Auf eine Methylierungsanalyse wurde verzichtet, da sich in der Literatur Daten fanden, die gegen eine Hypermethylierung des KAI1 Gens sprechen [JACKSON et al 2000].

5.1 LOH-Analyse auf Chromosom 11p

In dieser Doktorarbeit wurde eine LOH-Analyse von Chromosom 11p bei 47 Ovarialtumorproben mit elf Mikrosatellitenmarkern vorgenommen. Ziel dieser Feinkartierung war die Identifikation eines kleinsten überlappenden Intervalls, um die Lokalisation von dort möglicherweise gelegenen Tumorsuppressorgenen zu bestimmen. Die meisten der Proben (ca. 75%) zeigten allelische Imbalancen in Teilen bzw. über die gesamte Länge der untersuchten Regionen. Überwiegend wurden übereinstimmende Ergebnisse zwischen Paaren aus Primärtumor und Netzmetastase vorgefunden. Nur in einem Fall (Tumor Mü 2) konnte bei der Netzmetastase im Gegensatz zum Primärtumor ein LOH bei einem Marker nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt also bei einem der beiden korrespondierenden Gewebe ein im Rahmen der Tumorprogression aufgetretenes zusätzliches Ereignis vor.

Bei den in der CGH für Chromosom 11p unauffälligen Proben Kiel 35 - 38 (Prof. Dr. Arnold, unpublizierte Daten) sind entsprechend den CGH-Ergebnissen außer für den Marker AFM255 keine Ereignisse nachweisbar. Die Kieler Proben 39 und 40 zeigen entgegen ihrer in der CGH unauffälligen Resultate für mehrere Marker ein Ereignis.

5.1.1 Identifikation von Loss of Heterozygosity mit der IP-RP-HPLC

Die IP-RP-HPLC ist eine weit verbreitete, kostengünstige, schnelle und zuverlässige Methode zur Durchführung von LOH-Analysen [XIAO & OEFFNER, 2001]. Daher ist sie sehr gut für das *Screening* von größeren Probenkollektiven geeignet. Sie ist in vorangegangenen Studien in unserer Arbeitsgruppe zur Identifizierung von Loss of Heterozygosity etabliert worden [GROSS et al, 2007].

Nach der Definition von DEVILEE [2001] liegt bei einem AIF > 5 ein klassisches LOH vor. Bei Proben mit einem AIF < 5 kommt auch ein anderer Mechanismus, wie zum Beispiel eine Amplifikation, für das Ereignis in Frage. LOHs wurden durch den Vergleich der HPLC-Chromatogramme und Elektropherogramme der Kapillarelektrophorese, die für die vorangegangene Doktorarbeit von HAUENSTEIN [2005] erstellt worden waren, identifiziert und falls möglich wurde ein AIF berechnet. Dabei zeigte die IP-RP-HPLC in den meisten Fällen zuverlässige Ergebnisse. So konnte auch für die meisten nicht mittels Berechnung eines AIFs quantifizierbaren Proben eine Entscheidung über das wahrscheinliche Vorliegen eines LOH-Ereignisses gefällt werden.

Bei einem großen Anteil der identifizierten Ereignisse war insbesondere bei den Direpeatmarkern (sechs der verwendeten elf Marker) eine Berechnung des AIFs trotz eindeutigen Chromatogramm nicht möglich. Ursächlich hierfür ist, dass die IP-RP-HPLC Allele, die kleiner als 150bp sind und sich in nur einem 2-bp-Repeat unterscheiden, nicht auftrennen kann [GROSS et al, 2007]. Die beiden Allele koeleuierten dadurch in einem gemeinsamen *Peak*. Soweit möglich wurden bei sich schlecht auftrennenden *Peaks* die Allele per Hand ausgemessen, um einen AIF dennoch abschätzen zu können. Bei einigen Proben ist dies aufgrund komplexer Profile nicht möglich, sie zeigen ein im Chromatogramm jedoch durch eine Umkehr der Allel-*Peaks* eindeutig erkennbares Ereignis und wurden daher als nicht berechenbare LOHs bezeichnet.

Für eine bessere Auftrennung der Proben kann die Kapillarelektrophorese dienen, da sie auch kleinste Längenunterschiede exakter auftrennen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die genauere Quantifizierung von LOH-Intervallen mittels Kapillarelektrophorese bei etablierten Dinukleotidmarker jedoch verzichtet, da mit den in der vorangegangenen Studie mittels HPLC und Kapillarelektrophorese erzielten Daten kein eindeutiges kleinstes Intervall identifiziert werden konnte. Zudem stellt die Kapillarelektrophorese eine vergleichsweise zeit- und kostenintensive Methode dar und stand uns nur in begrenztem Ausmaß zur Verfügung.

Bei der Untersuchung der Proben zeigt sich ein hoher Prozentsatz an LOH-Ereignissen (34% der interpretierbaren Chromatogramme). Der Anteil der LOHs mit einem AIF von < 5 und der nicht berechenbare LOHs ist mit 82 Proben im Vergleich zu den „eindeutigen“ LOHs (fünf Proben) mit einem AIF > 5 relativ groß. Vier der Proben mit einem deutlichen LOH stammen aus dem mittels CGH vorselektierten Kieler Kollektiv. Bei einer der Münchner Proben (Mü 12) lag ein LOH mit einem AIF > 5 für GATA48 vor. Bei den berechenbaren LOHs liegt der AIF für die meisten Proben im Bereich 1,7 – 5.

5.1.2 Grenzen der LOH-Bestimmung

Loss of Heterozygosity ist bei nahezu allen Tumorarten auf vielen Chromosomen gefunden worden. Für jeden Tumortyp bestehen spezifische LOH-Muster. Dadurch kann auf das Vorhandensein vieler Tumorsuppressorgene geschlossen werden, die auf somatischer Ebene bei den Tumoren inaktiviert werden. Mittels häufig auftretender LOH-Ereignisse an definierten polymorphen Loci in Tumormaterial im Vergleich zu normalem Gewebe wird versucht, die Lokalisation von Tumorsuppressorgenen einzugrenzen [STRONACH et al, 2003].

Bislang konnten auf diesem Weg nur wenige Kandidaten tatsächlich identifiziert werden [DEVILEE et al, 2001; TOMLINSON et al, 2002]. Als Ursachen für diese relativ unbefriedigenden Ergebnisse von LOH-Studien sehen DEVILEE et al [2001] technische Grenzen des LOH-Nachweises sowie eine genetische Heterogenität innerhalb der untersuchten Tumoren und im Tumorkollektiv.

TOMLINSON et al [2002] vermuten, dass viele LOH-Analysen diese Heterogenität vernachlässigen und die Kontamination des Tumormaterials mit normalen Zellen, eine karyotypische Komplexität, homozygote Deletionen, Veränderungen der Menge an Genkopien oder PCR-Artefakte ignorieren. Die *Two-Hit*-Hypothese wurde ursprünglich für Mutationen, die in einem relativ gesunden Genom auftreten, vorgeschlagen. Die meisten Tumoren sind jedoch polyploid oder aneuploid [TOMLINSON et al, 2002] und können komplexe Genomveränderungen aufweisen, so dass die *Two-Hit*-Hypothese auf diese Tumoren nicht uneingeschränkt angewendet werden kann.

Auch unser Kollektiv ist in sich relativ heterogen. Es besteht aus in der CGH auffälligen, unauffälligen und nicht untersuchten Proben. Größtenteils enthält es fortgeschrittene Ovarialkarzinome, bei denen von einem Tumoranteil von mindestens 80% [Gross et al, 2006] ausgegangen werden kann. Allerdings ist der tatsächliche Anteil an kontaminierendem Normalgewebe für die Proben von Ovarialtumoren früherer Stadien unbekannt und für unsere Proben kann eine Poly- oder Aneuploidie nicht

ausgeschlossen werden. Eine einheitliche Auswertung von AIFs war technisch bedingt durch koeluerende Peaks und Stotterbanden, die eine Berechnung der Peakfläche durch die Wavemaker[®]-Software behinderten, nicht für alle Proben möglich. Wo möglich wurde alternativ versucht, LOH bzw. Retention durch eine Ausmessung der Peakhöhen trotzdem zu quantifizieren. In einigen Fällen war dies jedoch aufgrund der komplexen Profile auch nicht möglich so dass sich dann die Auswertung auf eine qualitative Beurteilung des Allelstatus beschränken musste.

5.1.3 Identifikation eines kleinsten überlappenden Intervalls auf Chromosom 11p

Wichtig für die Identifikation der wahrscheinlichsten Lokalisationen von Tumorsuppressorgenen durch LOH-Analysen ist die klare und konsequente Definition von LOHs [DEVILEE et al, 2001; CLETON-JANSEN et al, 2001].

Viele unserer Proben zeigen relativ große LOH-Intervalle oder komplexe Muster, bei denen sich Regionen mit Loss of Heterozygosity und solche mit erhaltener Heterozygotie abwechselten. Es zeigte sich ein relativ großer Anteil an Proben mit einem LOH < 5 oder einem nicht berechenbaren LOH (94% aller LOHs, als „partielle LOHs“ bezeichnet). Diese können durch den Anteil an Normalgewebe in einer Tumorprobe, eine Heterogenität innerhalb des Tumorkollektivs oder verschiedene chromosomale Ereignisse zustande kommen [VANDAMME et al, 1991, DEVILLEE et al, 2001]. Dabei ist der Anteil der Tumorzellen, die eine bestimmte genetische Veränderung tragen, unbekannt.

Denkbar wären neben einem *Loss of Heterozygosity* durch *Nondisjunction* mit nachfolgender Reduplikation des zweiten Allels, durch subchromosomale Deletionen, nichtbalancierte Translokationen oder mitotische Rekombination (*Rearrangement*) auch die Amplifikation eines Allels, das Vorliegen einer Trisomie oder einer chromosomalen Aneuploidie [DEVILEE et al, 2001]. Man kann ein „partielles“ LOH also nicht unbedingt mit dem Verlust eines Allels gleichsetzen. Tumoren können auch in sich heterogen sein und so könnten echte LOH-Ereignisse (AIF > 5) verschleiert werden [DEVILEE et al, 2001].

TOMLINSON et al [2001] und CLETON-JANSEN et al [2001] empfehlen, Proben mit solch komplexen Mustern für eine zuverlässige Identifikation von kleinsten überlappenden Intervallen zur Identifikation von Tumorsuppressorgenen auszuschließen, da diese komplexen Muster für die jeweiligen Tumoren einzigartig sein

können und sich möglicherweise nicht mit interstitiellen Deletionen von anderen Tumoren im Kollektiv überschneiden.

Es gelang im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht, ein eindeutiges kleinstes überlappendes Intervall zu definieren. Es lassen sich jedoch trotz der insgesamt relativ komplexen Muster LOH-Intervalle eingrenzen: Zum einen ist eine deutliche Häufung von LOH-Ereignissen bei Marker ST5 auszumachen. Des Weiteren kann ein Intervall zwischen CA21 und GATA48 abgegrenzt werden und es zeigt sich im Bereich des Markers AFM255 eine deutliche Häufung von Ereignissen.

Angesichts dieser Ergebnisse und der relativ großen Gendichte auf 11p wurde für die Suche nach Kandidatengenen die Literaturrecherche zusätzlich hinzugezogen. Daher wurde letztendlich auch das gewählte Vorgehen zur groben Abschätzung von allelischen Imbalancen als ausreichend angesehen. Größere Bedeutung wurde der Etablierung und Anwendung von neueren Methoden zur Untersuchung der Methylierung und der Genexpression beigemessen.

Wie sich in dieser Arbeit zeigte, ist es - insbesondere bei heterogenen Kollektiven – schwierig, aus den komplexen LOH-Mustern eindeutige Ergebnisse und vor allem auch Ergebnisse von klinischer Relevanz zu erlangen.

5.1.4 Auswahl von Kandidatengenen auf Chromosom 11p

In den Farbtabelle (Tabelle 17 und Tabelle 19) und der Übersicht in Tabelle 20 zeigt sich bei den Münchener Proben eine Häufung von LOHs bei ST5 (Entfernung vom Telomer 8,7 MB). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Arbeit von HAUENSTEIN [2005] überein, in der bei den in der CGH auffälligen Proben eine LOH-Häufung bei ST5 beobachtet wurde. Allerdings wurde dort auch eine Häufung von LOHs bei TH01 beschrieben, die sich in dem hier mit TH01 untersuchten, nicht selektierten Kollektiv nicht bestätigen konnte.

In der Literatur wird eine Herabregulation des ST5-Gens (*suppression of tumorigenicity*) bei T- und B-Zell-Lymphomen [MAHADEVAN et al, 2005] beschrieben. Eine Herabregulation von ST5 in normalen Granulosazellen nach Überstimulation mit Gonadotropin wird von RIMON et al [2004] mit einem möglicherweise gesteigerten Risiko für die Entwicklung von Eierstockkrebs in Verbindung gebracht. Insgesamt ist über diesen Locus jedoch wenig bekannt.

Das von TANIGUCHI et al [2003] untersuchte Gen FANCF (22,6 MB) ist nahe dem Marker CA14 (22MB) lokalisiert. In der von HAUENSTEIN [2005] durchgeführten Vorstudie an einem mittels CGH vorselektierten Kollektiv wies knapp die Hälfte der

untersuchten Tumoren ein LOH für CA14 auf. Die Entscheidung, FANCF genauer zu untersuchen fiel aufgrund dieser Daten und den zu FANCF bei der Literaturrecherche gefundenen Publikationen [TANIGUCHI, 2003, OLOPADE & WEI, 2003; DHILLON et al, 2004, NARAYAN et al, 2004].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Vorstudie zeigt CA14 bei dem in dieser Doktorarbeit untersuchten, nicht vorselektierten Kollektiv mit 15 % einen relativ geringen Prozentsatz an LOH-Ereignissen. FANCF könnte dennoch durch einen anderen Mechanismus, zum Beispiel Methylierung, abgeschaltet sein.

AFM131 (Lage bei 44,91 MB) zeigt mit 27 % im Vergleich zum in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen Marker AFM255 (44,7 MB, 98 % informative Proben) auf der dHPLC sehr wenig informative Proben. Wenn man AFM131 deshalb außer Betracht lässt, kann eine weitere Häufung von LOHs in einem 24 MB umfassenden Intervall, das von den Markern CA14 (22 MB) und AFM298 (46,1 MB) flankiert wird, beobachtet werden. Außer bei AFM131 liegt der Prozentsatz der LOHs bei allen in diesem Intervall gelegenen Mikrosatellitenmarkern bei mindestens 39 %. Für AFM255 ist bei 52 % der untersuchten Proben der Verlust eines Allels nachweisbar. AFM 255 (44,7 MB) liegt in direkter Nachbarschaft zum KAI1 Gen (44,6 MB), das in der Literatur als Metastasierungs-Suppressor-Gen beim Prostatakarzinom [DONG et al, 1995] beschrieben worden ist. KAWANA et al [1997] beschreiben das gehäufte Auftreten von LOH im Bereich der KAI1-enthaltenden Region von 11p beim Prostatakarzinom. Für Melanomzellen ist eine Herabregulation der KAI1-Expression in Verbindung mit LOH beschrieben worden [KIM et al, 2009]. Eine Methylierung des KAI1-Promotors konnte weder bei Melanomzellen [KIM et al, 2009], noch bei Blasentumoren nachgewiesen werden [JACKSON et al, 2000].

Das bei unserem Probenkollektiv gehäufte Auftreten von LOHs könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Verlust von KAI1 eine Rolle bei der Genese oder Progression von Malignomen des Ovars spielt. Zudem berichten Studien von LIU et al [2000] und HOULE et al [2002] über eine Herabregulation der Genexpression von KAI1 bei Ovarialtumoren.

5.2 Untersuchungen zur DNA-Methylierung von FANCF

Der genauen Ermittlung von DNA-Methylierungsmustern in CpG-Islands von Promoterregionen wird eine große Bedeutung für das Verständnis der Tumorgenese und –progression beigemessen.

5.2.1 Wahl der Methylierungs-spezifischen PCR als Methode für die Untersuchung der Methylierung von FANCF

Es gibt verschiedene Ansätze, den Methylierungsstatus einer Promotorregion zu untersuchen. Traditionell wird die DNA-Methylierung mittels Methylierungs-empfindlicher Restriktionsendonukleasen untersucht. Im Anschluss daran können ein *Southern Blot* oder ein PCR-Assay der unterschiedlich verdauten Fragmente zeigen, ob die untersuchten Regionen methyliert waren. Neuere Methoden, wie die Methylierungs-spezifische PCR, COBRA (*Combined bisulfite restriction analysis*), Bisulfitsequenzierung oder MethyLight (Quantifizierung von Bisulfit-behandelter DNA mittels *Real-Time-PCR*), machen sich das unterschiedliche Verhalten von methylierten und unmethylierten Cytosinresten bei Behandlung mit Natriumbisulfit zunutze. Dabei werden unmethylierte Cytosine in Uracil umgewandelt, während 5-Methylcytosin nicht reagiert und Cytosin bleibt. Es wird also der epigenetische in einen genetischen Code umgewandelt und so die Durchführung einer Sequenzierung oder einer PCR zum Nachweis einer epigenetischen Veränderung ermöglicht [MAIER et al, 2004].

Die von HERMAN et al 1996 vorgestellte Methylierungs-spezifische PCR (MSP) nutzt diese durch Bisulfitbehandlung zustande gekommenen Sequenzunterschiede für einen qualitativen Nachweis von Methylierung. HERMAN et al [1996] beschreiben die MSP als sensitive Methode, die sogar noch 0,1% methylierte DNA in einer ansonsten unmethylierten Probe nachweisen soll und nur kleine DNA-Mengen erfordert.

Proben von Tumoren enthalten in der Regel neben dem Tumorgewebe auch normales Gewebe, wodurch der Nachweis von tumorspezifischen Veränderungen erschwert wird. Die MSP kann simultan unmethylierte und methylierte Produkte innerhalb einer einzigen Probe messen [HERMAN et al, 1996]. Das PCR-Signal ist ein positives Signal und kann daher, im Gegensatz zu den Signalen bei der Analyse von *Loss of Heterozygosity* nicht durch Kontamination mit normalen Zellen maskiert werden [ESTELLER & HERMAN, 2001]. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität ermöglicht die MSP selbst dann den Nachweis von anormal methylierten Allelen, wenn diese nur einen relativ kleinen Anteil der Gesamt-DNA einer Probe ausmachen [HERMAN et al 1996]. Dadurch sind auch kleine und heterogene Proben dieser Methode zugänglich [LIU & MAEKAWA, 2003]. Der Verzicht auf Restriktionsenzyme eliminiert falsch-positive Ergebnisse durch unvollständigen Verdau [HERMAN et al, 1996; LIU & MAEKAWA, 2003]. Der Vorteil gegenüber der Bisulfitsequenzierung liegt darin, dass die MSP deutlich einfacher, schneller und kostengünstiger durchzuführen ist. Amplifizierung, Klonierung und

nachfolgende Sequenzierung können durchaus mehrere Tage in Anspruch nehmen. Die Methylierungs-spezifische PCR und andere PCR-Assays, die auf die Untersuchung eines Ortes zielen (*site directed*), sind in ihrer Anwendbarkeit begrenzt durch die Tatsache, dass für jedes potentiell methylierte CpG-*Island* ein eigener Assay entwickelt werden muss. Daher könnten auf Arrays basierende Assays für eine Anwendung in der Klinik interessanter sein [LIU & MAEKAWA, 2003]. Eine weitere Einschränkung der MSP ist, dass es sich bei ihr um eine vorwiegend qualitative Methode handelt. Zwischen geringeren und größeren Mengen an methylierten Allelen kann nur grob anhand der Stärke der PCR-Banden unterschieden werden [OGINO et al, 2006].

Die MSP ist jedoch als einfach durchzuführende, schnelle, sensitive und kostengünstige Methode sehr gut für das *Screening* von einzelnen Kandidatengen in einem größeren Probenkollektiv geeignet und anderen Methoden deutlich überlegen. Für die Zielsetzung dieser Doktorarbeit wurde sie daher für die Untersuchung der Promoterregion von FANCF auf Methylierung gewählt.

5.2.2 Etablierung der Methylierungs-spezifischen PCR

Um eine zuverlässige Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Allelen zu garantieren und falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, ist es wichtig, dass die verwendeten Primerpärchen tatsächlich spezifisch sind und unmodifizierte DNA nicht amplifizieren. [HERMAN et al, 1996].

Die in dieser Doktorarbeit für die MSP verwendeten *Primer* FF280M, FR432M, FF280U und FR432U wurden an unbehandelter DNA getestet. Dabei ergab sich für keines der Pärchen ein Amplikon, sodass man davon ausgehen kann, dass diese *Primer* für bisulfitbehandelte DNA spezifisch sind.

Während der Etablierung der MSP im Rahmen dieser Doktorarbeit traten unspezifische Banden auf. Auch andere Forscher beschreiben, dass verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel die verwendete DNA-Polymerase oder die gewählte Temperatur für das *Annealing* der *Primer*, die MSP beeinflussen können und zu solchen unspezifischen Banden führen können [LIU und MAEKAWA, 2003]. Durch Veränderung der PCR-Bedingungen (*Touch Down*-Modus als PCR-Programm) und Erhöhen der eingesetzten DNA-Menge konnten die Probleme bei der Etablierung der MSP in der vorliegenden Doktorarbeit behoben werden. Die endgültige Untersuchung der Proben erfolgte bei Verwendung von 1 µg DNA für die Bisulfitreaktion mit 2,2 µl bisulfitbehandelter DNA (entspricht 225 ng) in jedem PCR-Ansatz.

Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben, dass die Bisulfit-Behandlung zu DNA-Strangbrüchen führt und hochgradig fragmentierte Einzelstrang-DNA resultiert [OGINO et al 2006; EHRICH et al, 2007]. GRUNAU et al [2001] haben beobachtet, dass bei einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 55°C 84 – 96% der eingebrachten DNA degradiert werden. Die verbleibende DNA sei normalerweise aber noch ausreichend für die nachfolgende PCR-Amplifizierung [GRUNAU et al, 2001]. Die Hauptursache für diese DNA-Fragmentation soll eine DNA-Depurinierung aufgrund des bei der Reaktion vorliegenden sauren pHs sein [RAIZIS et al, 1995]. Die Degradation der DNA wird durch lange Inkubationszeiten und hohe Temperaturen [GRUNAU et al, 2001] verstärkt. Die Qualität und Menge der in die Bisulfit-Behandlung eingebrachten DNA, die Länge des untersuchten Amplikons, eine hohe Molarität des Bisulfits und der pH können die Qualität der bisulfit-modifizierten DNA ebenfalls beeinflussen [EHRICH et al, 2007]. Eine hochgradige DNA-Degradation vermindert die Zahl der DNA-Moleküle, die effektiv für eine PCR-Amplifizierung zur Verfügung stehen. Dabei kann die DNA soweit degradiert werden, dass eine PCR-Amplifizierung unmöglich wird. Die Zahl der für die PCR verfügbaren DNA-Moleküle ist jedoch entscheidend für eine zuverlässige Charakterisierung von methylierten Regionen [EHRICH et al, 2007]. GRUNAU et al [2001] setzen im Vergleich zur normalerweise eingesetzten nicht-modifizierten DNA-Menge die zehnfache Menge bisulfit-behandelter DNA in die PCR ein. EHRICH et al [2007] beschreiben in einer nach Abschluss der Experimente dieser Doktorarbeit erschienenen Studie ebenfalls gute Ergebnisse für den Einsatz von 1 µg DNA in das EZ DNA Methylation Kit™ von Zymo Research.

5.2.3 Diskussion des PCR-based HpaII restriction enzyme assay

In der Methylierungs-spezifischen PCR konnte im Tumorkollektiv keine einzige methylierte Probe gefunden werden. Um dieses Ergebnis zu bestätigen sollte eine zweite Methode zur Untersuchung der Methylierung etabliert werden. Hierfür wurde ein *PCR-based HpaII restriction enzyme assay* ausgewählt.

Die Etablierung dieser Methode stellte sich als sehr zeitintensiv heraus, da immer wieder Probleme mit einem unvollständigen Verdau der Proben auftraten. Eine inkomplette Restriktion ist problematisch, da sie zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Nach einer längeren Etablierungsphase gelang es, einen vollständigen Verdau der unmethylierten Normal-DNA zu erzielen. Allerdings war dies in nachfolgenden Ansätzen nicht reproduzierbar.

Insgesamt ließ sich mit den durchgeführten Experimenten durchaus ein Unterschied zwischen methylierter und unmethylierter DNA zeigen. Allerdings ist das Risiko falsch-positiver Ergebnisse durch den unvollständigen Verdau erheblich, eine komplette Restriktion ist essentiell, um zwischen methylierter und unmethylierter DNA zu unterscheiden. Zudem waren die Ergebnisse nicht zuverlässig reproduzierbar. Die Stärke der Banden der HpaII- und MspI-Ansätze war bei identischen Ansätzen nicht gleich. Proben, die nur mit der Ethanolfällung gereinigt wurden, zeigten deutlich schlechtere Ergebnisse als Proben, die auch einer Proteinase K-Verdau und einer Phenol-Chloroform-Extraktion zugeführt wurden. Auch die Ergebnisse zwischen verschiedenen Proben von Normalpatienten variierten. Aus diesen beiden Beobachtungen kann gefolgert werden, dass möglicherweise die Qualität und Reinheit der verwendeten DNA eine Rolle dabei spielen könnten, wie gut die Endonukleasen die DNA verdauen können.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde nach mehreren Versuchsansätzen auf eine weitere Etablierung dieser Methode verzichtet und die Bisulfitsequenzierung wurde als weitere Methode hinzugezogen.

5.2.4 Bisulfitsequenzierung

Die Bisulfitsequenzierung wurde als Methode ausgewählt, um die Effektivität der Bisulfit-Behandlung zu überprüfen, und so die Ergebnisse der MSP zu bestätigen. Der dahinter stehende Gedanke war, dass eine unvollständige Bisulfit-Modifikation der DNA ein *Annealing* der methylierungs-spezifischen *Primer* der MSP verhindern könnte. Um dies auszuschließen wurden eine Normalprobe und vier Tumorproben nach der Behandlung mit Bisulfit sequenziert. Dabei waren in den *Forward*-Sequenzen keine Cytosine und in den *Reverse*-Sequenzen keine Guanosine nachweisbar, so dass von einer vollständigen und erfolgreichen Umwandlung der DNA ausgegangen werden kann.

Schwierigkeiten ergaben sich bei der Auswertung der Sequenzierungsprofile, da die Software des ABI Prism 3100 auf vier Basen und somit vier verschiedene Farben programmiert ist. Die bei der Bisulfit-modifizierten DNA fehlende Base wird deshalb künstlich hochgerechnet, so dass die sich ergebenden Signale stark überlagert sein können oder gegen Ende der Sequenzierung stark abfallen können. Diesem Phänomen kann man durch Verwendung von *Flat* Profilen bei der Auswertung der Sequenzen begegnen.

Für eine exakte Untersuchung des Methylierungsstatus müssten die PCR-Produkte in Plasmidvektoren kloniert werden. Anschließend müssten einzelne Klone sequenziert werden [ESTELLER & HERMAN, 2001]. Auf diese Art und Weise würde man auch der Annahme, dass innerhalb eines Tumors eine klonale Heterogenität vorliegen kann, gerecht. Für das Ziel, die Qualität der Bisulfitmodifizierung zu überprüfen und die Ergebnisse der Methylierungs-spezifischen PCR an einer kleinen Auswahl der Proben zu bestätigen, wurde die hier gewählte direkte Sequenzierung ohne vorherige Klonierung der PCR-Produkte jedoch als ausreichend angesehen.

5.2.5 Diskussion der Ergebnisse zur Methylierung von FANCF

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Methylierungsstatus einer CpG-*Island*-Region im Fanconi Anämie-Gen FANCF (nt 183-473) an 42 Ovarialkarzinomproben mittels Methylierungs-spezifischer PCR analysiert. Eine Methylierung der untersuchten Region konnte bei keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Alle Tumorproben wurden bei der primären Operation der Patientinnen gewonnen, bevor diese zur Chemotherapie vorgestellt wurden. Somit kann eine Selektion unmethylierter Proben durch Cisplatin ausgeschlossen werden.

5.2.5.1 Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Methylierung von FANCF beim Ovarialkarzinom

Die 2003 veröffentlichte Studie von TANIGUCHI et al berichtet über eine Methylierung dieses CpG-*Islands* bei 21% eines nur aus 19 Proben bestehenden Kollektivs von primären Ovarialtumoren, während keine Methylierung bei zugehöriger genomischer DNA aus peripherem Blut und zwei aus normalen Ovarien gewonnenen Proben nachgewiesen werden konnte. Bei vier von 25 untersuchten Zelllinien, die von Ovarialtumoren abstammen, wurde eine Methylierung beobachtet. Die Arbeitsgruppe bringt eine Inaktivierung von FANCF durch Methylierung bei Ovarialtumoren mit einer Überempfindlichkeit für Cisplatin in Verbindung. Eine Demethylierung dieser Promoterregion soll mit der Entwicklung einer Cisplatin-Resistenz korrelieren [TANIGUCHI et al, 2003].

Eine von DHILLON et al [2004] veröffentlichte Studie beschreibt einen ähnlich hohen Prozentsatz an methylierten Proben (24%) bei einem Kollektiv von 25 Granulosazelltumoren. Allerdings handelt es sich bei den Granulosazelltumoren um einen relativ seltenen Subtyp von nichtepithelialen Ovarialtumoren. Laut DHILLON et al [2004] habe die Hypermethylierung bis auf wenige Ausnahmen mit der mRNA-

Expression korreliert. In dem Artikel finden sich aber auch methylierte Zelllinien, die wie die unmethylierten Zelllinien eine Expression von FANCF aufweisen.

5.2.5.2 Rolle der Methylierung von FANCF beim Ovarialkarzinom

Im Gegensatz zu den von TANIGUCHI et al 2003 veröffentlichten Ergebnissen für Ovarialtumoren und den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen für weitere Tumorarten, wurde in unserem Probenkollektiv keine Hypermethylierung der untersuchten Promoterregion des FANCF-Gens nachgewiesen.

Unsere Ergebnisse stimmen überein mit einer während dieser Doktorarbeit erschienenen Studie von TEODORIDIS et al [2005], die bei einem Kollektiv von über 100 Proben epithelialer Ovarialtumoren (FIGO III und IV) ebenfalls keine Methylierung des FANCF-Promoters gefunden hat. TEODORIDIS et al [2005] vermuten, dass die Diskrepanz zu den Ergebnissen von TANIGUCHI und Kollegen aufgrund einer dort verwendeten höheren Zahl an PCR-Zyklen zustande kommt. Daher sei die Methylierungs-spezifische PCR mit maximal 35 Zyklen durchgeführt worden, um mögliche störende Auswirkungen geringer Mengen unmodifizierter DNA zu verhindern. Diese These kann im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nicht bestätigt werden, da die MSP mit 43 Zyklen in einem *Touch Down*-Modus durchgeführt wurde und bei unseren Proben keinerlei Methylierung der untersuchten Region nachweisbar war.

Möglicherweise spielt die Methylierung von FANCF also zumindest beim Ovarialkarzinom doch keine so große Rolle, wie zunächst angenommen worden war. In der von TANIGUCHI et al 2003 veröffentlichten Studie, die eines der Hauptargumente für die Wahl von FANCF als Kandidatengenen für diese Doktorarbeit war, finden sich auch fünf Zelllinien, die trotz einem intakten *FA-Pathway* überempfindlich auf Cisplatin reagieren. Bei diesen Zelllinien müssten also andere Mechanismen als eine Abschaltung des *FA-Pathways* durch Methylierung der Promoterregion von FANCF ursächlich für die Cisplatin-Überempfindlichkeit sein. Dies könnten, wie von der Arbeitsgruppe diskutiert, subtilere Defekte des *Pathways* sein oder andere, weiter abwärts gelegene, unabhängige molekulare Mechanismen wie Defekte der *Nucleotide excision repair* [TANIGUCHI et al, 2003]. Auch eine biallelische Inaktivierung von BRCA2, die zu den klassischen klinischen und zellulären Anomalien der Fanconi Anämie führen kann [HOWLETT et al, 2002] kommt in Frage.

DHILLON et al [2004] zeigen eine Methylierung von FANCF bei 24% der untersuchten Granulosazelltumoren. Diese Ergebnisse sind jedoch kritisch zu werten. Es handelt sich

dabei um einen relativ seltenen Subtyp der nichtepithelialen Ovarialtumoren, weshalb man diese Ergebnisse nicht generell auf Ovarialtumoren beziehen sollte.

Tabelle 23 fasst die zur Methylierung von FANCF erschienen Publikationen zusammen. Die Methylierung kann innerhalb einer wachsenden Tumorzellpopulation auch heterogen sein [OLOPADE & WEI, 2003; LIU & MAEKAWA, 2003]. So kann die Methylierung zwischen einzelnen DNA-Strängen und zwischen den Zellen variieren. Das könnte dem Auffinden von methylierten Tumorproben zusätzlich im Weg stehen. Allerdings ist die in dieser Doktorarbeit gewählte Methylierungs-spezifische PCR sehr sensitiv und sollte auch kleinste Mengen methylierter DNA in einer ansonsten unmethylierten Probe simultan ermitteln können [HERMAN et al, 1996]. Es erscheint zudem eher unwahrscheinlich, dass das bei einem heterogenen Tumor für die MSP verwendete Tumorbiopsat nur den unmethylierten Anteil der DNA enthält.

Neben der Hypermethylierung von CpG-*Islands* wird bei Ovarialtumoren häufig auch eine genomweite Hypomethylierung beobachtet [WIDSCHWENDTER et al, 2004]. Die DNA-Methylierung soll eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität spielen: Es wird vermutet, dass eine genomische Hypomethylierung Krebszellen ermöglicht, mehr Mutationen zu erwerben und so das Genom zu destabilisieren. Eine Hypomethylierung der DNA wird mit einer chromosomalen Instabilität, die die Entstehung von Krebs fördern könnte, in Verbindung gebracht [EDEN et al, 2003]. Eine starke Hypomethylierung der DNA kommt signifikant häufiger bei Ovarialtumoren fortgeschrittener Stadien und hoher Gradings vor [WIDSCHWENDTER et al, 2004].

Bei unserem hauptsächlich aus fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen bestehendem Kollektiv (60 % FIGO III, 21 % FIGO IV, 54 % G3) war keine Methylierung nachweisbar. Möglicherweise liegt bei unserem Kollektiv, wie bei WIDSCHWENTER et al [2004] beschrieben, eher eine Hypomethylierung der DNA vor.

In einem nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit erschienen *Review*-Artikel kommen TANIGUCHI & D'ANDREA [2006] zu dem Ergebnis, dass Störungen des Fanconi Anämie-*Pathways* bei einer Vielzahl von Krebsarten beim Menschen identifiziert worden sind, was einen molekularen Mechanismus für ihr Ansprechen auf eine Chemotherapie mit DNA-Crosslinkern nahe legt. Die von Ihnen beobachteten Ergebnisse von 21% FANCF-Methylierung ihres relativ kleinen Probenkollektivs [TANIGUCHI et al, 2003] konnten von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden. Ein ähnlich hoher Prozentsatz an methylierten Proben (24%) wurde

lediglich bei einer Studie an Granulosazelltumoren [DHILLON et al, 2004], einem relativ seltenen Subtyp der nichtepithelialen Ovarialtumoren beobachtet. TANIGUCHI & D'ANDREA [2006] kommen daher zu dem Schluss, dass die tatsächliche Prävalenz niedriger liegen könnte, als sie das ursprünglich angenommen hatten.

5.2.5.3 **Methylierung von FANCF bei anderen Tumorarten**

Auch für andere Tumorarten ist eine Methylierung von FANCF identifiziert worden (siehe Tabelle 23). TISCHKOWITZ et al [2003] zeigten eine Methylierung der Promotorsequenz von FANCF bei einer von einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie abstammende Zelllinie (CHRF-288), der das FANCF Protein fehlt und die überempfindlich gegen Mitomycin C ist. Bei 36 Patienten mit sporadisch auftretenden Fällen von AML konnte jedoch keine FANCF-Methylierung nachgewiesen werden.

Bei MEYER et al [2006] konnte bei der Untersuchung von Knochenmarkpunktaten von 81 Kindern mit sporadischer akuter Leukämie ebenfalls keine Methylierung von FANCF nachgewiesen werden. Die Autoren schließen daraus, dass die Methylierung von FANCF bei Leukämie kein häufiges Ereignis ist. Somit sei auch ein signifikanter Beitrag zur Chemotherapie-Empfindlichkeit und chromosomalen Instabilität weitgehend unwahrscheinlich.

Bei Brustkrebs ist eine Methylierung von FANCF bei 13 der untersuchten 75 Tumoren (17,3% der Proben) beobachtet worden [OLOPADE & WEI, 2003].

NARAYAN et al [2004] zeigen eine Hypermethylierung des FANCF Promoters für 27 von 91 (30%) primären Zervixtumoren. 14 der in dieser Studie untersuchten Tumoren zeigten *Loss of Heterozygosity* für die Region 11p. Bei Untersuchung von PAP-Abstrichen präkanzeröser Läsionen unterschiedlicher Stadien sowie normalem Zervixepithel zeigte sich keine Methylierung. Die Inaktivierung von FANCF könnte also ein späteres „Event“ bei der Entwicklung von Tumoren sein. Bei drei von neun untersuchten Zelllinien fand sich eine Methylierung des FANCF-Promoters. Die Genexpression von FANCF konnte durch Demethylierung wiederhergestellt werden. Die Genexpression war jedoch auch bei drei weiteren Zelllinien mit unmethyliertem FANCF-Promotor herabreguliert. NARAYAN et al [2004] folgern, dass andere Mechanismen, wie zum Beispiel eine partielle Methylierung oder Mutationen, FANCF inaktivieren.

Für HNSCC (*Head and neck squamous cell carcinomas*) ist eine Methylierung von FANCF für 15 % (13 von 89) und für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) für 14 % (22 von 158) der Proben beschrieben worden [MARSIT et al, 2004].

Publikation	Tumorart	Häufigkeit der Methylierung	Genexpression	Anmerkungen
Taniguchi et al, 2003	Ovarialkarzinom	21% (4 von 19)		
	Ovariale Tumorzelllinien	16% (4 von 25) TOV-21G, 2008, C13*, OAW42		
Tischkowitz et al, 2003	Akute myeloische Leukämie	0% (0 von 36)		
Olopade und Wei, 2003	Mammakarzinom	17,3% (13 von 75)		
Dhillon et al, 2004	Granulosazelltumoren	24% (6 von 25)		
Marsit et al, 2004	HNSCC	15% (13 von 89)		Assoziation mit längerem Alkoholkonsum
	NSCLC	14% (22 von 158)		Assoziation mit kürzerem Tabakabusus und einem jüngeren Alter zu Beginn des Rauchens; für Adenokarzinom signifikanter Prädiktor für schlechteres Überleben
Snyder et al, 2007	38 Zelllinien (HNSCC & NSCLC)	0% (0 von 38)		
	10 HNSCC-Zelllinien	Nicht untersucht	Keine Veränderung	
Narayan et al, 2004	Zervixkarzinom	30% (27 von 91)		LOH von 1p bei 14 Proben; davon 5 methyliert
	Zervixkarzinom-Zelllinien	33% (3 von 9)	Herabreguliert bei den 3 methylierten und 3 weiteren Zelllinien	Methylierung signifikant häufiger bei Patientinnen über 45 Jahren
Koul et al, 2004	Nichtseminom	6,7% (4 von 60)		
Teodoridis et al, 2005	Ovarialkarzinom	0% (0 von unbekannt)		
Meyer et al, 2006	Knochenmarksbiopsien von Patienten mit Leukämie	0% (0 von 81)		

Tabelle 23 Publikationen zur Methylierung und Genexpression von FANCF

Dabei war die Methylierung ein signifikanter Prädiktor für ein kürzeres Überleben beim Adenokarzinom der Lunge. SNYDER et al [2007] untersuchten zehn Zelllinien von HNSCC unter anderem auf die Expression von FANCF. Sie zeigen unterschiedliche Cisplatin-Empfindlichkeiten der Zelllinien, konnten dabei aber im Vergleich zu der TOV-21G Ovarialzelllinie keine Herabregulation der Transkription von FANCF oder anderer mRNAs von Fanconi Anämie-Genen nachweisen. Die Arbeitsgruppe schließt daraus, dass die Unterschiede in der Cisplatin-Sensitivität von anderen Faktoren abhängen.

Bei Keimzelltumoren des Mannes ist eine FANCF-Methylierung selten [KOUL et al, 2004] und Nichtseminome sprechen in der Regel sehr gut auf Cisplatin an. Die Rolle der FANCF-Methylierung bei der Cisplatin-Empfindlichkeit des Nichtseminoms wird daher als eher begrenzt gesehen [TANIGUCHI und D'ANDREA, 2006].

5.3 Untersuchung der Genexpression des Kandidatengens FANCF

Die Genexpression von FANCF wurde mit einem auf der *TaqMan*[®]-Technologie basierenden *Gene Expression Assay* von Applied Biosystems an elf Ovarialkarzinomgeweben und der Ovarialzelllinie OvCaR3 durchgeführt. Dabei lagen acht Gewebe von primären Ovarialtumoren und drei Proben von Netzmetastasen vor. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mittels Relativer Quantifizierung mit der „*Comparative Ct method*“. Als endogene Kontrolle wurde HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) ausgewählt. Die Proben wurden gegen Normalgewebe (tumorfrees Peritoneum) kalibriert.

5.3.1 Normalisierung von Genexpressionsdaten

Für die erfolgreiche Durchführung von Genexpressions-Studien mittels *Real-Time-PCR* auf dem *TaqMan*[®] gibt es unter anderem folgende wichtige Voraussetzungen [APPLIED BIOSYSTEMS, 2004]:

- Hohe RNA-Qualität
- Verwendung des gleichen Pools von Standards und Kalibratoren während der gesamten Studie
- Festlegen von *Baselines* und *Thresholds* an geeigneter Stelle, am besten mittels des Auto-Ct- und Auto-Baseline-Modus des *TaqMan*[®]
- Die Schwelle muss in den exponentiellen Bereich der PCR gelegt werden
- Verwendung von Assays mit hoher PCR-Effizienz

Verunreinigende Proteine können zu PCR-Hemmung und RNA-Degradierung führen. In den Proben verbleibende DNA kann die Ergebnisse verfälschen. Eine schlechte PCR-Effizienz führt zu Ungenauigkeiten und dadurch zu einer schlechten Quantifizierung.

Um valide Daten bei der Genexpressionsanalyse zu erhalten, ist neben den oben genannten Kriterien die Normalisierung der Expressionsdaten gegen eine interne Referenz besonders wichtig. Die Verwendung von geeigneten internen Kontrollgenen ist von großer Bedeutung, um die Ergebnisse verschiedener Proben vergleichbar zu machen und um eine fehlerhafte Normalisierung zu vermeiden [OHL et al, 2005; GOIDIN et al, 2001, DE KOK et al, 2005; BAS et al, 2004; WIEDEMANN et al, 2004].

5.3.1.1 Normalisierung gegen die Gesamt-RNA

Ideal wäre es, die Zahl der Gentranskripte gegen die Zellzahl zu normalisieren. Dies ist jedoch für solide epitheliale Gewebe, wie zum Beispiel Ovarialgewebe, nicht praktikabel. Eine Quantifizierung der gesamten RNA-Menge ist möglich und wird von einigen Autoren empfohlen [TRICARICO et al, 2002; DHEDA et al, 2004]. Allerdings birgt auch die Normalisierung gegen die Gesamt-RNA gewisse Probleme: Insbesondere wenn nur eine geringe Menge einer klinischen Probe zur Verfügung steht (unter 100 ng/ μ l), ist eine zuverlässige Messung nicht möglich [TRICARICO et al, 2002; DHEDA et al, 2004]. Zusätzliche Schwierigkeiten können die Ungenauigkeit des verwendeten Photospektrometers sowie die Kontamination der Proben insbesondere durch trotz DNase-Behandlung verbleibende DNA bereiten [DHEDA et al, 2004]. Außerdem ist es möglich, dass sich der RNA-Gehalt der Zelle mit zunehmender Tumor-Aneuploidie erhöht [DE KOK et al, 2005].

Verschiedene physiologische Bedingungen können unterschiedlichen Einfluss auf die Menge der Gesamt-RNA und/oder mRNA eines Zelltyps haben [SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000]: SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK [2000] zeigten, dass sich die Gesamt-RNA-Menge von Fibroblasten unter Stimulation nicht änderte, die Menge der mRNA jedoch signifikant zunahm. Zudem kann die Bestimmung der Gesamt-RNA keine Unterschiede der RNA-Qualität und der Effizienz der RNA-Isolierung und der Reversen Transkription verschiedener Proben korrigieren [DE KOK et al, 2005].

5.3.1.2 Normalisierung gegen „Housekeeping Genes“

Weit verbreitet ist die Normalisierung gegen Gene, die in allen Zellen exprimiert werden und für die Zellfunktion essentiell sind, so genannte „Housekeeping Genes“. Man wählt diese aus, um die Variabilität zwischen klinischen Proben, zum Beispiel Unterschiede in

der Menge an in die Reaktion eingesetzten Zellen, der RNA-Qualität, der Effizienz der RNA-Isolierung und der Reversen Transkriptase sowie der Behandlung der Proben im Laufe des Experiments zu korrigieren [SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000; DE KOK et al, 2005]. In der Literatur finden sich zahlreiche Gene, die für die Normalisierung verwendet werden. Bislang existiert jedoch kein Standard-Referenzgen für von Ovarien abstammende Tumoren.

Eine grundlegende Voraussetzung für ein *Housekeeping* Gen ist, dass für das gewählte Gen in der Studiengruppe keine Expressionsunterschiede bestehen. Die Expression sollte bei unterschiedlichen Tumorstadien oder unterschiedlicher Differenzierung der Tumorzellen stabil bleiben. Ein geeignetes Referenzgen sollte in seiner Expression nicht durch *Grading* und *Staging* der untersuchten Tumoren beeinflusst werden. Zudem sollten als interne Kontrolle in Betracht gezogene Gene nicht reguliert sein. Das bedeutet, dass kein Expressionsunterschied zwischen malignen und nicht malignen Gewebeproben bestehen sollte [OHL et al, 2005; FISCHER et al, 2005]. Kontrollgen und Zielgen dürfen nicht koreguliert sein [FISCHER et al, 2005]. Eine weitere Voraussetzung einer adäquaten Normalisierung ist, dass sich die Expression des gewählten Referenzgens während des Zellzyklus nicht wesentlich ändert oder durch verschiedene experimentelle Bedingungen beeinflusst wird [BAS et al, 2004, SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000].

Haushaltsgene sind zwar für die Instandhaltung der Zellfunktion essentiell, es wurde jedoch gezeigt, dass ihre Expression unter verschiedenen metabolischen oder experimentellen Bedingungen sowie zwischen verschiedenen Geweben und Zelltypen nicht konstant bleibt [SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000, GOIDIN et al, 2001]. Auch ein bestimmter Zelltyp kann unter verschiedenen physiologischen Bedingungen verschiedene Mengen an Gesamt- und mRNA enthalten. Selbst Zellen mit dem gleichen pathologischen Ursprung (also zum Beispiel die Zellen innerhalb eines Tumors) können heterogen sein [GOIDIN et al, 2001].

Die Expression eines Kontrollgens kann aufgrund von neoplastischem Wachstum, Hypoxie oder der experimentellen Handhabung und der Lagerung variieren [GOIDIN et al, 2001; DE KOK et al, 2005; ALMEIDA et al, 2004]. So zeigten ALMEIDA et al 2004, dass zum Beispiel Ischämie während der Operation oder die Dauer der Lagerung und Handhabung der Proben bei Raumtemperatur zu einer Degradierung von mRNA führen und Einfluss auf die Expression von Haushaltsgenen nehmen können. Aus diesen Gründen können Referenzgene einen ernstzunehmenden Einfluss auf die korrekte

Interpretation von Expressiondaten haben [GOIDIN et al, 2001; DE KOK et al, 2005]. Somit ist es wichtig, die Akquisition der Proben, die RNA-Isolation und die Reverse Transkription unter möglichst konstanten und standardisierten Bedingungen durchzuführen und die Lagerung bei Raumtemperatur möglichst gering zu halten [TRICARICO et al, 2002].

Die Wahl einer geeigneten und validen Form der Normalisierung für jedes Experiment, jeden Zelltyp und jede Form von Krebs ist für die richtige und reproduzierbare Interpretation von Genexpressions-Profilen eine unabdingbare Voraussetzung. Da bei verschiedenen Gewebetypen einzelne Haushaltsgene besser oder schlechter für die Normalisierung geeignet sein können, empfehlen WIEDEMANN et al [2004] die Identifikation der stabilsten Referenzgene durch Testung verschiedener Gene für das jeweilige Probenkollektiv.

5.3.2 Wahl eines Housekeepers für diese Doktorarbeit

Mit dem Ziel, einen oder mehrere geeignete *Housekeeper* für die Normalisierung von Ovarialgewebe zu finden wurden im Rahmen einer parallel verlaufenden Doktorarbeit verschiedene in der Literatur erwähnte Referenzgene getestet. HPRT1 und ALAS erwiesen sich in unserer Arbeitsgruppe gleichermaßen als die stabilsten Referenzgene für die Normalisierung unseres Probenkollektivs.

In der Literatur wird HPRT1 als relativ gering exprimiertes Gen beschrieben [DE KOK et al, 2005; OHL et al, 2005]. In verschiedenen Studien zeigte sich HPRT als stabilstes und somit am besten geeignetes internes Kontrollgen für die Normalisierung von Expressionsdaten [DE KOK et al, 2005; OHL et al, 2005; FISCHER et al, 2005].

Mehrere Arbeitsgruppen vertreten die Meinung, dass die Verwendung eines einzelnen Haushaltsgens aufgrund signifikanter Expressionsunterschiede zwischen Geweben in der Regel unzureichend ist und dass die Verwendung eines Normalisierungsfaktors, bestehend aus den Daten mehrerer Kontrollgene, diese Unterschiede am besten ausgleicht [TRICARICO et al, 2002; WIEDEMANN et al, 2004; FISCHER et al, 2005].

DE KOK et al [2005] und OHL et al [2005] zeigen jedoch, dass die Verwendung eines Normalisierungsfaktors die Verlässlichkeit und Genauigkeit der Normalisierung zwar noch erhöhen kann, HPRT allein jedoch auch zuverlässige Ergebnisse der Normalisierung liefert und für die meisten Anwendungen in der Forschung ausreichend ist: Im Rahmen einer Studie mit 13 häufig verwendeten internen Kontrollgenen beschreiben DE KOK et al [2005], dass HPRT1 eine zuverlässige und ökonomische Alternative für die Messung mehrerer Haushaltsgene sein kann, da es am genauesten

das mittlere Expressionsmuster von zehn anderen Referenzgenen widerspiegelt. OHL et al [2005] beschreiben HPRT als stabilstes von 16 untersuchten Genen für die Normalisierung von Prostatagewebe. In der von ihnen vorgestellten Studie war die Verwendung von HPRT als einziges Referenzgen ausreichend.

Aufgrund dieser Daten und der Ergebnisse der in unserer Arbeitsgruppe an Ovarialgewebe durchgeführten *Housekeeper*-Tests entschieden wir uns für die Verwendung von HPRT für die Normalisierung unserer Expressionsdaten.

5.3.3 Diskussion der Ergebnisse der Genexpression von FANCF

Im Rahmen der Analyse des Methylierungsstatus einer CpG-Insel-Region im Fanconi Anämie-Gen FANCF (nt 183-473) konnte an 45 mittels Methylierungs-spezifischer PCR und Bisulfitsequenzierung untersuchten Ovarialtumorproben keine Hypermethylierung der untersuchten Region nachgewiesen werden. Somit konnten die von TANIGUCHI et al [2003] und DHILLON et al [2004] veröffentlichten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Unsere Ergebnisse waren jedoch konform mit den Ergebnissen von THEODORIDIS et al [2005], die an einem noch größeren Probenkollektiv gewonnen worden sind.

Um unsere Daten auf transkriptionellem Niveau zu bestätigen und um zu ermitteln, ob sich in der Expression von FANCF Auffälligkeiten finden, wurde an einem aus elf Proben bestehenden Kollektiv der zuvor auf Methylierung untersuchten Proben die Genexpression von FANCF quantifiziert. Ziel dabei war es, herauszufinden, ob sich eine Veränderung der Expression von FANCF im Vergleich zum Normalgewebe findet.

Für die Berechnung der relativen Genexpression wurde der aus den Ct-Werten von Triplikaten ermittelte Mittelwert eingesetzt. Die Verwendung von identischen Replikaten ermöglicht es, die Genauigkeit der PCR-Amplifikation und der Nachweisschritte sowie die Homogenität der Probe zu kontrollieren. Zudem kann überprüft werden, wie genau pipettiert worden ist [LIVAK, 2001]. Nach einer Empfehlung von Applied Biosystems im „Guide to performing relative Quantification of Gene Expression“ [APPLIED BIOSYSTEMS, 2004] sollte die Standardabweichung für die identischen Replikate unter 0,3 liegen, um eine akkurate Berechnung der Genexpression zu gewährleisten. Für die Messung von niedrig-gradigen Unterschieden sollte nur eine möglichst geringe Varianz der Ct-Werte der Triplikate toleriert werden. Die Standardabweichung für die Triplikate lag bei acht Proben $\leq 0,2$, für die restlichen 18 Proben wurde eine Standardabweichung von $\leq 0,1$ erreicht (siehe Tabelle 22). Der Anspruch einer möglichst geringen Varianz ist mit durchwegs unter 0,2 liegenden Werten also in der

vorliegenden Arbeit erfüllt und man kann von einer validen Berechnung der relativen Genexpression ausgehen.

Wie aufgrund unserer Ergebnisse im Bereich der Methylierung erwartet, fand sich keine Herabregulation der Genexpression der untersuchten Proben. Es zeigte sich im Gegenteil, dass alle untersuchten Tumorproben im Vergleich zum Normalgewebe eine 1,5 bis 8-fache Steigerung der Expression aufwiesen.

Bei 82% der Proben lag eine über zweifache, bei 27% der Proben eine über vierfache Erhöhung der Genexpression vor. Lediglich die Zelllinie OvCaR3 zeigte eine geringere Expression als der Kalibrator. Im Falle einer Methylierung der Proben wäre eine Herabregulation der Expression von FANCF zu erwarten gewesen.

Das Kollektiv unserer Vorstudie ist relativ klein und somit stellt sich die Frage, inwieweit es repräsentativ ist. Für eine klare Aussage müsste die Untersuchung an einem weitaus größeren Probenkollektiv, zum Beispiel auf einem Expressionschip, durchgeführt werden. Aus Zeit- und Kostengründen war dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht möglich.

Die Expressionssteigerung von FANCF widerspricht der in der Vorstudie aufgefallenen Häufung von LOHs in diesem Bereich von Chromosom 11p. Allerdings wurden die Expression aus technischen Gründen nur an den im Rahmen dieser Doktorarbeit neu etablierten Tumorproben untersucht. Diese zeigen im Gegensatz zu den Proben mit in der CGH aufgefallenen chromosomalen Deletionen im Bereich von 11p nur einen geringen Prozentsatz an LOHs für den nahe dem FANCF-Gen gelegenen Marker CA14 (15% vs. 50% bei der Vorstudie). Interessant wäre eine Expressionsanalyse von FANCF bei den in der CGH auffälligen Proben, für die aber leider keine RNA zur Verfügung steht.

5.4 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse

Bei der LOH-Analyse des chromosomalen Bereichs 11p zeigten sich in den untersuchten Ovarialkarzinomen relativ große LOH-Intervalle und komplexe Muster, so dass die Eingrenzung auf definierte LOH-Intervalle nicht möglich war. Es zeigte sich jedoch eine Häufung von LOH-Ereignissen bzw. Allelimbalanzen beim KAI1-Locus und bei ST5. Aufgrund der Schwierigkeiten, mittels LOH-Analysen Kandidatengene zu identifizieren wurde die Literaturrecherche zur Hilfe genommen. Vielversprechend erschien das KAI1-Gen. Der in unmittelbarer Nachbarschaft zu KAI1 gelegene Marker AFM255 zeigte für über 50% der untersuchten Tumoren ein Ereignis. ST5 wäre auch

ein potentieller Bereich für weitere Untersuchungen, über dieses Gen ist derzeit in der Literatur jedoch wenig bekannt.

Aufgrund von Literaturdaten und den Ergebnissen der von HAUENSTEIN [2005] durchgeführten Vorstudie war das FANCF-Gen für weiterführende Untersuchungen ausgewählt worden. Unsere Daten im Bereich der Expression und Methylierung von FANCF legen nahe, dass die Methylierung von FANCF kein entscheidender Mechanismus bei der Tumorprogression des Ovarialkarzinoms ist. Die an einem Probenkollektiv von 42 Ovarialkarzinomen gewonnenen Ergebnisse stimmen mit einer während dieser Doktorarbeit erschienenen Studie [TEODORIDIS et al, 2005] überein. Sie sprechen im Gegensatz zu den Daten früherer Studien [TANIGUCHI et al, 2003; DHILLON et al, 2004] gegen eine größere Bedeutung der Methylierung von FANCF bei der Tumorentstehung und -progression des Ovarialkarzinoms. Auch TANIGUCHI und D'ANDREA kommen in einem 2006 veröffentlichten *Review*-Artikel zu dem Schluss, dass die tatsächliche Prävalenz der Methylierung von FANCF deutlich niedriger liegen könnte, als von ihnen ursprünglich angenommen. Die von uns beobachtete Expressionssteigerung könnte jedoch Einfluss auf das Resistenzverhalten der Ovarialkarzinome haben, da eine bessere DNA-Reparaturkapazität eine Ursache für die im Krankheitsverlauf häufig entstehende Resistenz gegen Platintherapien sein könnte. Um eine klarere Aussage treffen zu können müsste aber insbesondere die Expressionsstudie an einem größeren Probenkollektiv fortgeführt werden, zum Beispiel im Rahmen einer Analyse mit einem Genexpressionschip. Die soll in weiteren Studien evaluiert werden.

Aufgrund der in dieser Doktorarbeit erneut bestätigten Schwierigkeiten, bei der LOH-Analyse tatsächlich eindeutige und vor allem auch klinisch relevante Ergebnisse zu erlangen, erscheint es sinnvoll, zukünftig direkt die Expression von potentiellen Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen mittels Immunhistochemie oder mRNA-Expression zu messen. Inzwischen stehen Microarrays zur Verfügung, die durch die simultane Untersuchung verschiedener *Targets* die Ermittlung von Genexpressionsprofilen ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom stellt das gynäkologische Malignom mit der höchsten Mortalität dar. Da Ovarialtumoren erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch werden und daher schwer zu therapieren sind, ist die Identifizierung von Markern zur besseren Früherkennung bzw. zur Therapievorhersage von besonderem wissenschaftlichem und klinischem Interesse. So zeigen Ovarialkarzinome eine Vielzahl chromosomaler und genetischer Alterationen, die Einfluss auf das maligne Potential und das Ansprechen auf verschiedene Behandlungsansätze haben.

In vorangegangenen Studien zur Zytogenetik des Ovarialkarzinoms wurde mittels komparativer Genom-Hybridisierung ein Verlust von chromosomalem Material für die Region 11p15 bis 11p13 beschrieben. Um Tumorsuppressorgene in dieser Region zu ermitteln wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Feinkartierung von Loss of Heterozygosity (LOH)-Intervallen mittels Mikrosatellitenanalyse in der Region 11p begonnen.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde das vorhandene Probenkollektiv an Ovarialkarzinomgeweben ausgebaut und die Feinkartierung von Chromosom 11p um weitere Mikrosatellitenmarker erweitert, so dass die chromosomale Region 11p15.5 bis 11p11.2 mit 11 Markern auf allelische Imbalancen analysiert wurde. Im Bereich von ST5 und AFM255/KAI1-Locus konnten potentielle Intervalle abgegrenzt werden.

Das als Metastasesuppressor beschriebene Gen KAI1 liegt nahe dem Marker AFM255, für den in der Mikrosatellitenanalyse bei über der Hälfte der untersuchten Proben ein LOH nachweisbar war.

Das Fanconi Anämie-Gen FANCF, das auf Chromosom 11p15 lokalisiert ist, wurde aufgrund von Daten aus einer vorangegangenen Studie für weiterführende Untersuchungen in dieser Doktorarbeit ausgewählt. Es handelt sich bei der Fanconi Anämie um eine heterogene Erkrankung, die mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Krebs, einer gesteigerten Chromosomenbrüchigkeit und einer Überempfindlichkeit für DNA-Crosslinker einhergeht. Frühere Studien berichteten über eine Abschaltung des FANCF-Gens durch Hypermethylierung beim Ovarialkarzinom. Sie bringen damit eine Unterbrechung des kürzlich beschriebenen Fanconi Anämie-BRCA-DNA-Reparatur-*Pathways* in Verbindung. Zudem wird ein möglicher Zusammenhang mit dem Ansprechen auf cisplatinhaltige Chemotherapie vermutet.

Da das Probenkollektiv der vorangegangenen Studien sehr klein war, führten wir in unserem etwas größeren Kollektiv weitere Untersuchungen zum FANCF-Status durch, um die Literaturdaten zu bestätigen. Die Promoterregion von FANCF wurde mittels Methylierungs-spezifischer PCR und Bisulfitsequenzierung auf ihren DNA-Methylierungsstatus untersucht. Die Genexpression von FANCF wurde parallel mit der TaqMan[®]-Technologie in einem ausgewählten Probenkollektiv quantifiziert.

Übereinstimmend mit einer während dieser Doktorarbeit erschienenen Studie wurde in unserem Probenkollektiv von 42 Ovarialkarzinomen keine Hypermethylierung im FANCF-Gen nachgewiesen. Wie aufgrund dieser Ergebnisse erwartet fand sich auch keine Herabregulierung der Genexpression der untersuchten Proben. Vielmehr zeigten die untersuchten Proben im Vergleich zum Normalgewebe eine Steigerung der mRNA-Expression um den Faktor 1,5 - 8.

Die Expressionssteigerung von FANCF widerspricht der in der Vorstudie aufgefallenen Häufung von LOHs in diesem Bereich von Chromosom 11p. Allerdings wurden die Expression aus technischen Gründen nur an den im Rahmen dieser Doktorarbeit neu etablierten Tumorproben untersucht, bei denen sich keine wesentliche Häufung von LOHs im Bereich von FANCF zeigte.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Methylierung von FANCF kein entscheidender Mechanismus bei der Tumorentstehung und –progression des Ovarialkarzinoms ist. Die Expressionssteigerung könnte jedoch Einfluss auf das Resistenzverhalten der Ovarialkarzinome haben, da eine bessere DNA-Reparaturkapazität eine Ursache für die Resistenz gegen Platintherapien sein könnte. Es ist geplant, dies in weiteren Studien zu evaluieren.

7 Literaturverzeichnis

- Almeida A, Thiery JP, Magdelénat H, Radvanyi F. Gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of tissue handling. *Anal Biochem* 328 (2004) 101-108
- Applied Biosystems (Hrsg.). Essentials of real time PCR. Applied Biosystems. www.appliedbiosystems.com
- Applied Biosystems (Hrsg.), Abi Prism Sequence Detection System - User Bulletin #2 (2001) www.appliedbiosystems.com
- Applied Biosystems (Hrsg.). TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol (2002) www.appliedbiosystems.com
- Applied Biosystems (Hrsg.). Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR (2004). www.appliedbiosystems.com
- Balch C, Huang T H-M, Brown R, Nephew KP. The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *Am J Obst Gynecol* 191 (2004) 1552-72
- Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 59 (2004) 566 – 573
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321 (1986) 209-213
- Camilleri-Broët S, Hardy-Bessard AC, Le Tourneau A, Paraiso D, Levrel O, Leduc B, Bain S, Orfeuvre H, Audouin J, Pujade-Lauraine E; GINECO group. HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group. *Ann Oncol* 15 (2004) 104-112
- Cao Q, Abeysinghe H, Chow O, Xu J, Kaung H, Fong C, Keng P, Insel R, Lee W, Barrett J, Wang N. Suppression of tumorigenicity in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3 by microcell-mediated transfer of chromosome 11. *Cancer Genet Cytogenet* 129 (2001) 131-137
- Chen Q, Van der Sluis PC, Boulware D, Hazlehurst LA, Dalton WS. The FA/BRCAPathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 106 (2005) 698-705
- Cleton-Jansen AM, Callen DF, Seshadri R, Goldup S, Mccallum B, Crawford J, Powell JA, Settasatian C, van Beerendonk H, Moerland EW, Smit VT, Harris WH, Millis R, Morgan NV, Barnes D, Mathew CF, Cornelisse CJ. Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in 712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions. *Cancer Res* 61 (2001) 1171-1177
- Clark S, Harrison J, Paul C, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids Res* 22(1994) 2990-2997
- De Bustros A, Nelkin B, Silverman A, Ehrlich G, Poiesz B, Baylin S. The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) 5693-5697
- De Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Spans PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85 (2005) 154–159
- D'Andrea. The Fanconi Anemia/BRCA Signaling Pathway. *Cell Cycle* 2 (2003) 290-292
- Demuth I, Wlodarski M, Digweed M. Fanconi-Anämie: Paradigma der genetischen Heterogenität. *Med. Genet.* 2 (2002) 17-23

- Devany J, Marino M. Transgenomic. Application Note 110: Microsatellite DNA Analysis with the Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System. (2000) www.transgenomic.com (Hrsg.)
- Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ. Ever since Knudson. Trends Genet 17 (2001) 569-573
- De Winter JP, Roimans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. Nat Genet 24 (2000) 15-16
- Dheda K, Hugget JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques 37 (2004) 112-119
- Dhillon V, Shahid M, Husain S. CpG methylation of the FHIT, FANCF, cyclin-D2, BRCA2 and RUNX3 genes in granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin. Mol Cancer (2004) 3:33
- Diebold J, Dettmar P, Nähring J. Histologische Klassifikation und Einteilung. In „Manual Maligne Ovarialtumoren“, Schmalfeldt B (Hrsg.). Zuckschwerdt, München Wien New York, 2007, 8. Auflage, 13-18
- Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. Science 268 (1995) 884-886.
- Dorn J, Harbeck N, Kates R, Magdolen V, Grass L, Soosaipillai A, Schmalfeldt B, Diamandis EP, Schmitt M. Disease processes may be reflected by correlations among tissue kallikrein proteases but not with proteolytic factors uPA and PAI-1 in primary ovarian carcinoma. Biol Chem 387 (2006) 1121–1128
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. Science 300 (2003) 455
- Ehlen T, Dubeau L. Loss of heterozygosity on chromosomal segments 3p, 6q, 11p in human ovarian carcinomas. Oncogene 5 (1990) 219-223
- Ehrich M, Zoll S, Sur S, van der Boom D. A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. Nucleic Acids Res 35 (2007) e29
- Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol 196 (2001) 1-7
- Fischer M, Skowron M, Berthold F. Reliable transcript quantification by real-time RT-PCR in primary neuroblastoma using normalization to averaged expression levels of the control genes HPRT and SDHA. J Mol Diagn 7 (2005) 89-96
- Gabra H, Taylor L, Cohen BB, Lessels A, Eccles DM, Leonard RCF, Smyth JF, Steel CM. Chromosome 11 allele imbalance and clinopathological correlates in ovarian tumours. Br J Cancer 72 (1995) 367-375
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Henja J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. Mol Cell 7 (2001) 249-262
- GEKID (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.), RKI (Robert Koch Institut) (Hrsg.). Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. (2006) 5. Auflage. www.rki.de
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA Prevails over Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and β -Actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. Anal Biochem 295 (2001) 17–21
- Gross E, Kiechle M, Arnold N. Mutation analysis of p53 in ovarian tumors by DHPLC J Biochem Biophys Methods 47 (2001) 73-81

- Gross E, Hölzl G, Arnold N, Hauenstein E, Jacobsen A, Schulze K, Ramser J, Meindl A, Kiechle M, Oefner PJ. Allelic loss analysis by denaturing high performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Hum Mutat* 28 (2007) 303-311
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) E65-5
- Hauenstein E. Feinkartierung eines Intervalls auf Chromosom 11p bei sporadischen Ovarialkarzinomen - ein Vergleich von Ion-Pair Reversed-Phase HPLC und Kapillarelektrophorese. Medizinische Fakultät der Technischen Universität München, München, 2005
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 9821-9826
- Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaaker J, Bock JE, Glud E, Norgaard-Pedersen B, Hogdall CK. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study. *Cancer* 98 (2003) 66-73
- Hogdall EV, Kjaer SK, Blaakaer J, Christensen L, Glud E, Vuust J, Hogdall CK. P53 mutations in tissue from Danish ovarian cancer patients: from the Danish "MALOVA" ovarian cancer study. *Gynecol Oncol* 100 (2006) 76-82
- Houle C, Ding X, Foley J, Afshari C, Barrett J, Davis B. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol* 86 (2002) 69-78
- Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Jonje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD. Biallelic Inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. *Science* 297 (2002) 606-609
- Jackson P, Millar D, Kingsley E, Yardley G, Ow K, Clark S, Russell PJ. Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett* 157 (2000) 169-176
- Jacobsen A. Vergleichende genomische Hybridisierung zur Charakterisierung genetischer Alterationen in Ovarialkarzinomen. Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät der Christian Albrechts Universität zu Kiel, 2000
- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21 (1999) 163-167
- Kawana Y, Komiya A, Ueda T, Nihei N, Kuramochi H, Suzuki H, Yatani R, Imai T, Dong JT, Imai T, Yoshie O, Barrett JC, Isaacs JT, Shimazaki J, Ito H, Ichikawa T. Location of KAI1 on the short arm of human chromosome 11 and frequency of allelic loss in advanced human prostate cancer. *Prostate* 32 (1997) 205-213
- Kiechle M, Jacobsen A, Schwarz-Boeger U, Hedderich J, Pfisterer J, Arnold N. Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation. *Cancer* 91 (2001) 534-540
- Kiechle-Schwarz M, Bauknecht T, Wienker T, Walz L, Pfeleiderer A. Loss of constitutional heterozygosity on chromosome 11p in human ovarian cancer – positive correlation with grade of differentiation. *Cancer* 72 (1993) 2423-2432
- Kiechle-Schwarz M, Bauknecht T, Karck U, Kommos F, Du Bois A, Pfeleiderer A. Recurrent cytogenetic aberrations and loss of constitutional heterozygosity in ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 55 (1994) 198-205
- Kim YI, Shin MK, Lee JW, Chung JH, Lee MH. Decreased expression of KAI1/CD82 metastasis suppressor gene is associated with loss of heterozygosity in melanoma cell lines. *Oncol Rep* 21 (2009) 159-164

- Koul S, McKiernan J, Narayan G, Houldsworth J, Bacik J, Dobrzynski D, Assaad A, Mansukhani M, Reuter V, Bosl G, Chaganti R, Murty V. Role of promoter hypermethylation in cisplatin treatment response of male germ cell tumors. *Mol Cancer* 3 (2004) 16
- Kuhn W, Schmalfeldt B, Reuning U, Pache L, Berger U, Ulm K, Harbeck N, Dettmar P, Höfler H, Jänicke F, Schmitt M, Graeff H. Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer* 79 (1999) 1746–1751
- Leary JA, Doris CP, Boltz EM, Houghton CRS, Kefford RF, Friedlander ML. Investigation of loss of heterozygosity at specific loci on chromosomes 3p, 6q, 11p, 17p and 17q in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 3 (1993) 293-298
- Lee JH, Kavanagh JJ, Wildrick DM, Wharton JT, Blick M. Frequent Loss of Heterozygosity on Chromosomes 6q, 11, and 17 in Human Ovarian Carcinomas. *Cancer Res* 50 (1990) 2724-2728
- Léveillé F, Blom E, Medhurst AL, Bier P, Laghmani el H, Johnson M, Rooimans MA, Sobeck A, Waisfisz Q, Arwert F, Patel KJ, Hoatlin ME, Jonje H, de Winter JP. The fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein. *J Biol Chem* 279 (2004) 39421-30
- Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ESC, Hung MJ. Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 78 (2000) 10–15
- Liu ZJ, Maekawa M. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis. *Anal Biochem* 317 (2003) 259-265
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT. *Methods* 25 (2001) 402-408
- Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi (1892 – 1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 893-898
- Lu KH, Weitzel JN, Kodali S, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC. A novel 4-cM minimally deleted region on chromosome 11p15.1 associated with high grade nonmucinous epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 57 (1997) 387-390
- Mahadevan D, Spier C, Della Croce K, Miller S, George B, Riley C, Warner S, Grogan TM, Miller TP. Transcript profiling in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, and diffuse large B-cell lymphoma identifies distinct tumor profile signatures. *Mol Cancer Ther* 4 (2005) 1867-1879
- Maier S, Harbeck N, Schmitt M, Foekens JA, Martens JWM. DNA methylation in breast cancer as diagnostic markers and targets for cancer therapy. In: "Molecular Oncology of Breast Cancer". Ross J, Hotobagyi G (Hrsg.). Jones and Bartlett, Boston, 2004, 289-312
- Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 64 (1991) 313-326
- Marsit C, Liu M, Nelson H, Posner M, Suzuki M, Kelesey K. Inactivation of the Fanconi anemia / BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene* 23 (2004) 1000-1004
- Meyer S, White DJ, Will AM, Eden T, Sim A, Brown R, Strathdee G. No evidence of significant silencing of Fanconi genes FANCF and FANCB or Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 by DNA hypermethylation in sporadic childhood leukaemia. *Br J Haematol* 134 (2006) 61-63
- Munson K, Haefele R, Kuklin A, Gjerde D, Taylor P. Application Note 107: Sizing of DNA Fragments with the Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System (2000) www.transgenomic.com (Hrsg.)
- Narayan G, Arias-Pulido H, Nandula S, Basso K, Sugirtharaj D, Vargas H, Mansukhani M, VILLELLA J, Meyer L, Schneider A, Gissmann L, Dürst M, Pothuri B, Murty V. Promotor hypermethylation of FANCF: Disruption of fanconi anemia-BRCA pathway in cervical cancer. *Cancer Res* 64 (2004) 2994-2997

- Niemeyer C, Baumann I, Führer M. „Aplastische Anämien“. In: „Pädiatrische Hämatologie und Onkologie“. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (Hrsg), Springer Berlin, Heidelberg: pp 40-65 (2006)
- Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Cantor M, Kirkner GJ, Spiegelmann D, Makrigiorgos GM, Weisenberger DJ, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn* 8 (2006) 209-217
- Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A, Jung K. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?. *J Mol Med* 83 (2005) 1014-1024
- Olopade O, Wei M. FANCF methylation contributes to chemoselectivity in ovarian cancer. *Cancer Cell* 3 (2003) 417-420
- Ponder B. Gene losses in human tumours. *Nature* 335 (1988) 400-402
- Raizis AM, Schmitt F, Jost JP. A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal Biochem* 226 (1995) 161-6
- Rimon E, Sasson R, Dantes A, Land-Bracha A, Amsterdam A. Gonadotropin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients: modulation of genes coding for growth factors and their receptors and genes involved in cancer and other diseases. *Int J Oncol* 24 (2004) 1325-1338
- Schelling M, Anthuber C, Burges A, Grischke EM, Reif J, Stieber P, Strauss A. „Früherkennung und Diagnostik“. In „Manual Maligne Ovarialtumoren“, Schmalfeldt B (Hrsg.). Zuckschwerdt, München Wien New York, 2007, 8. Auflage, 13-18
- Schild TA. 7700 SDS Workshop - Einführung in die Real-Time Taqman™ PCR-Technologie, Vers. 2.1 (1998), Applied Biosystems, Weiterstadt
- Schmalfeldt B, Prechtel D, Härting K, Späthe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, Lengyel E. Increased Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the Urokinase-Type Plasminogen Activator Is Associated with Progression from Benign to Advanced Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 2396-2404
- Schmalfeldt B (Hrsg.). Manual Maligne Ovarialtumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Tumorzentrum München (Hrsg.), Zuckschwerdt, München Wien New York, 2007, 8. Auflage
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46 (2000) 69-81
- Snyder ER, Ricker JL, Chen Z, van Waes C. Variation of cisplatin sensitivity is not associated with Fanconi Anemia/BRCA pathway inactivation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 245 (2007) 75-80
- Stronach EU, Sellar GC, Blenkiron C, Tabiasz GJ, Taylor KJ, Miller EP, Massie CE, Al-Nafussi A, Smyth JF, Porteous DJ, Gabra H. Identification of clinically relevant genes on chromosome 11 in a functional model of ovarian cancer tumor suppression. *Cancer Res* 63 (2003) 8648-8655
- Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson S, Mathew C, Joenje H, Mok S, D'Andrea A. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat med* 9 (2003) 568-574
- Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 107 (2006) 4223-4233
- Tawaga K, Arihiro K, Takeshima Y, Hiyama E, Yamasaki M, Inai K. Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 90 (1999) 970-976

- Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, Kannall HD, Smyth C, Curto J, Siddiqui N, Gabra H, McLeod HL, Strathdee G, Brown R. CpG Island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 65 (2005) 8961-8967
- Thermo Fisher Scientific (Hrsg.), T042 Technical Support Bulletin NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios (2009) www.nanodrop.com
- Tischkowitz M, Ameziane N, Waisfisz Q, De Winter JP, Harris R, Taniguchi T, D'Andrea D, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H. Bi-allelic silencing of the Fanconi anaemia gene FANCF in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 123 (2003) 469-471
- Tomlinson IPM, Lambros MBK, Roylance RR. Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed?. *Genes, Chromosomes Cancer* 34 (2002) 349-353
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C. Quantitative real-time RT-PCR: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 309 (2002) 293-300
- Vandamme B, Lissens W, Amfo K, De Sutter P, Bourgain C, Vamos E, De Grève J. Deletion of chromosome 11p13-11p15.5 sequences in invasive human ovarian cancer is a subclonal progression factor. *Cancer Res* 52 (1992) 6646-6652
- Viel A, Giannini F, Tumiotto L, Sopracordevole F, Visentin MC, Biocchi M. Chromosomal localisation of two putative 11p oncosuppressor genes involved in human ovarian tumours. *Br J Cancer* 66 (1992) 1030-1036
- Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Müller H, Fiegl H, Goebel G, Marth C, Müller-Holzner E, Zeimet A, Laird P, Ehrlich M. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res* 64 (2004) 4472-4480
- Wiedemann C, Schulz H, Weber BHF. Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *BIOspektrum* 1 (2004) 99-102
- Xiao W, Oefner PJ. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Hum Mutat* 17 (2001) 439-474
- Xie X, Wu L, Du F, Davis A, Peyton M, Tomizawa Y, Maitra A, Tomlinson G, Gazdar A, Weissman B, Bowcock A, Baer R, Minna J. Inactivation of human SRBC, located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region, in breast and lung cancers *Cancer Res* 61 (2001) 7943-7949
- Zheng J, Robinson WR, Ehlen T, Yu MC, Dubeau L. 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 (1991) 4045-4051

Verwendete Websites

- <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> (NEBcutter V2.0)
- www.atcc.org (American type cell culture collection)
- www.genome.ucsc.edu (Goldenpath)
- www.gdb.org (Genome Database)
- www.urogene.org/methprimer (Programm Methprimer)

8 Anhang

8.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1 Modell für die Tumorprogression von Ovarialtumoren

Abbildung 2 Beispiele für IP-RP-HPLC-Chromatogramme

Abbildung 3 Berechnung des Allelic Imbalance Factor (AIF)

Abbildung 4 Beispiele für IP-RP-HPLC-Chromatogramme für den Direpeatmarker ST5

Abbildung 5 Beispiele für Chromatogramme mit in einem Peak ko-eluierenden Allelen

Abbildung 6 Beispiele für in einem Peak ko-eluierende Allele

Abbildung 7 Reverse Transkriptase-Schritt (RT Step) und PCR-Schritt (PCR Step)

Abbildung 8 5'-3' Prinzip der TaqMan®-Reaktion

Abbildung 9 Die CpG-Methylase erkennt 5'... CG ...3'-Sequenzen und methyliert Cytosin an C5

Abbildung 10 Marker für die Untersuchung der Region 11p15.5 bis 11p11.2

Abbildung 11 Etablierung der Positivkontrolle 1

Abbildung 12 Etablierung der Positivkontrolle 2

Abbildung 13 MSP für FANCF mit den Kieler Tumorproben 36 T und 37 T

Abbildung 14 MSP für FANCF mit den Münchner Tumorproben 5 ex, 6 T, 7 T und 12 T

Abbildung 15 HpaII Restriktionsassay

Abbildung 16 Sequenz von FANCF vor der Bisulfitbehandlung

Abbildung 17 Bisulfitmodifizierte Sequenz von FANCF

Abbildung 18 Bisulfitsequenzierung der Probe #8 mit dem Forward Primer

Abbildung 19 Bisulfitsequenzierung der Tumorprobe #8 mit dem Forward Primer, Flat Profile

Abbildung 20 Bisulfitsequenzierung der Tumorprobe #8 mit dem Reverse Primer, Flat Profile

Abbildung 21 Bisulfitsequenzierung der Normalprobe (#10) mit dem Forward Primer, Flat Profile

Abbildung 22 FANCF Amplification Plots für das Normalgewebe und die Tumorprobe 9T

Abbildung 23 HPRT Amplification Plot für die Triplikate des Normalgewebes und der Tumorprobe 9T

Abbildung 24 Diagramm der Relativen Genexpression von FANCF

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach der TNM- und der FIGO-Klassifikation

Tabelle 2 Klinische Daten zu den verwendeten Tumorproben

Tabelle 3 Konzentrationsbestimmung der eingesetzten cDNA-Proben mit dem Nanodrop

Tabelle 4 PCR-Programm für LOH-Analysen

Tabelle 5 Pipettierschema für 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR

Tabelle 6 Pipettierschema für FANCF und HPRT, Endvolumen 40 µl

Tabelle 7 Pipettierschema für FANCF und HPRT, Endvolumen 30 µl

Tabelle 8 Pipettierschema für 18S RNA, Endvolumen 40 µl

Tabelle 9 TaqMan®-Bedingungen

Tabelle 10 Primer für Methylierungs-spezifische PCR

Tabelle 11 a Touch Down-Modus TD-NEW; **b** Touch Down-Modus TD-High

Tabelle 12 PCR-Programm FANCRES nach TANIGUCHI et al, 2003

Tabelle 13 *Primer* für die Bisulfitsequenzierung [TANIGUCHI et al, 2003]

Tabelle 14 Auflistung der Proben für die Bisulfitsequenzierung

Tabelle 15 Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker

Tabelle 16 Ergebnisse der LOH-Analyse mit dHPLC und Kapillarelektrophorese (KE) für die Proben Kiel 1 - 34

Tabelle 17 Schematische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Analyse mit den 11 verwendeten Mikrosatellitenmarkern für die Proben Kiel 1 - 34

Tabelle 18 Ergebnisse der LOH-Analyse mit dHPLC und Kapillarelektrophorese (KE)

Tabelle 19 Schematische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Analyse für die Proben Kiel 35 – 40 und München 1 - 13

Tabelle 20 Übersicht über die Anzahl der mit dem jeweiligen Marker untersuchten Proben

Tabelle 21 Die vom TaqMan® ermittelten Ct-Werte für das *Target* FANCF und die interne Kontrolle HPRT

Tabelle 22 Berechnung der Relativen Genexpression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Tabelle 23 Publikationen zur Methylierung und Genexpression von FANCF

8.3 Abkürzungen

100 bp	100 bp Marker
11p	Kurzer Arm von Chromosom 11
5mC	Methyliertes Cytosin
+Ko	Positivkontrolle
AI	Allelische Imbalanz
AIF	<i>Allelic Imbalance Factor</i>
ATCC	American type cell culture collection
Av	<i>Average</i> , durchschnittlich
BRCA	Brustkrebs-Suszeptibilitäts-Gen
C	Cytosin
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
COBRA	<i>Combined bisulfite restriction analysis</i>
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotid
Ct	<i>Cycle threshold</i> , Schwellenwertzyklus
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
Ex	Netzmetastase
FA	Fanconi Anämie
FANCF	Fanconi Anämie-Protein der Komplementationsgruppe F
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FIGO	Fédération International de Gynécologie et d'Obstétriques
G	<i>Grading</i>
G	Guanosin
Gdb	Genome Database
H	Mit HpaII verdauter Ansatz beim HpaII Restriktionsassay
Het	Heterozygot
IP-RP-HPLC	Ion Pair-Reversed Phase-High Pressure Liquid Chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
K	Aus Kiel stammene Probe
LOH	Loss of Heterozygosity
LOH*	Nicht quantifizierbares LOH
LOI	<i>Loss of imprinting</i>
M	Mit MspI verdauter Ansatz beim HpaII Restriktionsassay
M (MSP)	PCR-Ansatz mit Primern für methylierte DNA bei der MSP
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MMC	Mitomycin C
mRNA	messenger RNA
MSP	Methylierungs-spezifische PCR
Muc	Aus München stammene Probe
N	Normalgewebe
N.b.	Nicht bestimmt
NFQ	Nicht-fluoreszierender <i>Quencher</i>
NI	Nichtinformativ Probe bei der LOH-Analyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	<i>Reporter</i>
RKI	Robert Koch Institut
Rn	Höhe des generierten Fluoreszenzsignals
RT-Schritt	Reverse Transkriptase-Schritt
SAM	S-Adenosylmethionin
Sd	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
STRP	<i>Short Tandem Repeat Polymorphism</i>
T	Tumorgewebe
TD	PCR mit <i>Touch Down</i> -Modus
TEAA	Triethylammoniumacetat
Tm	Primertemperatur
U	Unbehandelter Ansatz beim HpaII Restriktionsassay
U	PCR-Ansatz mit Primern für unmethylierte DNA bei der MSP

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Frau Prof. Dr. Marion Kiechle

Frau Dr. Eva Groß

Herrn Prof. Dr. Alfons Meindl

Steffi Neubauer und Heide Hellebrand

Meinen Mädels, Conny, Susi & Simone

Meinem Großvater Hans Dreyer. Danke für alles, Opa!

Meiner Großmutter Sigrid Dreyer und den Großeltern Elisabeth und Ernst Schulze

Meiner Schwester Julia bt

Und nicht zuletzt meinen Eltern, Dr. Klaus-Dieter und Dagmar Schulze,
die mir stets zur Seite stehen und mich jederzeit unterstützen.