

Aus dem Institut für Humangenetik
(Komm. Direktorin: PD Dr. med. A. Caliebe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vergleich und Validierung aberranter DNA-Methylierungsmuster in unterschiedlichen Lungenkarzinomentitäten

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Maren Kröger
aus Twistringen

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ole Ammerpohl, Institut für Humangenetik
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Anna Trauzold, Institut für Experimentelle
Tumorforschung
Tag der mündlichen Prüfung: 17.08.2020
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.02.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Bronchialkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Klassifikation und therapeutische Konsequenzen	2
1.1.3 Früherkennung.....	4
1.1.4 Molekulare Biomarker	4
1.2 Epigenetik	5
1.2.1 Epigenetische Mechanismen	5
1.2.2 Epigenetik und Krebs	7
1.2.3 Epigenetische Veränderungen des Bronchialkarzinoms	8
1.3 Ziele und Fragestellung der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Proben.....	12
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterial	14
2.1.3 Puffer und Lösungen	15
2.1.4 Geräte	16
2.1.5 Kits	16
2.1.6 Software.....	17
2.1.7 Primer	18
2.2 Methoden	22
2.2.1 Auswertung der Ergebnisse einer Methylierungsuntersuchung mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip	22
2.2.2 DNA-Bisulfitkonversion.....	23
2.2.3 Bisulfit-Pyrosequenzierung (BSPS)	25
2.2.4 Statistische Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung	31
2.2.5 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Etablierung der Bisulfit-Pyrosequenzierungs-Assays	34
3.2 Methylierungswerte aus der Pyrosequenzierung der OP-Präparate korrelieren mit den Ergebnissen aus Infinium HumanMethylation450K BeadChip	36
3.3 DNA aus OP-Präparaten von Adenokarzinomen zeigt eine Hypermethylierung im Gen <i>TWIST1</i>	37
3.3.1 Vergleich von Sequenz 4.1 und Sequenz 4.2.....	41
3.3.2 Korrelation der Methylierungsdaten mit klinischen Parametern	42
3.4 OP-Präparate aus Lungenkarzinomen zeigen eine Hypermethylierung in verschiedenen Zielgenen ..	43

3.4.1	Korrelation mit klinischen Parametern	45
3.5	Diagnostik von Bronchialkarzinomen anhand des Methylierungsstatus von Paired Biopsies	46
3.5.1	Mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip ermittelte Methylierungswerte von gepaarten Biopsien aus Lungen- und Tumorgewebe sind durch Bisulfit-Pyrosequenzierung validierbar	46
3.5.2	Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe bzw. Adeno- und Plattenepithelkarzinom anhand der DNA-Methylierung	48
3.6	Anwendung der MS-PCR in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen	54
4	Diskussion	58
4.1	Methodische Aspekte	58
4.1.1	Vergleich der Messwerte von HM450K BC und BSPS zur quantitativen Methylierungsanalyse von DNA	58
4.1.2	Qualitativer Nachweis von DNA-Methylierung	60
4.1.3	Auswahl des Probenmaterials	61
4.2	Diskussion der Ergebnisse	62
4.2.1	<i>TWIST1</i>	63
4.2.2	CpGs zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe	65
4.2.3	Rolle von DNA-Methylierung als molekularer Biomarker in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen	66
4.3	Fazit	67
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	70
7	Anhang	78
	Ergänzende Tabellen	78
	Abbildungsverzeichnis	81
	Tabellenverzeichnis	82
	Ethikvotum	83
8	Danksagung	84
9	Publikationsliste	85
10	Eidesstattliche Erklärung	86

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AAH	Atypische adenomatöse Hyperplasie
Abb.	Abbildung
ADC	Adenokarzinom
ALK	Anaplastic lymphoma kinase (Anaplastische Lymphomkinase)
APC	Adenomatosis polyposis coli
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast Cancer 1 (Brustkrebs 1)
BSPS	Bisulfit-Pyrosequenzierung
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
ca.	circa
CDH13	Cadherin 13
CDH4/NuRD	CDH4/Nukleosomen Remodeling und Deacetylase-Komplex
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Cyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A)
CGI	CpG-Island
CNG	Nicht-CpG-Stellen
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CT	Computertomographie
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-Nukleosid-Triphosphat
ds	double strand (Doppelstrang)
EBUS	Endobronchialer Ultraschall
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FDR	False discovery rate
G	Guanin
HE	Hämatoxylin-Eosin

Abkürzungsverzeichnis

HM450K BC	HumanMethylation450K Bead Chip
HOPE	Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
Hox	Homeobox
IARC	International Agency for Research on Cancer
IQR	Interquartilsabstand
LDCT	Low-dose computed tomography (niedrig-dosierte Computertomographie)
MBP	Methylcytosin-binding protein (Methylcytosin-bindendes Protein)
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minuten
miRNA	micro-RNA
MLH1	MutL Homolog1
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MS-PCR	Methylierungsspezifische PCR
MW	Mittelwert
NCCN	National Comprehensive Cancer Network (Nationales interdisziplinäres Krebsnetzwerk, USA)
NIH	National Institutes of Health (Nationales Gesundheitsinstitut, USA)
NLST	National Lung Screening Trial (Nationale Lungenvorsorgeuntersuchungs-Studie)
NSCLC	Non-small cell lung cancer (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
NSCLC-NOS	Non-small cell lung cancer not otherwise specified (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom nicht-anderweitig klassifizierbar)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD-1	Programmed death 1 (Programmierter Tod 1)
PDL-1	Programmed death 1-Ligand (Programmierter Tod 1-Ligand)
PPi	Pyrophosphat
PTPRN2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type N2 (Protein-Tyrosin-Phosphatase, Rezeptortyp N2)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SALARNA1	Senescence associated long non-coding RNA (alterungsassozierte lange nicht-kodierende RNA)
SCLC	Small cell lung cancer (kleinzelliges Bronchialkarzinom)
SD	Standardabweichung
SNP	Single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SQCC	Squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom)
ss	single strand (Einzelstrang)

Abkürzungsverzeichnis

T	Thymin
Ta	Annealing-Temperatur
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TBNA	Transbronchiale Feinnadelaspiration
Tm	Schmelztemperatur
TSS	Transcription start site (Transkriptionsstartpunkt)
TTF-1	Thyroid transcription factor-1 (Schilddrüsentranskriptionsfaktor 1)
U	Uracil
VEGF	Vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

In dieser Arbeit werden die Vorgaben der Gen- und Proteinnomenklatur berücksichtigt. Diese gibt vor, dass das humane Gensymbol in kursiven Großbuchstaben gedruckt wird, während das humane Proteinsymbol in nicht-kursiven Großbuchstaben gedruckt wird. Dementsprechend beschreibt *ALK* das Gen der Anaplastischen Lymphomkinase, während ALK das Protein bezeichnet. Um Verwirrung hinsichtlich der kursiven Schrift zu vermeiden, wird darauf verzichtet, englischsprachige Begriffe durch kursive Schreibweise kenntlich zu machen.

1 Einleitung

1.1 Das Bronchialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Bronchialkarzinom zählt weltweit zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Im Jahr 2012 erkrankten etwa 1,8 Millionen Menschen an einem Bronchialkarzinom (Schätzung basierend auf GLOBOCAN, Daten aus 184 Ländern; Torre et al. 2015). In den meisten Fällen geht die Diagnose des Bronchialkarzinoms mit einer infausten Prognose einher. Auch in den einkommensstarken Ländern betragen die 5-Jahres-Überlebensraten nur etwa 15 % (Stewart und Wild 2014). Den Daten von GLOBOCAN zufolge verstarben im Jahr 2012 mehr Menschen an einem Bronchialkarzinom als an den drei nächsthäufigen Tumorentitäten – Kolon, Mamma und Prostata – zusammen (siehe Abbildung 1). Die Zahl der Neuerkrankungsfälle von kolorektalen, Mamma- und Prostatakarzinom insgesamt betrug verglichen mit der Inzidenz des Bronchialkarzinoms hingegen mehr als das Doppelte (Torre et al. 2015; Mehta et al. 2015). Ursächlich für die anhaltend hohe Mortalitätsrate des Bronchialkarzinoms sind in maßgebender Weise die Diagnosestellung in fortgeschrittenen Stadien und fehlende Früherkennungsmethoden. Bis zu 75 % der Patienten werden aufgrund des langen asymptomatischen Krankheitsverlaufs in einem Stadium diagnostiziert, das keinen kurativen Therapieansatz mehr erlaubt (Molina et al. 2006). Die Entwicklung geeigneter Früherkennungsmethoden, insbesondere für Menschen mit erhöhtem Erkrankungsrisiko, ist daher von zentraler Bedeutung, um die Prognose von Menschen mit Bronchialkarzinomen zu verbessern.

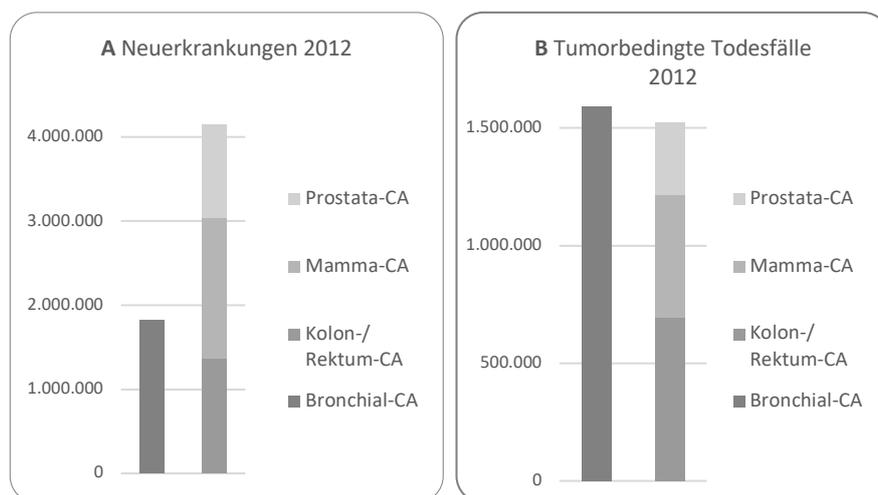


Abbildung 1: Gegenüberstellung von Inzidenz und Mortalität des Bronchialkarzinoms im Vergleich mit Kolon-/Rektum-, Mamma- und Prostatakarzinom aus dem Jahr 2012. Daten nach Schätzungen von GLOBOCAN 2012 beruhend auf Daten aus 184 Ländern

A Im Jahr 2012 erkrankten mehr als doppelt so viele Menschen an kolorektalen, Mamma- und Prostatakarzinomen wie an einem Bronchialkarzinom.

B Im Jahr 2012 war die Zahl der Todesfälle durch Bronchialkarzinome allein höher als die Zahl der Todesfälle durch Prostata-, Mamma- und kolorektale Karzinome zusammen. CA = Karzinom.

Abbildung modifiziert nach Mehta et al. 2015, epidemiologische Daten aus GLOBOCAN 2012 (Torre et al. 2015).

Ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an einem Bronchialkarzinom besteht insbesondere für die rauchende Bevölkerung. 85 – 90 % aller Bronchialkarzinome können auf eine Nikotinexposition zurückgeführt werden (Alberg und Samet 2003). Insgesamt tragen Raucher im Vergleich mit Nichtrauchern ein bis zu 20-fach erhöhtes Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken (Tong et al. 1996). Folglich ist das Bronchialkarzinom eine der am besten vermeidbaren Tumorerkrankungen. Die Primärprävention zur Reduktion des Nikotinkonsums spielt daher eine besondere Rolle in der langfristigen Senkung der Krankheitslast.

1.1.2 Klassifikation und therapeutische Konsequenzen

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Tumoreigenschaften werden in der Klassifikation des Bronchialkarzinoms klassischerweise kleinzellige (small cell lung cancer, SCLC) und nicht-kleinzellige (non-small cell lung cancer, NSCLC) Karzinome unterschieden. Etwa 85 % der Bronchialkarzinome entfallen auf NSCLC; der Anteil des SCLC ist epidemiologischen Studien zufolge abnehmend (Devesa et al. 2005). Die neue WHO-Klassifikation 2015 fasst SCLC zusammen mit Karzinoiden und anderen Subtypen in der Gruppe der neuroendokrinen Tumore der Lunge zusammen (Travis et al. 2015). Das NSCLC untergliedert sich histologisch in weitere Subgruppen (siehe Abbildung 2). Die drei häufigsten Entitäten stellen hierunter das Adenokarzinom (ADC, 30 – 35 %), das Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma, SQCC, 25 – 30 %) und das großzellige Karzinom (5 – 10 %) dar (Kropf-Sanchen und Merk 2013). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung des Methylierungszustands von DNA aus ADCs und SQCCs.

Die histopathologische Differenzierung der verschiedenen Tumorentitäten des NSCLC, insbesondere von ADCs und SQCCs, hat in den vergangenen Jahren entscheidende klinische Relevanz im Hinblick auf Therapieentscheidungen und weiterführende molekulare Untersuchungen erhalten (Travis et al. 2010; Travis et al. 2015). Beispielsweise bestehen für ADCs und SQCCs relevante Unterschiede zwischen den verwendeten chemotherapeutischen Regimen (Johnson et al. 2004; Scagliotti et al. 2008; Ciuleanu et al. 2009). Darüber hinaus zeigen sich bestimmte genetische Veränderungen mit therapeutischen Konsequenzen, z.B. Mutationen von *EGFR* (Epidermal growth factor receptor = epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) oder Rearrangements der *ALK* (Anaplastic lymphoma kinase = anaplastische Lymphomkinase) vorwiegend bei ADCs (Mok et al. 2009; Travis et al. 2015; Lindeman et al. 2013). Aufgrund dieses bemerkenswerten diagnostischen und therapeutischen Stellenwerts der Tumorklassifikation wird auch in der neuen WHO-Klassifikation des Bronchialkarzinoms 2015 ein Schwerpunkt auf die Unterscheidung der Subgruppen des NSCLC gelegt (Travis et al. 2015).

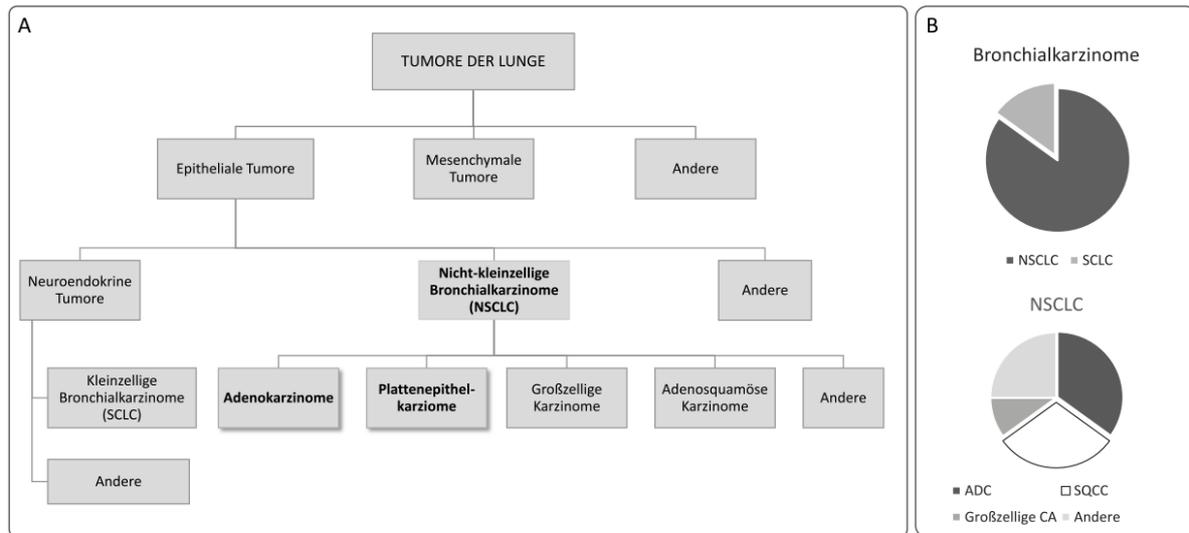


Abbildung 2: Klassifikation des Bronchialkarzinoms

A Vereinfachte Übersicht der Klassifikation des Bronchialkarzinoms nach der WHO-Klassifikation 2015 (Travis et al. 2015). Die in dieser Arbeit untersuchten Entitäten sind fett gedruckt.

B Vereinfachte Übersicht über die Epidemiologie der Tumorentitäten des Bronchialkarzinoms in Deutschland basierend auf Daten des Robert-Koch-Instituts 2013 (Kropf-Sanchen und Merk 2013). Etwa $\frac{2}{3}$ der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome entfallen auf Adeno- und Plattenepithelkarzinome.

NSCLC = Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (non-small cell lung cancer), SCLC = Kleinzelliges Bronchialkarzinom (small cell lung cancer), ADC = Adenokarzinom, SQCC = Plattenepithelkarzinom.

Des Weiteren wird in der neuen WHO-Klassifikation aus 2015 erstmalig eine Grundlage für die Diagnosestellung des Bronchialkarzinoms basierend auf Biopsien und Zytologien mit der Empfehlung des vermehrten Einsatzes immunhistochemischer Marker geschaffen (Travis et al. 2015). Nur etwa 10 – 15 % der Bronchialkarzinome werden reseziert, sodass nur ein geringer Anteil der Tumore einer vollständigen histologischen Untersuchung unterzogen werden kann (Travis et al. 2010; Loo et al. 2010). Bedingt durch die histologische Heterogenität von NSCLC gestaltet sich die weitere Klassifizierung basierend auf Biopsien und Zytologien jedoch oftmals schwierig, was hohe Fehlbestimmungsraten sowie eine Vielzahl nicht weiter klassifizierter NSCLCs, sogenannter NSCLC-NOS (not otherwise specified) zur Folge hat (Ou und Zell 2009). Durch die Verwendung immunhistochemischer Marker konnte die Diagnosestellung des Bronchialkarzinoms anhand von Biopsien und Zytologien bereits um einen wesentlichen Aspekt verbessert werden (Nicholson et al. 2010; Loo et al. 2010; Travis et al. 2010). Die Optimierung der Diagnostik basierend auf Biopsien und Zytologien ist jedoch nicht abgeschlossen. Von hoher Relevanz ist zum Beispiel, einerseits eine möglichst genaue Klassifikation des Tumors anhand des vorhandenen Materials vorzunehmen und andererseits möglichst viel Probenmaterial für weiterführende, molekulare Untersuchungen zu bewahren. Auch für die Differenzierung malignitätsverdächtiger Raumforderungen der Lunge und die Früherkennung von Bronchialkarzinomen ist die Entwicklung geeigneter histologischer und molekularer Untersuchungsmethoden von entscheidender Bedeutung. Einen möglichen molekularen Marker in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen stellt der aberrante Methylierungszustand der DNA dar, der Gegenstand dieser Arbeit ist.

1.1.3 Früherkennung

Eine frühzeitige Diagnose des Bronchialkarzinoms geht mit einer verbesserten Prognose einher. Grund hierfür sind erweiterte therapeutische Optionen, insbesondere hinsichtlich der operativen Resektion des Tumors, die den Patienten in frühen Stadien der Erkrankung zur Verfügung stehen (Patz et al. 2000; Flehinger et al. 1992). Schon seit langer Zeit wird daher an der Entwicklung von Früherkennungsmethoden für das Bronchialkarzinom geforscht. Dennoch konnte sich bislang keine der Maßnahmen in der klinischen Praxis etablieren.

Nur in einer einzigen, viel diskutierten Studie konnte bis dato eine Reduktion der Mortalität des Bronchialkarzinoms durch Früherkennungsmethoden nachgewiesen werden. Bei dieser Studie handelt es sich um die National Lung Screening Trial (NLST), die einen Überlebensvorteil für Patienten mit Bronchialkarzinom durch ein Screening mittels Low-dose Computertomographie (LDCT) belegen konnte (Aberle et al. 2011). Vordergründig in der Kritik des Verfahrens ist die hohe Rate falsch-positiver Ergebnisse von über 90 % (Nanavaty et al. 2014; Hasan et al. 2014; Tanoue et al. 2015). Sie führt dazu, dass Patienten sich teils unnötiger, invasiver Diagnostik, sowie aggressiven Therapiemaßnahmen unterziehen müssen (Nanavaty et al. 2014). Weitere Kritikpunkte sind die Strahlenbelastung durch wiederholte Bildgebungen und die damit verbundene karzinogene Wirkung, die psychische Belastung des Patienten durch unklare Befunde ebenso wie die Kosteneffektivität des Verfahrens (Nanavaty et al. 2014; Tanoue et al. 2015). Um das Nutzen-Risiko-Verhältnis des Screenings zu optimieren, ist die Weiterentwicklung angemessener Risikomodelle zur Auswahl einer geeigneten Screening-Population zwingend erforderlich (Nanavaty et al. 2014; Field et al. 2013; Hasan et al. 2014).

Einen vielversprechenden Ansatz für die Identifikation einer Screening-Population einerseits sowie für die Planung der weiteren Diagnostik nach positiver Bildgebung andererseits, verheißt die Erforschung molekularer Biomarker des Bronchialkarzinoms (Tanoue et al. 2015; Hasan et al. 2014). Ein potenzieller molekularer Biomarker ist die Methylierung von Cytosinen in Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG), mit deren Untersuchung sich diese Arbeit befasst.

1.1.4 Molekulare Biomarker

Die National Institutes of Health (NIH) definieren einen „biologischen Marker“, kurz „Biomarker“, als ein „Merkmal, das objektiv gemessen und beurteilt werden kann und als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf eine therapeutische Intervention dient“ (Biomarkers and surrogate endpoints 2001). Im Hinblick auf das Bronchialkarzinom werden verschiedene Arten von Biomarkern erforscht: (1) Risikobiomarker, die das Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, abschätzen können, (2) diagnostische Biomarker, die bestimmen können, ob eine maligne Erkrankung vorliegt und (3) prognostische Biomarker, die eine Beurteilung des Krankheitsverlaufs ermöglichen (Hassanein et al. 2012).

Im Hinblick auf die Diagnosesicherung und Früherkennungsmaßnahmen für das Bronchialkarzinom könnten diagnostische und Risikobiomarker von substanzieller Bedeutung sein. Primär könnten molekulare Marker helfen, eine Differenzierung zwischen benignen und malignen Noduli bei gleichzeitiger Reduktion der Invasivität des Diagnoseverfahrens zu ermöglichen (Hassanein et al. 2012; Hasan et al. 2014). Darüber hinaus könnten sie durch die Spezifizierung aktueller Modelle zur Definition der Risiko- und Screeningpopulation die Notwendigkeit der Durchführung von Screening-CTs reduzieren (Hassanein et al. 2012).

Durch die Weiterentwicklung molekularer Technologien mit hohem Durchsatz und ein verbessertes Verständnis genetischer und epigenetischer Mechanismen ist in den vergangenen Jahren eine Vielzahl potenzieller Biomarker des Bronchialkarzinoms entdeckt worden (Tanoue et al. 2015). Gegenstand aktueller Forschung sind Marker in Blut und Urin, in der Ausatemluft, in Sputum und Speichel sowie Epithelien aus Nasen- und Bronchialschleimhaut (Hasan et al. 2014; Hassanein et al. 2012). Ein großer Vorteil dieser Biomarker ist somit ihre Verfügbarkeit in leicht zugänglichen Materialien, die nicht- oder minimal-invasiv gewonnen werden können. Bei den untersuchten Biomarkern handelt es sich um Alterationen der Proteinstruktur und des Metabolismus sowie um genetische und epigenetische Veränderungen (Hasan et al. 2014; Hassanein et al. 2012).

Zu den untersuchten epigenetischen Mechanismen zählen die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen und die Expression von microRNA (miRNA), die Einfluss auf die Genexpression nehmen. Belinsky et al. konnten 2006 erstmalig in einer prospektiven Studie zeigen, dass eine Hypermethylierung von bestimmten Genen im Sputum mit einem erhöhten Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, einhergeht (Belinsky et al. 2006).

1.2 Epigenetik

1.2.1 Epigenetische Mechanismen

Der Begriff der Epigenetik wurde 1942 von Conrad Waddington geprägt, der darunter den Zweig der Biologie zusammenfasste, „der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, die den Phänotyp ins Leben bringen“ (Waddington 1942). Heute beschreibt der Begriff der Epigenetik alle dauerhaften und idealerweise vererbaren Veränderungen der Genexpression, die nicht mit einer Änderung der Basenabfolge der DNA einhergehen (Goldberg et al. 2007). Die zugrunde liegenden Mechanismen treten sowohl an der DNA selbst, als auch an DNA-assoziierten Proteinen auf. Sie umfassen unter anderem die Modifikation der DNA durch Methylierung, die Modifikation von Histonen und deren Anordnung in Nukleosomen sowie nicht-kodierende RNA-Elemente (Jones und Baylin 2007). In ihrer Gesamtheit stellen sie die molekulare Basis biologischer Schlüsselprozesse dar, indem sie den Transkriptionsstatus von Genen beeinflussen und auf diese Weise maßgeblich an der Differenzierung von Zellen beteiligt sind (Goldberg et al. 2007). Diese epigenetischen Modifikationen zur Regulation der Zellfunktion treten mit einer deutlich höheren Frequenz als Veränderungen der DNA-Sequenz selbst auf

(Jones und Baylin 2007). Darüber hinaus sind sie auch kurzfristig und durch äußere Umwelteinflüsse modulierbar (Ahuja und Issa 2000).

Ein Angriffspunkt zur Beeinflussung des Transkriptionsstatus ist die Verpackung der DNA in Form von Eukaryotischem und Heterochromatin. Als Euchromatin bezeichnet man die leicht zugängliche und transkriptionell aktive DNA. Heterochromatin beschreibt dagegen dicht gepackte DNA-Sequenzen, die transkriptionell inaktiv sind (Jones und Baylin 2002). Strukturelle Untereinheit des Chromatins sind die sogenannten Nukleosomen, die über die Verpackungsdichte der DNA bestimmen. Nukleosomen bestehen aus etwa 200 bp DNA und einem Oktamer aus Histonproteinen (Jones und Baylin 2002). Die kovalente Modifikation der Histone, z.B. durch Acetylierung oder Methylierung, kann die Dichte des Chromatins direkt beeinflussen und reguliert auf diese Weise, ob die DNA für Transkriptionsprozesse zugänglich ist. Eine Deacetylierung von Histonen bewirkt dabei generell eine Verdichtung des Chromatins zu Heterochromatin, was eine Transkriptionssuppression zur Folge hat (Struhl 1998; Jones und Baylin 2002). Darüber hinaus kann die Modifikation von Histonen die Bindung von Effektoren an die DNA beeinflussen (Fischle et al. 2005).

DNA-Methylierung

Der am besten untersuchte epigenetische Mechanismus ist die Methylierung von Cytosinen. Sie stellt auch die in dieser Arbeit analysierte epigenetische Modifikation dar. Die Methylierung von Cytosinen erfolgt postreplikativ durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) an der C5-Position des Pyrimidingrundgerüsts und tritt in Säugetieren in erster Linie in Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG) auf (Laird 2003).

CpGs sind im humanen Genom im Allgemeinen unterrepräsentiert, treten jedoch vermehrt in Clustern, den sogenannten CpG-Islands (CGI) auf. Diese CGIs haben durchschnittlich eine Länge von etwa 1000 Basenpaaren (bp) und sind vielfach mit Transkriptionsstartpunkten (TSS, transcription start sites) von Genen assoziiert (Deaton und Bird 2011; Weber und Schübeler 2007). Etwa 70 % aller Gene enthalten in ihren Promotorregionen CGIs (Saxonov et al. 2006). Während die Cytosine in CGIs vornehmlich hypomethyliert sind, liegen sie außerhalb von CGIs meist methyliert vor (Bird 2002). Frühe Studien fokussierten vor allem die Untersuchung von CpGs in Promotor-assoziierten CGIs. Inzwischen hat sich jedoch herausgestellt, dass insbesondere auch die CpGs außerhalb von CGIs und bekannten Promotorregionen gewebsspezifische Methylierungszustände zeigen und somit die Expression von Genen zu beeinflussen scheinen (Weber und Schübeler 2007; Jones und Baylin 2007; Maunakea et al. 2010; Illingworth et al. 2010).

Die Methylierung von Cytosinen hat vielfältige Effekte, die auch im Zusammenspiel mit anderen epigenetischen Regulationsmechanismen ihre Wirkung entfalten. Indem die Bindung einiger Transkriptionsfaktoren an die DNA verhindert wird, übt die Methylierung von Cytosinen einen direkten Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der DNA aus (Bird 2002). Des Weiteren führt der Methylierungszustand der DNA zu einer Veränderung der Chromatinstruktur. Methylierung initiiert beispielsweise die Rekrutierung sogenannter Methylcytosin-bindender Proteine (MBP), welche mit

Histondeacetylasen (HDAC) assoziiert sind. Diese induzieren eine Deacetylierung von Histonen und führen so einen transkriptionsinaktiven Chromatinstatus herbei (Nan et al. 1998; Jones et al. 1998).

Folglich kann eine Hypermethylierung in der Promotorregion von Genen mit einer verminderten Genexpression einhergehen (Futscher et al. 2002). Die Aussage, Hypermethylierung blockiere die Genexpression, stellt jedoch eine allzu starke Vereinfachung dar. Methylierung verändert die Interaktion von Proteinen und DNA, nimmt Einfluss auf die Chromatinstruktur und kann, u.a. auch in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation, zu einer vermehrten oder verminderten Transkription führen (Kass et al. 1997; Jones und Takai 2001).

DNA-Methylierung stellt eine relativ stabile Modifikation des Epigenoms dar, wohingegen die Modifikation von Histonen oftmals vielfältiger und komplexer ist und sich auch im Verlauf eines einzelnen Zellzyklus ändern kann (Mehta et al. 2015). Ein großer Teil des Methylierungszustands der DNA wird bereits während der embryonalen Entwicklung im Rahmen der Zelldifferenzierung festgelegt (Jaenisch und Bird 2003). Beispiele hierfür sind das genomische Imprinting oder die X-Inaktivierung bei Frauen. Nichtsdestoweniger kommt es im Laufe des Lebens zu einer Akkumulation epigenetischer Alterationen, mitunter der Veränderung von Methylierungsmustern, die sowohl im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses auftreten, als auch an der Entstehung von Krankheiten wie Krebs beteiligt sind (Jones und Baylin 2007).

1.2.2 Epigenetik und Krebs

Fehler in der Aufrechterhaltung von epigenetischen Mechanismen können zu einer Fehlregulation der Genexpression führen. Hieraus kann eine unangemessene Aktivierung oder Inhibierung von Signalkaskaden resultieren, die Krankheitszustände wie Krebs in ihrer Entstehung begünstigt (Sharma et al. 2010). Zahlreiche Studien belegen, dass Krebszellen neben genetischen Alterationen umfassende Modulationen epigenetischer Regulationsmechanismen zeigen (Jones und Baylin 2002, 2007).

Im Hinblick auf die DNA-Methylierung lassen sich zwei Arten der Veränderung unterscheiden: erstens zeigen Tumorzellen eine globale Hypomethylierung, zweitens lässt sich eine regionale Hypermethylierung insbesondere in CpG-Islands von Promotorregionen nachweisen (Sharma et al. 2010). Bereits frühe, benigne Tumorstadien sind durch eine globale Hypomethylierung gekennzeichnet. Sie tritt in repetitiven Sequenzen, codierenden DNA-Regionen und CpG-armen Promotoren auf (Feinberg et al. 2006). Infolgedessen entsteht primär eine genomische Instabilität durch die Förderung von chromosomalem Rearrangement oder die Translokation von Retrotransposons (Feinberg et al. 2006; Sharma et al. 2010; Mehta et al. 2015).

Hypermethylierung hingegen kann durch die Modifikation von Promotorregionen zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (Baylin und Ohm 2006). Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung in Krebszellen ist in zahlreichen Studien belegt worden (Baylin und Ohm 2006; Jones und Baylin 2002, 2007). *MLH1* (mutL homolog1), *BRCA1* (breast cancer 1) oder *p16^{ink4A}*, auch bekannt als *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A = Cyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A) sind Beispiele für solche Tumorsuppressorgene, die an Prozessen wie DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle,

Apoptose und Angiogenese beteiligt sind (Sharma et al. 2010). Es ist bekannt, dass Mutationen von Tumorsuppressorgenen in der Keimbahn ursächlich in der Entstehung von familiären Tumoren sind (Baylin und Ohm 2006). Die epigenetische Stilllegung dieser Gene kann dabei den sogenannten second hit nach der Two-Hit-Hypothese von Knudson (Knudson 1971) darstellen und ist inzwischen ein anerkannter Mediator in der Tumorgenese (Jones und Baylin 2002; Brait und Sidransky 2011). Einige Studien wiesen darüber hinaus eine Zunahme methylierter DNA-Regionen im Rahmen des Krankheitsprogresses nach (Feinberg et al. 2006; Jones und Baylin 2007). Dies führte zur Generierung des Krebs-Stammzell-Modells. Dieses Modell besagt, dass eine initiale Alteration der epigenetischen Kontrollmechanismen in den frühesten Stadien einer Neoplasie eine Akkumulation weiterer epigenetischer Anomalitäten hervorruft. Diese wiederum prädisponieren die Krebszellen zu weiteren epigenetischen und genetischen Veränderungen und initiieren infolgedessen eine Tumorprogression (Jones und Baylin 2007; Sharma et al. 2010). Epigenetische Veränderungen zählen somit zu den „hallmarks of cancer initiation and progression“ (Balgkouranidou et al. 2013).

Die Verteilung hyper- bzw. hypomethylierter DNA-Regionen im Genom ist gleichwohl nicht rein zufällig, sondern zeigt für unterschiedliche Tumorentitäten auch differenzielle Methylierungsmuster (Costello et al. 2000; Hoque et al. 2008; Esteller et al. 2001). Ziel aktueller Forschung ist es daher, Methylierungsprofile der verschiedenen Tumorentitäten zu erstellen, um diese zum Beispiel in der Diagnostik von Tumoren einsetzen zu können.

1.2.3 Epigenetische Veränderungen des Bronchialkarzinoms

Auch für das Bronchialkarzinom sind zahlreiche epigenetische Veränderungen bekannt. Bereits 1999 veröffentlichten Ahrendt et al. einen Artikel, in dem sie molekulare Marker zur Identifikation von Tumorzellen aus einer Bronchoalveolären Lavage (BAL) untersuchten, hierunter auch einen epigenetischen Marker: den Methylierungsstatus im CpG-Island des p16-Gens (Ahrendt et al. 1999). Die Hypermethylierung von *p16ink4A*, auch bekannt als *CDKN2A*, in Bronchialkarzinomen wurde seither vielfach in verschiedenen Probenmaterialien bestätigt (Esteller et al. 2001; Tsou et al. 2007; Selamat et al. 2011). Gleichzeitig ist eine Hypermethylierung in weiteren Promotorregionen von Genen wie *PTPRN2* (protein tyrosine phosphatase, receptor type N2 = Protein-Tyrosin-Phosphatase, Rezeptortyp N2), *CDH13* (Cadherin 13), *MGMT* (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) oder *APC* (Adenomatosis polyposis coli) entdeckt worden (Yanagawa et al. 2003; Pulling et al. 2003; Lin et al. 2009; Kim et al. 2005; Selamat et al. 2011).

Einige Promotorregionen zeigen eine Hypermethylierung bereits in sehr frühen Tumorstadien oder gar in präkanzerösen Läsionen, ein Beispiel hierfür ist auch *p16ink4A* (Spira et al. 2007; Belinsky et al. 1998; Stewart und Wild 2014). Dabei scheinen erste Veränderungen des Methylierungsmusters in direktem Zusammenhang mit einer Nikotinexposition zu stehen und sind bereits in den Atemwegsepithelien von Rauchern nachweisbar (Spira et al. 2007; Spira et al. 2004). Verschiedene Studien belegen darüber hinaus, dass die einzelnen Tumorentitäten des Bronchialkarzinoms sich hinsichtlich ihrer Methylierungsmuster unterscheiden, insbesondere im Vergleich von SQCC und ADC (Mehta et al. 2015; Bhattacharjee et al. 2001;

Fujii et al. 2002; Takeuchi et al. 2006). Beispiele sind die Gene *TWIST1* oder *HOXA1*, für die vor allem in ADCs eine Hypermethylierung vorbeschrieben ist (Tsou et al. 2007). Die Untersuchung des Methylierungszustands von *TWIST1* war auch wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Hinsichtlich der Funktion beschreiben neuere Studien *TWIST1* als einen der primären Transkriptionsfaktoren, der an der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt ist (Fu et al. 2011). EMT ist charakterisiert durch einen Verlust von E-Cadherin (*CDH1*), einem Transmembranprotein, das an der Zelladhäsion beteiligt ist (Le Bras et al. 2012). Hierdurch kommt es zu einem Verlust der interzellulären Adhäsion und einer erhöhten Zellmobilität, wodurch Tumorprogression und Metastasierung begünstigt werden (Thiery et al. 2009). *TWIST* bindet hierbei an die Promotorregion von *CDH1* und rekrutiert den CDH4/Nukleosomen Remodeling und Deacetylase-Komplex (CDH4/NuRD Komplex) (Fu et al. 2011). Infolgedessen kommt es durch Nukleosomenremodeling und Histondeacetylierung zu einer Transkriptionssuppression von *CDH1* (Mehta et al. 2015). Eine Studie von Gort et al. konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen einer Hypermethylierung in der Promotorregion von *TWIST1* und der Expression von *TWIST1* nachweisen (Gort et al. 2008).

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit auch CpGs im Bereich der Gene *MEIS1*, *PAX9* und *ALX3* untersucht. *MEIS1* zählt zu den Homeobox (Hox)-Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und eine kritische Rolle in der Entwicklung spielen (Andrey und Duboule 2014). Eine Hypermethylierung von *MEIS1* wurde in bronchialen SQCCs beschrieben (Rauch et al. 2012). Ebenso ist für *PAX9* und *ALX3* eine veränderte Methylierung in Bronchialkarzinomen dokumentiert worden (Rauch et al. 2012; Wielscher et al. 2015). Eine Hypermethylierung von *PAX9* scheint darüber hinaus maligne von fibrotischen und chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen abzugrenzen (Wielscher et al. 2015). Expressionsstudien wiesen des Weiteren eine Überexpression des Transkriptionsfaktors *PAX9* in Tumorzellen aus NSCLC nach (Hsu et al. 2009). Die Untersuchung des Methylierungsstatus von *PAX9* ist daher von besonderem Interesse.

Zur Analyse der DNA-Methylierung von Bronchialkarzinomen eignen sich verschiedene Probenmaterialien. Zu den häufig untersuchten Medien zählen Proben aus BAL, Sputum, Atemwegsepithelien oder zirkulierende DNA im Plasma von Patienten mit Bronchialkarzinomen (Hassanein et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Proben aus chirurgisch reseziertem Tumormaterial, als auch bronchoskopisch gewonnene Biopsien verwendet.

Ziel aktueller Forschung ist es, mithilfe veränderter Methylierungsmuster die Diagnose von Bronchialkarzinomen zu ermöglichen. Die histologische Differenzierung der verschiedenen Tumorentitäten aus geringen Mengen minimal-invasiv gewonnenen Tumormaterials stellt bislang eine Herausforderung auch für erfahrene Pathologen dar (siehe Kapitel 1.1.2). Zur Komplettierung der histologischen Untersuchung könnten die Methylierungsanalysen einen gewinnbringenden Faktor darstellen. Darüber hinaus könnten Veränderungen des Methylierungsstatus aufgrund ihres frühzeitigen Auftretens auch in der Früherkennung bzw. dem Screening von Bronchialkarzinomen hilfreich sein (Hasan et al. 2014; Hassanein et al. 2012). In den vergangenen Jahren ist eine beachtliche Menge potenzieller epigenetischer Marker des

Bronchialkarzinoms untersucht worden. Eine große Herausforderung der aktuellen Forschung besteht insbesondere darin, die epigenetischen Veränderungen mit der höchsten diagnostischen Spezifität und Sensitivität in der Fülle der möglichen Marker zu identifizieren und sie in die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse einzuordnen (Laird 2003).

In der vorliegenden Studie wurden sowohl Methylierungsanalysen von potenziellen DNA-Regionen zur Identifikation von malignem Tumorgewebe im Allgemeinen, als auch zur Differenzierung der beiden häufigsten Tumorentitäten, dem Adeno- und dem Plattenepithelkarzinom, durchgeführt.

1.3 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Menschen, die an einem Bronchialkarzinom erkranken, sehen sich zum Zeitpunkt der Diagnose mit einer sehr ungünstigen Prognose konfrontiert (Torre et al. 2015). Ein wichtiger Faktor ist in dieser Hinsicht die Diagnosestellung in einem weit fortgeschrittenen Stadium mit begrenzten therapeutischen Möglichkeiten (Molina et al. 2006). Neue Screeningverfahren mittels bildgebender Diagnostik können zwar die Prognose verbessern (Aberle et al. 2011), führen jedoch in einer Vielzahl der Fälle zu falsch-positiven Befunden. Gegenstand aktueller Forschung ist die Entwicklung molekularer Biomarker, die die Diagnose des Bronchialkarzinoms um einen entscheidenden Aspekt erweitern könnten (Tanoue et al. 2015; Hasan et al. 2014). Epigenetische Veränderungen stellen aufgrund ihres frühen Auftretens in der Karzinogenese potenzielle Biomarker in der Diagnostik und Früherkennung des Bronchialkarzinoms dar (Hassanein et al. 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des DNA-Methylierungsstatus in unterschiedlichen Lungenkarzinomentitäten. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Differenzierung von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen. Sie ist insbesondere aufgrund unterschiedlicher therapeutischer Optionen von entscheidender klinischer Relevanz (Travis et al. 2015).

Vorgängerstudien mittels HumanMethylation450K BeadChip (HM450K BC) aus dem Institut für Humangenetik, UKSH Campus Kiel konnten verschiedene CpG-Dinukleotide (CpG) identifizieren, die differenzielle Methylierungsmuster sowohl für Bronchialkarzinome insgesamt, als auch speziell für Adeno- und Plattenepithelkarzinome zeigen. Die Ergebnisse der Untersuchung mittels HM450K BC sollten in der vorliegenden Arbeit durch eine weitere Methylierungsanalyse mittels Bisulfitpyrosequenzierung validiert werden. Im weiteren Verlauf wurde für einzelne CpG-Loci darüber hinaus eine methylierungsspezifische PCR etabliert.

Untersucht wurde der Methylierungsgrad von DNA aus Tumorresektaten von Bronchialkarzinomen und aus endoskopisch gewonnenem Tumormaterial.

Zusammenfassend wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Korrelieren die gemessenen Methylierungswerte aus der Bisulfit-Pyrosequenzierung mit den Ergebnissen aus den Vorgängerstudien mittels HumanMethylation450K BeadChip?
- Lassen sich mit der Bisulfit-Pyrosequenzierung veränderte Methylierungszustände in DNA aus Tumorsektaten von Bronchialkarzinomen nachweisen?
- Gibt es Unterschiede im DNA-Methylierungsgrad in Abhängigkeit von der Entität des Bronchialkarzinoms?
- Lassen sich die veränderten Methylierungszustände auch in DNA aus endoskopisch gewonnenem Tumormaterial nachweisen?
- Ist eine veränderte Methylierung der untersuchten CpGs auch mittels methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR) nachweisbar?

2 Material und Methoden

In diesem Teil der Arbeit werden die verwendeten Materialien aufgelistet sowie die angewandten Methoden beschrieben und erläutert. Molekulargenetische Untersuchungen im Institut für Humangenetik, USKH Campus Kiel werden nach der Bestimmung der DIN EN ISO 15189:2007 durchgeführt. Die Standard-Arbeitsanweisungen (SAA) der entsprechenden Protokolle wurden für diese Arbeit übernommen.

2.1 Material

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien aufgeführt. Es sei darauf hingewiesen, dass geschützte Namen und registrierte Bezeichnungen in dieser Arbeit nicht speziell gekennzeichnet werden.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 18.12.2012 positiv votiert (Aktenzeichen 12-220, siehe Ethikvotum im Anhang).

2.1.1 Proben

Im Rahmen dieser Studie wurden DNA-Proben aus humanem Lungengewebe untersucht, das auf verschiedene Weise gewonnen wurde. Primär wurde mit DNA aus OP-Resektaten von Patienten mit Bronchialkarzinomen gearbeitet. Die Materialgewinnung erfolgte in einem chirurgischen Eingriff mit nachfolgender histopathologischer Beurteilung und TNM-Klassifikation. Die extrahierten DNA-Proben wurden über das Forschungszentrum Borstel bezogen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit der Proben erfolgte mittels Nano-Drop Spektrophotometer. In die Methylierungsanalyse wurde jeweils Material aus dem Tumorgewebe sowie dem tumorfreien Lungengewebe desselben Patienten einbezogen. Insgesamt wurde DNA-Material von 20 Patienten untersucht. Die Proben sind in Tabelle 1 aufgeführt. Bei Beginn der Arbeit lagen für alle Proben Methylierungswerte aus einer Messung mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip (HM450K BC) vor (siehe Kapitel 2.2.1).

In einem zweiten Ansatz erfolgte die Bestimmung des Methylierungsgrades von DNA aus minimalinvasiv gewonnenem Gewebe aus malignitätsverdächtigen Raumforderungen der Lunge von 14 Patienten (siehe Tabelle 2). Als Kontrolle diente DNA aus dem tumorfreien Lungengewebe derselben Patienten. Diese DNA-Proben werden in den nachfolgenden Kapiteln als „Paired Biopsies“ bezeichnet. Das Untersuchungsmaterial wurde durch eine transbronchiale Feinnadelaspiration mit anschließender Kryokonservierung des Materials gewonnen. Die Proben wurden anschließend mittels HOPE (Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect) fixiert. Die Aufarbeitung der Proben und DNA-Extraktion führten Mitarbeiter des Forschungszentrums Borstel durch. DNA-Gehalt und Reinheit der Proben wurden ebenfalls mittels Nano-Drop Spektrophotometer ermittelt. Für den Großteil der Proben lagen Methylierungsdaten aus einer Untersuchung mittels HM450K BC vor. Für einige Proben stand darüber hinaus bereits vor Durchführung der Analysen eine kurze histopathologische Beurteilung zur Verfügung. Ein Teil der Proben wurde als nicht-maligne beurteilt, bei anderen Proben gingen die Pathologen mit hoher

Wahrscheinlichkeit vom Vorliegen eines Karzinoms aus. Nach Durchführung der Methylierungsanalyse und ihrer Auswertung wurde für einen Großteil der untersuchten Gewebeproben ebenfalls eine endgültige klinische Diagnose gestellt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 1: DNA-Proben aus OP-Präparaten von Patienten mit Bronchialkarzinom

Es wurde jeweils eine DNA-Probe aus dem Tumorgewebe und dem tumorfreien Lungengewebe desselben Patienten untersucht.

Probe	Gewebe	Tumor-entität	DNA-c [ng/μl]	260/280	TNM-Klassifikation (Pathologie)	Sex	Alter bei Entnahme
T1	Tumor	SQCC	482,2	1,86	pT2b, pN2, G3, L1, V0, R0	m	74
	Lunge		346,3	1,78			
T2	Tumor	SQCC	376,1	1,85	pT2a, pN0, L0, V0, R0, G3	w	66
	Lunge		153,8	1,84			
T3	Tumor	SQCC	477,7	1,9	pT1b, pN0, pMX, G3, R0	w	84
	Lunge		291,1	1,85			
T4	Tumor	SQCC	372,1	1,91	pT2, pN1, pMX, G2, R0	w	68
	Lunge		226,0	1,84			
T5	Tumor	SQCC	598,6	1,86	pT1b, pN0, pMX, G3, L0, V0, R0	m	69
	Lunge		112,5	1,8			
T6	Tumor	SQCC	166,5	1,82	pT3, pN1, G3, R1, L1, V0	m	79
	Lunge		193,0	1,75			
T7	Tumor	SQCC	351,0	1,88	pT1b, pN0, pMX, G3, R0	w	61
	Lunge		160,0	1,79			
T8	Tumor	SQCC	69,8	1,88	pT2a, pN0, G2, R0, L0, V0	m	74
	Lunge		182,1	1,83			
T9	Tumor	SQCC	303,1	1,79	pT4, pN1, pMX, G3, R0	m	55
	Lunge		223,3	1,83			
T10	Tumor	ADC	135,0	1,88	pT2, pN2, M1a, G3, R0, L1, V0	w	58
	Lunge		143,7	1,85			
T11	Tumor	ADC	552,9	1,89	pT3, pN1, G3, L1, V0, R1	w	61
	Lunge		344,3	1,86			
T12	Tumor	ADC	340,1	1,89	pT2, pN0, pMX, G2-3, R0	m	66
	Lunge		284,6	1,75			
T13	Tumor	ADC	472,2	1,88	pT4, pN3, G3, R1	w	54
	Lunge		303,3	1,85			
T14	Tumor	ADC	355,4	1,86	pT2, pN0, pMX, G2-3, R0	w	57
	Lunge		221,1	1,83			
T15	Tumor	ADC	829,4	1,86	pT2, pN2, pMX, G3, L1, V0, R0	m	65
	Lunge		175,7	1,8			
T16	Tumor	ADC	393,8	1,89	pT1b, pN1, pMX, G2-3, L1, V0, R1	m	73
	Lunge		108,9	1,77			
T17	Tumor	ADC	111,3	1,88	pT3, pN3, G3, R0, L1, V0	m	69
	Lunge		96,5	1,84			
T18	Tumor	SQCC	333,2	1,92	pT2a, pN0, G2, R0, L0, V0	m	75
	Lunge		180,6	1,83			
T19	Tumor	ADC	274,7	1,69	pT3, pN0, G3, R0, L0, V0	w	66
	Lunge		133,9	1,84			
T20	Tumor	ADC	402,8	1,89	pT3, pN0, G3	w	53
	Lunge		303,3	1,85			

DNA-Konzentration und 260/280 (Maß für die Reinheit der Probe, idealerweise zwischen 1,8 und 2,0) wurden mittels Nano-Drop Spektrophotometer bestimmt. Die TNM-Klassifikation entstammt dem pathologischen Bericht. SQCC = Plattenepithelkarzinom, ADC = Adenokarzinom, DNA-c = DNA-Konzentration, Sex = Geschlecht, m = männlich, w = weiblich.

Tabelle 2: DNA-Proben aus Paired Biopsies von Patienten mit Raumforderung(en) in der Lunge

Es wurde jeweils eine DNA-Probe aus dem Gewebe der Raumforderung und dem tumorfreien Lungengewebe untersucht.

Probe	Material	DNA-c [ng/ μ l]	260/280	Morphologie basierend auf 1 Gewebeprobe	Endgültige klinische Diagnose
1	Tumor	114,4	1,86	Wahrscheinlich Tumor (Diagnose unsicher)	ADC
	Lunge	66,4	1,86	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	
2	Tumor	87,3	2,01	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	SCLC
	Lunge	198,4	1,95	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	
3	Tumor	170,0	1,93	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	NSCLC
	Lunge	88,2	2,00	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	
4	Tumor	112,9	1,99	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	Andere, unbekannt
	Lunge	92,1	2,02	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	
5	Tumor	123,3	1,89	Malignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	SQCC
	Lunge	59,2	1,92	Benignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	
6	Tumor	118,2	1,89	Malignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	SCLC
	Lunge	92,9	1,88	Benignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	
7	Tumor	99,1	1,91	Malignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	SCLC
	Lunge	55,0	1,91	Benignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	
8	Tumor	79,9	1,88	Malignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	ADC
	Lunge	107,1	1,89	Benignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	
9	Tumor	266,1	1,89	Malignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	ADC
	Lunge	144	1,87	Benignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	
10	Tumor	284,5	1,89	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	SQCC
	Lunge	108,7	1,90	Wahrscheinlich benigne (Diagnose unsicher)	
11	Tumor	180,7	1,89	Malignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	SQCC
	Lunge	112,9	1,91	Benignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	
12	Tumor	314,0	1,92	Malignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	SQCC
	Lunge	101,1	2,01	Benignes Lungengewebe (Diagnose sicher)	
13	Tumor	330,0	1,91	90% Karzinom	unbekannt
	Lunge	272,1	1,90	Benignes Lungengewebe	
14	Tumor	340,9	1,89	80% Karzinom	unbekannt
	Lunge	123,2	1,87	Benignes Lungengewebe	

DNA-Konzentration und 260/280 (Maß für die Reinheit der Probe, idealerweise zwischen 1,8 und 2,0) wurden mittels Nano-Drop Spektrophotometer bestimmt. Für einige Proben lag eine kurze histopathologische Beurteilung vor (Morphologie). DNA-c = DNA-Konzentration.

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterial

In Tabelle 3 sind die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller aufgeführt.

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
25 bp DNA Step Ladder	Promega, Madison, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, DE
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, DE
Aqua dest. Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden, DE

Bezeichnung	Hersteller
Deckelkette 8er, flach	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Ethanol	Avantor, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Filter Tips 100 µl (premium surface)	Nerbe plus, Winsen/ Luhe, DE
Filter Tips Biosphere 0,1- 20 µl (low retention)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Filter Tips Biosphere 100- 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Klebefolie PP für MTP	neoLab Migge, Heidelberg, DE
Methylierte DNA	Millipore, Darmstadt, DE
MultiPLY µStrip 0,2 ml Kette 8er	Sarstedt, Nümbrecht, DE
NaOH	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
PCR Plate 96	Eppendorf, Hamburg, DE
PSQ Plate 96	Biotage, Uppsala, Schweden
SafeSeal Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Streptavidin Sepharose Beads	GE Healthcare BioSciences, Uppsala, Schweden
TBE Buffer (10x)	Invitrogen, Paisley, UK
TriDye 100bp DNA Ladder	New England BioLabs Inc., Frankfurt am Main, DE
PyroMark Q96 Cartridge	Qiagen, Hilden, DE
PyroMark Q96 Vacuum Prep Trough	Qiagen, Hilden, DE
Trihydroxymethylaminomethane	Merck, Darmstadt, DE

2.1.3 Puffer und Lösungen

Agarosegele (2%):

Zur Herstellung der Agarosegele wurden je 2 g Agarose in 100 ml 1x TBE gelöst und in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt. Nach Abkühlung unter fließendem Wasser auf Handwärme wurden 5 µl Ethidiumbromid (c= 0,5 µg/ml) je 100 ml hinzugegeben.

Waschpuffer für die Bisulfit-Pyrosequenzierung:

Für den Waschpuffer wurden 6,5 g Trihydroxymethylaminomethan mit ddH₂O auf 5 l aufgefüllt.

0,2 M Natriumhydroxid-Lösung für die Bisulfit-Pyrosequenzierung:

In 1 l ddH₂O wurden 80 g NaOH gelöst (entsprechend einer 2M Lösung) und für die Pyrosequenzierung im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

2.1.4 Geräte

Tabelle 4 führt die verwendeten Geräte, die Modellnummer sowie die Hersteller auf.

Tabelle 4: Verwendete Gerätschaften mit Modellnummern und deren Hersteller

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Digital Graphic Printer	UP-D895	Sony, Tokyo, Japan
DNA/ RNA-UV-Cleaner	UVC/T-M-AR	GKisker, Steinfurt, DE
Feinwaage	MC1 Laboratory LC 620P	Sartorius, Göttingen, DE
Geldokumentation	White Light Top,	Biometra, Göttingen, DE
	Transilluminator Ti5	Biometra, Göttingen, DE
Gelelektrophorese	Modell 41-2026	peQLab Biotechnologie, Erlangen, DE
Mikrowelle	M500	Phillips, Hamburg, DE
Pipetten	Reference 10/100/1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	Research 100 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Pyrosequenzierer	PyroMark Q96 ID	Qiagen, Hilden, DE
Schüttelplatte	IKA-Vibrax-VX8	IKA Labortechnik, Staufen, DE
	IKA MS3 basic	IKA Labortechnik, Staufen, DE
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen, DE
	Spectrometer	
Thermocycler	T3000	Biometra, Göttingen, DE
Vacuum Workstation	PyroMark Vacuum Prep Tool	Biotage, Uppsala, Schweden
Vortexer	Vortex Genie 2	Bender & Hobei AG, Zürich, Schweiz
	Reax 2000	Heidolph, Schwabach, DE
Zentrifugen	neoLab Zentrifuge	neoLab Migge, Heidelberg, DE
	Heraeus Multifuge X1R	ThermoFisher Scientific, Osterode, DE
	Mikro200	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE

2.1.5 Kits

In Tabelle 5 sind die verwendeten Kits mit ihren enthaltenen Komponenten und ihre Hersteller aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Kits mit deren Komponenten und Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, DE
- Bisulfite Solution	
- DNA Protect Buffer	
- MinElute DNA Spin Columns	
- Buffer BL	
- Buffer BW (Waschpuffer)	
- Buffer BD (Desulfonierungspuffer)	
- Carrier RNA	

Bezeichnung	Hersteller
PyroMark Gold Q96	Qiagen, Hilden, DE
<ul style="list-style-type: none"> - Enzyme Mixture - Substrate Mixture - dATPαS, dGTP, dCTP, dTTP 	
PyroMark PCR Kit	Qiagen, Hilden, DE
<ul style="list-style-type: none"> - Mastermix (HotStar Taq DNA-Polymerase, Reaktionspuffer mit 3 mM MgCl₂ und dNTPs) - 10x CoralLoad Concentrate - 25mM MgCl₂ 	

2.1.6 Software

Tabelle 6 listet die verwendete Software mit ihren Vertreibern bzw. deren Internetdomäne auf.

Tabelle 6: Software, Versionen und deren Vertreter bzw. Internetdomäne

Bezeichnung	Vertreiber, Internetdomäne
BioDoc Analyze 2.1	Biometra, Göttingen, DE
BiQ Analyzer Diagrams	http://biq-analyzer.bioinf.mpg.de/tools/MethylationDiagrams/index.php
BiSearch: Primer Design and Search Tool	http://bisearch.enzim.hu/?m=genompsearch
Bisulfite Primer Seeker 12S	http://www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker; Zymo Research Corp, Irvine, US
Citavi 5.6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH
Excel 2013	Microsoft, Redmond, US
GenomeStudio V2011.1 Methylation Module v1.9	Illumina, San Diego, US
IBM SPSS Statistics 21	IBM, Armonk, US
Inkscape	Free Software Foundation, Inc., Boston, US
Oligo Calc	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
Paint Version 1607	Microsoft Corporation, Redmond, US
Power Point 2013	Microsoft Corporation, Redmond, US
PyroMark Assay Design 2.0	Qiagen, Hilden, DE
PyroMark CpG Software 1.0.11	Qiagen, Hilden, DE
PyroMark ID 1.0	Qiagen, Hilden, DE
Qlucore Omics Explorer 2.3	Qlucore, Lund, SE
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
RStudio	Boston, Massachusetts, US
USC Genome Browser (hg19)	http://genome.ucsc.edu/
Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond, US

2.1.7 Primer

Die verwendeten Primer/ Oligonukleotide wurden über die Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen. Biotinylierte Primer wurden in HPLC-gereinigter Qualität verwendet, alle übrigen Primer wurden in Kartuschen-gereinigter Qualität eingesetzt. Die CpGs werden gemäß der Target ID des Infinium HumanMethylation450K BeadChip bezeichnet.

Die Berechnung der Schmelztemperaturen der Primer erfolgte mithilfe des Online Tools Oligo Calc. Es wurde jeweils die Salz-adjustierte Schmelztemperatur angenommen, die für Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 20 bp sowie für modifizierte Oligonukleotide entwickelt wurde (Kibbe 2007).

1. Bisulfit-Pyrosequenzierung (BSPS)

In Tabelle 7 werden die Primersequenzen für die Bisulfit-Pyrosequenzierung mit ihren Bezeichnungen, Schmelztemperaturen und Modifikationen aufgeführt. Ziel war es, mithilfe dieser Primer die Ergebnisse der Methylierungsanalyse mittels HM450K BC zu validieren und die Differenzierung von Adeno- und SQCC bzw. Tumor- und Lungengewebe zu ermöglichen.

Für die Primerpaare 1-7 erfolgte das Assaydesign sowie dessen Optimierung durch Dr. rer. nat. Swetlana Scheufele aus dem Institut für Humangenetik, USKH Campus Kiel. Die Primer wurden zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe in NSCLC entwickelt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Primerpaare 8-14 sollten der Differenzierung von ADCs und SQCC dienen. Das Assaydesign erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Andrea Haake aus dem Institut für Humangenetik, UKSH Campus Kiel. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen war Bestandteil dieser Arbeit.

Tabelle 7: Primersequenzen und ihre Bezeichnung für die Bisulfit-Pyrosequenzierung (BSPS) sowie deren Schmelztemperaturen und Modifikationen

	CpG*	Primer Name	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Modifikation
1	cg04415798	PAX9 Fw	TTGAGTTTAGAGTGAGTAGTGAATTAG	59	5'-Biotin
		PAX9 Rv	CCAACAAAAAAAAATAACTAAAACCTTC	60	
		PAX9 Seq	AAAAAAAAATAACTAAAACCTTC	43	
2	cg23322933	cg233 Fw	TGGGTTTGGGAGTTGGTT	61	5'-Biotin
		cg233 Rv	CAACTCCAAAAACAAAAACCTAATAAC	59	
		cg233 Seq	CTAAACTTCTAATACAACCTCAACT	43	
3	cg18103859	cg18 Fw	TGTTTTAGTTTAGAGAATAGGTTTAAGA	57	5'-Biotin
		cg18 Rv	ACTAAAACCAAACCTCCTAAATTCTCA	55	
		cg18 Seq	AAACCAAAAAATTTAACTCC	44	
4	cg05877497	MEIS1 Fw	AGGTTGGTTGTAATGTTTTTGT	58	5'-Biotin
		MEIS1 Rv	CAAATTTAAACACACATACTAACAAACC	58	
		MEIS1 Seq	GGGATAAGATTTAGGGGAAATA	44	

CpG*	Primer Name	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Modifikation	
5	cg02391713	cg023 Fw	TATTTGTTTTATGTAGTAGGAATGTTAAGGAAAG	58	5'-Biotin
		cg023 Rv	ATTTTCCAAATCTCTCTACCCCTAAC	58	
		cg023 Seq	GGAAGGAATTAGGATAGT	44	
6	cg22620090	cg226 Fw	GGAATGTTAAGAAAGTTATAGTTAAGTGGTTTAT	59	5'-Biotin
		cg226 Rv	AAATCTCTCTACCCCTAAC	59	
		cg226 Seq	AGGAAGGAATTAGGATAGT	45	
7	cg06809252	ALX3 Fw	TATGGTAGAGTAGATAAGGTGGGTG	58	5'-Biotin
		ALX3 Rv	CCTAAAAACAAAAACCTAACAACTAATC	58	
		ALX3 Seq	AGATAAGGTGGGTGTA	44	
8	cg13588800	Twist_1 Fw	AGAATGTAGAGGTGTGAGGATG	60,3	5'-Biotin
		Twist_1 Rv	CCTTAACTAAAATCCTTCCAAATTATTCA	58,8	
		Twist_1 Seq	AATAAAAACAATACTACTAAT	42,1	
9	cg20052718	Twist_2 Fw	GGTTGTTGTAGTTTGGTTTTTTT	56,9	5'-Biotin
		Twist_2 Rv	CCCCCTCTTCTCTCTACCC	58,5	
		Twist_2 Seq	TGGTTTTTTTAGTTGTTGTTAG	44,0	
10	cg17839237	Twist_3 Fw	GGGAGGGGAAGGTGTGGAT	61,4	5'-Biotin
		Twist_3 Rv	AAACCTCCAAATCTACAACCTCT	59,4	
		Twist_3 Seq	TGGATGGTTTAGAGGTTTAAAAAG	47,6	
11	cg24446548	Twist_41_Fw	GTGTGGATGGTTTAGAGGTTTAAAAAGAAA	59,8	5'-Biotin
		Twist_41_Rv	TAACACTACTACCCCAAACCTTC	59,5	
		Twist_41_Seq	ACACTACTACCCCAAAC	52,3	
12	cg00240432	Twist_42_Fw	GTGGATGGTTTAGAGGTTTAAAAAG	56,5	5'-Biotin
		Twist_42_Rv	ACTAAAAACCAAACCTTCTCTATAAACTTC	55,6	
		Twist_42_Seq	CAAACCAATAACACTACTAC	46,1	
13	cg14782672	Twist_5_Fw	AGGGATTTTTAGAAAGTTTTATAGGAAAG	57,0	5'-Biotin
		Twist_5_Rv	ACCCACTATATAAAACTATTACCATTACT	58,8	
		Twist_5_Seq	ATTACCATTACTACTATC	38,4	
14	cg26818735	Twist_7_Fw	GAGGGTTTGAATTTTGTGTTAGTTTG	59,2	5'-Biotin
		Twist_7_Rv	AACAACCCACCCAAAACAAAC	60,1	
		Twist_7_Seq	GTTTTAGTAAGTTGGTTATGA	51,7	

Angabe der CpG Target ID gemäß Infinium HumanMethylation450K BeadChip. (Tm = Schmelztemperatur, berechnet mit Online-Tool *Oligo Calc* (Kibbe 2007), Fw = Vorwärtsprimer, Rv = Rückwärtsprimer, Seq = Sequenzierungsprimer).

2. Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

In Tabelle 8 werden die Oligonukleotidsequenzen für die methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) aufgeführt. Primer, die für die Amplifikation von Sequenzen mit methylierten Cytosinen designed wurden, werden als M-Primer (Forward/ Reverse = Vorwärts/ Rückwärts) bezeichnet. Primer für die Amplifikation von Sequenzen mit unmethylierten Cytosinen werden als U-Primer bezeichnet.

Das Assaydesign erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Swetlana Scheufele aus dem Institut für Humangenetik. Die Optimierung der PCR-Bedingungen war Bestandteil dieser Arbeit.

Tabelle 8: Primersequenzen und ihre Bezeichnung für die methylierungsspezifische PCR mit Angabe der Schmelztemperatur

	CpG/ BSPS-Assay	Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]
1	cg20052718 <i>TWIST1</i> Sequenz 2	M-Primer Fw	CGTTGTTGTTTAGGTTGTCGT	50,5
		M-Primer Rv	TACTCTCTCCTCCGCGAA	50,3
		U-Primer Fw	GTTGTTGTTTAGGTTGTTGTTGGT	52,3
		U-Primer Rv	CTACTCTCTCCTCCACAAAC	51,8
2	cg17839237 <i>TWIST1</i> Sequenz 3	M-Primer Fw	AGAAAGCGTTTAACGGTTGGACGT	55,7
		M-Primer Rv	CTCGGAACTCTACAACACCGA	56,7
		U-Primer Fw	AGAAAGTGTTTAATGGTTGGATGT	50,6
		U-Primer Rv	CTCACAACCTCTACAACACCAA	51,1
3	cg18103859 Assay 4	M-Primer Fw	AGTTAAAAATTCGGGAATCGGG	51,1
		M-Primer Rv	CACGCGATTATTCGAATCCC	51,8
		U-Primer Fw	TATTAAGTTAAAAATTTGGGAATTGGG	50,6
		U-Primer Rv	CACACAATTATTCAAATCCCCAC	51,7
4	cg05877497 Assay 5	M-Primer Fw	TTTCGCGTTGGTTCGTTTCG	51,1
		M-Primer Rv	AACCGATCTTCCCGTACCTA	51,8
		U-Primer Fw	GTGTTTTTTTGTGTTGGTTTGTGTTG	51,1
		U-Primer Rv	AACCAATCTTCCCATACCTACA	51,1

Primer, die an methylierte Cytosine binden, werden als M-Primer bezeichnet. Primer, die an unmethylierte Cytosine/ Thymine binden, werden als U-Primer bezeichnet. Angabe der CpG Target ID gemäß Infinium HumanMethylation450K BeadChip sowie des zugehörigen Bisulfit-Pyrosequenzierungs-Assays (BSPS-Assay). Fw = Vorwärtsprimer, Rv = Rückwärtsprimer.

2.1.7.1 Vorbereitung der Primer

Zur Vorbereitung der Primer für die PCR und Pyrosequenzierung wurden die gelieferten lyophilisierten Oligonukleotide in einer Konzentration von 200 pmol/μl in ddH₂O gelöst, indem sie bei Raumtemperatur mindestens 1 Stunde bei 200 rpm auf dem Plattenschüttler geschüttelt wurden. Diese Stocklösung diente der Herstellung einer Arbeitslösung mit einer Konzentration von 20 pmol/μl (Verdünnung 1:10 mit ddH₂O).

2.1.7.2 Lage der untersuchten CpG-Loci

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Lage der mittels BSPS untersuchten Sequenzen. Aufgeführt sind hier nur die Sequenzen, für die die Etablierung der BSPS erfolgreich verlief. Informationen über den Aufbau der Gene entstammen dem UCSC Genome Browser (hg19).

Tabelle 9: Übersicht über die Lage der untersuchten CpG-Loci

Bezeichnung der Sequenz	Gen/ DNA- Region	Chr.	CpG*	Lage im Gen	Anzahl CpGs	CGI	Weitere Informationen
Assay 1 <i>PAX9</i>	<i>PAX9</i>	14	cg04415798	Intron 1/4	6	Nein	
Assay 2 cg233	<i>SALARNA1</i>	14	cg23322933		3	Ja	Nicht-kodierende RNA
Assay 3 cg181	<i>SALARNA1</i>	14	cg18103859		2	Nein	
Assay 4 <i>MEIS1</i>	<i>MEIS1</i>	2	cg05877497	Intron 4/10	3	Ja	
Assay 5 cg023		6	cg02391713		5	Ja	Lage in einem CGI mit unklarem Bezug; nächstes Gen: <i>LIN28B</i>
Assay 6 cg226		6	cg22620090		6	Ja	
Assay 7 <i>ALX3</i>	<i>ALX3</i>	1	cg06809252	Intron 1/3	3	Ja	
<i>TWIST1</i> Sequenz 1	<i>TWIST1</i>	7	cg13588800	Intron 1/1	2	Ja	
<i>TWIST1</i> Sequenz 2	<i>TWIST1</i>	7	cg20052718	Exon 1/2	5	Ja	
<i>TWIST1</i> Sequenz 3	<i>TWIST1</i>	7	cg17839237	Exon 1/2	4	Ja	
<i>TWIST1</i> Sequenz 4.1	<i>TWIST1</i>	7	cg24446548 cg00240432	Exon 1/2	3	Ja	
<i>TWIST1</i> Sequenz 4.2	<i>TWIST1</i>	7	cg00240432	Exon 1/2	2	Ja	
<i>TWIST1</i> Sequenz 5	<i>TWIST1</i>	7	cg14782672	Exon 1/2	3	Ja	

*Angabe der CpG Target ID gemäß Infinium HumanMethylation450K BeadChip. Chr. = Chromosom; CGI = CpG-Insel.

2.2 Methoden

Der nachfolgende Teil dieser Arbeit dient der Erläuterung der angewandten Methoden. Initial möchte ich kurz auf den Infinium HumanMethylation450K BeadChip eingehen, der die Grundlage für die Fragestellung dieser Arbeit geschaffen hat. Ziel dieser Arbeit war die Validierung von Methylierungsdaten, die mit Hilfe dieser Technologie erhoben wurden. Sie erfolgte durch den Einsatz der Bisulfit-Pyrosequenzierung (Kapitel 2.2.3). Weiterhin wurde für einige CpGs eine methylierungsspezifische PCR etabliert (Kapitel 2.2.5). Grundlage der genannten Methoden ist die DNA-Bisulfitkonversion, mit der sich Kapitel 2.2.2 befasst.

2.2.1 Auswertung der Ergebnisse einer Methylierungsuntersuchung mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren Methylierungsdaten, die mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip (Illumina, San Diego, USA; im Folgenden auch kurz als HM450K BC bezeichnet) am Institut für Humangenetik, UKSH Campus Kiel gewonnen wurden. Mit Hilfe des HM450K BC kann der Methylierungsstatus von > 480 000 Cytosin-Loci parallel analysiert werden. Diese sind in CpG-Islands, CpG-Shores und CpG-Shelves, aber auch im Genkörper und der sogenannten Open Sea gelegen. Es werden Cytosine in Regionen 200 bp bis 1500 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt (TSS), in 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTR), in Exon 1, im Genkörper und in 3'-untranslatierten Regionen (3'UTR) abgedeckt (Sandoval et al. 2014). 99 % der Cytosin-Loci entsprechen CpG-Dinukleotiden, aber auch CNG sind enthalten. Pro Genregion werden durchschnittlich 17 Cytosin-Loci untersucht.

Die technische Durchführung des HM450K BC erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik, UKSH Campus Kiel auf der Grundlage der Herstellerangaben von Illumina. Auf methodische Aspekte des HM450K BC soll in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

Die Auswertung der mittels HM450K BC gewonnenen Daten erfolgte mit dem „Methylation Module“ der Genome Studio Software von Illumina. Zu Beginn wurde eine Normalisierung der Daten durch den Abgleich mit internen Kontrollen des Chips durchgeführt. Zur Überprüfung der Qualität der Messung für einzelne Cytosin-Loci wurde über die Software ein Detection p-value ermittelt. In die Auswertung der Daten wurden nur Cytosin-Loci mit einem Detection p-value < 0,01 inkludiert. Um geschlechtsspezifische Unterschiede z.B. durch die generelle X-Inaktivierung durch Methylierung in einem X-Chromosom bei Frauen aus der Analyse auszuschließen, wurden alle Cytosin-Loci, die auf dem X- oder Y-Chromosom lokalisiert waren, nicht in die folgende Auswertung einbezogen. Auch die auf dem Array abgebildeten SNPs wurden von der finalen Analyse ausgeschlossen.

Zur Identifikation differenziell methylierter Loci zwischen Tumor- und Lungengewebe einerseits sowie zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinom andererseits erfolgte zunächst eine statistische Auswertung mit Hilfe eines t-Tests und die Ermittlung der jeweiligen q-Werte mit Hilfe des Qluore OMICS Explorers. Der q-Wert entspricht der False Discovery Rate (FDR), die den korrigierten p-Wert für multiples Testen angibt. Dieser q-Wert wurde auf < 0,005 festgelegt, um den Datensatz weiter einzugrenzen. Anschließend wurden die Daten aus der Software in Excel extrahiert und anhand ihres q-Wertes sortiert. Über die

Software können zudem die mittlere Differenz des Methylierungsgrades zwischen verschiedenen Gruppen ermittelt und die Ergebnisse graphisch dargestellt werden (z.B. in Form einer Heatmap).

Auf diese Weise wurde einerseits der Methylierungsgrad von Gewebe aus nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) mit gesundem Lungengewebe derselben Patienten verglichen. Andererseits wurde speziell der Methylierungsgrad von ADCs und SQCCs gegenübergestellt. Hierbei fiel eine differenzielle Methylierung der beiden Tumorentitäten u.a. im Gen *TWIST1* auf. Ziel dieser Arbeit ist die Validierung der Ergebnisse des HM450K Arrays durch eine erweiterte Methylierungsanalyse mit Hilfe der Bisulfit-Pyrosequenzierung.

2.2.2 DNA-Bisulfitkonversion

Das Feld der epigenetischen Methylierungsanalysen wurde 1992 mit der Einführung der Bisulfitkonversion zur chemischen Modifikation von Cytosinen durch Frommer et al. revolutioniert (Frommer et al. 1992). Sie ist Voraussetzung für die Untersuchung des Methylierungsstatus durch Bisulfit-Pyrosequenzierung und methylierungsspezifische PCR.

Die Bisulfitkonversion führt zur Umwandlung von Cytosin in Uracil und erfolgt an denaturierter DNA. Durch eine Inkubation der DNA mit Natriumbisulfit kommt es zunächst zur Sulfonierung von Cytosin (C) an der C5,6-Doppelbindung der Cytosinbase. Dabei entsteht Cytosinsulfonat ($C-SO_3^-$). Durch hydrolytische Desaminierung wird $C-SO_3^-$ zu Uracilsulfonat ($U-SO_3^-$). Unter alkalischen Bedingungen entsteht daraus schließlich Uracil (U). Zusammengefasst führt die Behandlung von genomischer DNA mit Natriumbisulfit zu einer Umwandlung von Cytosin in Uracil (siehe Abbildung 3).

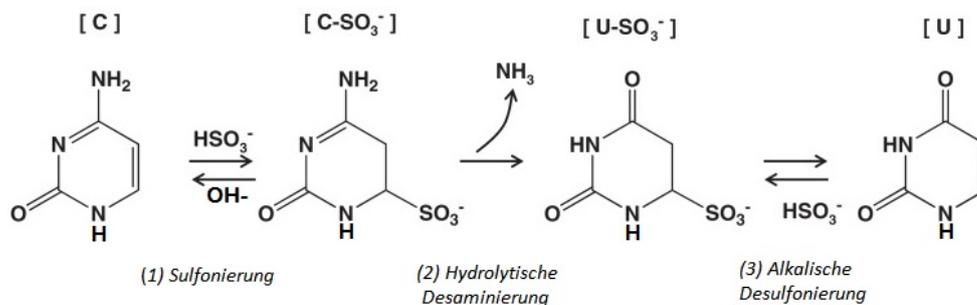


Abbildung 3 Chemischer Ablauf der Bisulfitkonversion von Cytosin zu Uracil

Die Bisulfitkonversion erfolgt an denaturierter DNA. Die Inkubation mit Natriumbisulfit führt zunächst zur Sulfonierung (1) von Cytosin [C] zu Cytosinsulfonat [$C-SO_3^-$]. Durch hydrolytische Desaminierung (2) wird Cytosinsulfonat zu Uracilsulfonat [$U-SO_3^-$] umgewandelt. Unter alkalischen Bedingungen (3) entsteht daraus Uracil [U]. Modifiziert nach Hayatsu 2008.

Die Reaktivität von 5-Methylcytosinen ist unter den gewählten Reaktionsbedingungen deutlich herabgesetzt, sodass diese von der Bisulfitkonversion weitestgehend verschont bleiben (Hayatsu et al. 1970; Shapiro et al. 1974; HAYATSU 2008). Methylierte Cytosine bleiben daher bei der Bisulfitkonversion als Cytosine erhalten, während unmethylierte Cytosine in Uracil umgewandelt werden. In einer nachfolgenden PCR werden die neu entstandenen Uracil-Basen (ehemals unmethylierte Cytosine) durch Thymidin (T) ersetzt, methylierte Cytosine bleiben erhalten (siehe Abbildung 4). Die Bisulfitkonversion in

Kombination mit einer PCR ermöglicht somit die Umsetzung eines Methylierungsunterschiedes der DNA in einen Sequenzunterschied. Zu beachten ist, dass auf diese Weise nicht-komplementäre DNA-Stränge entstehen, für deren PCR-Amplifikation spezifische Primer benötigt werden (Laird 2003).

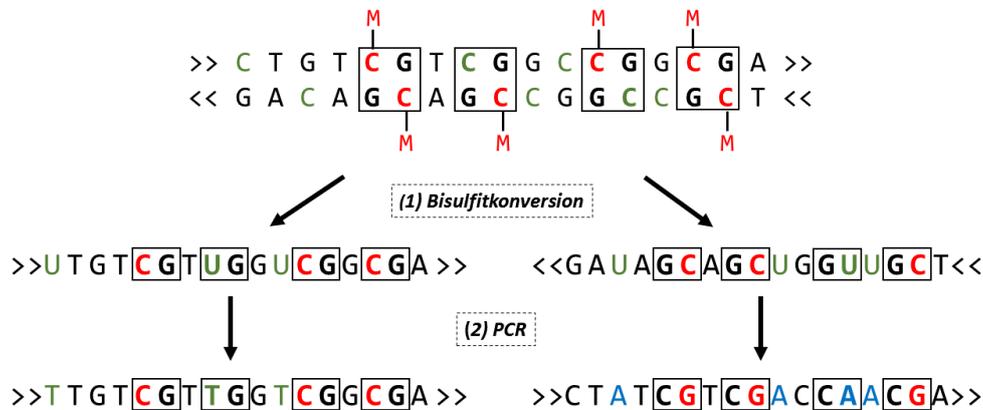


Abbildung 4: Bisulfitkonversion von genomischer DNA

Die Bisulfitkonversion führt zunächst zur Konversion nicht methylierter Cytosine in Uracil. Da die Reaktivität methylierter Cytosine unter den gewählten Reaktionsbedingungen deutlich reduziert ist, werden sie durch die Bisulfitbehandlung nicht verändert (1). In einer nachfolgenden PCR entsteht aus Uracil Thymin (2).

Eine anschließende Sequenzierung bisulfitkonvertierter DNA kann folglich Zugang zur epigenetischen Information der DNA ohne den Einsatz methylierungsabhängiger Restriktionsenzyme oder spezifischer Antikörper schaffen (Frommer et al. 1992; Laird 2003). Heute beruht ein Großteil der Methoden zur Methylierungsanalyse auf dem Prinzip der Natriumbisulfitkonversion (Ammerpohl et al. 2009). In der vorliegenden Studie wurden anschließend an die Bisulfitkonversion der DNA Methylierungsanalysen mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung (BSPS) und methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR) durchgeführt.

Durchführung der Natriumbisulfitkonversion

Zur Konversion der OP-Präparate und der Paired Biopsies für die anschließende BSPS und MS-PCR wurde das EpiTect Bisulfite Kit von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der Empfehlungen des Benutzerhandbuches.

Je Aliquot wurde 1 µg DNA in 20 µl RNase-freiem Wasser eingesetzt. In einem 0,2 ml PCR-Tube wurde diese mit 85 µl des vollständig gelösten Bisulfitmixes sowie 35 µl DNA Protect Buffer versetzt. Der Mix wurde dann wie folgt im Thermocycler inkubiert:

Zyklus	Temperatur	Zeit
Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	25 min
Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	85 min
Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	175 min
Lagerung	20 °C	∞

Am folgenden Tag erfolgte die Aufreinigung der Proben. Der gesamte Ansatz wurde zuerst in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit 560 µl BL-Puffer versetzt, gevortext und kurz zentrifugiert. Bei einem Einsatz von < 100 ng DNA wurde der BL-Puffer zusätzlich mit 5,6 µl Carrier-RNA je Probe versetzt. Der Mix wurde auf die EpiTect Säule gegeben und bei 25 000 x g für 1 min zentrifugiert. Hierbei erfolgt die Bindung der Einzelstrang-DNA an die EpiTect Spin Column Membran. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 µl Waschpuffer (Buffer BW) auf die Säule pipettiert und erneut bei 25 000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ebenso verworfen, 500 µl Desulfonierungspuffer (Buffer BD) auf die Säule gegeben und für 15 min bei geschlossenem Deckel bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde erneut bei 25 000 x g für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgte die zweimalige Zugabe von weiteren 500 µl Waschpuffer (Buffer BW) mit anschließender Zentrifugation bei 25 000 x g für 1 min. Zum Trocknen wurde die Säule auf ein neues Sammeltube gestellt und bei 25 000 x g für 1 min zentrifugiert. Zuletzt wurde die Säule auf ein vorbereitetes 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, 20 µl ddH₂O auf die Säule gegeben und ein letztes Mal bei 15 000 x g für 1 min zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Die aufgereinigte, eluierte DNA wurde im Anschluss in ein geeignetes Lagerungsgefäß überführt. Eluierte DNA kann direkt eingesetzt werden oder laut Hersteller bei - 20 °C bis zu 3 Jahre gelagert werden.

2.2.3 Bisulfit-Pyrosequenzierung (BSPS)

Zur quantitativen Analyse des Methylierungsstatus der zuvor ausgewählten DNA-Regionen wurde die Bisulfit-Pyrosequenzierung angewandt (BSPS). Diese Methode stellt eine Echtzeit-Sequenzierung dar und beruht auf der Messung eines Lichtsignals beim Einbau von Nukleotiden in die DNA-Sequenz (siehe Abbildung 5).

Nach der PCR-Amplifikation erfolgt die Aufreinigung der PCR-Produkte. Der als Matrize dienende DNA-Strang wird dabei über seine 5'-Biotinylierung gebunden. Nach der Hybridisierung eines spezifischen Sequenzierungsprimers kann die Elongation erfolgen. Während der Pyrosequenzierung erfolgt die sequenzielle Injektion der Einzelnukleotide in die Reaktionskammer basierend auf der zu analysierenden Sequenz. Beim Einbau der Nukleotide in die DNA-Sequenz setzt die DNA-Polymerase Pyrophosphat frei, welches durch eine ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt wird. ATP wiederum dient der Luciferase als Substrat zur Generierung eines Lichtsignals (Tost und Gut 2007; Ammerpohl et al. 2016). Die Lichtemission verhält sich hierbei proportional zur Anzahl inkorporierter Nukleotide, sodass eine quantitative Auswertung möglich ist (Harrington et al. 2013; Tost und Gut 2007; Ammerpohl et al. 2016). Nicht inkorporierte Nukleotide werden durch die Apyrase abgebaut, sodass immer nur eine Art von Nukleotiden pro Zeiteinheit im Reaktionsgemisch enthalten ist.

Die Lichtemission wird von einer Kamera registriert und über die PyroMark CpG Software in Form von Pyrogrammen dargestellt. In den Pyrogrammen wird die Intensität des Lichtsignals (Lumineszenz) auf der y-Achse in Form von Peaks über der DNA-Sequenz dargestellt (Angabe in arbiträren Einheiten). Nicht-

methylierte Cytosine (CNGs) können in der Auswertung der Pyrogramme zur Kontrolle der vollständigen Bisulfitkonversion herangezogen werden (siehe Abbildung 6, Kapitel 2.2.3.4).

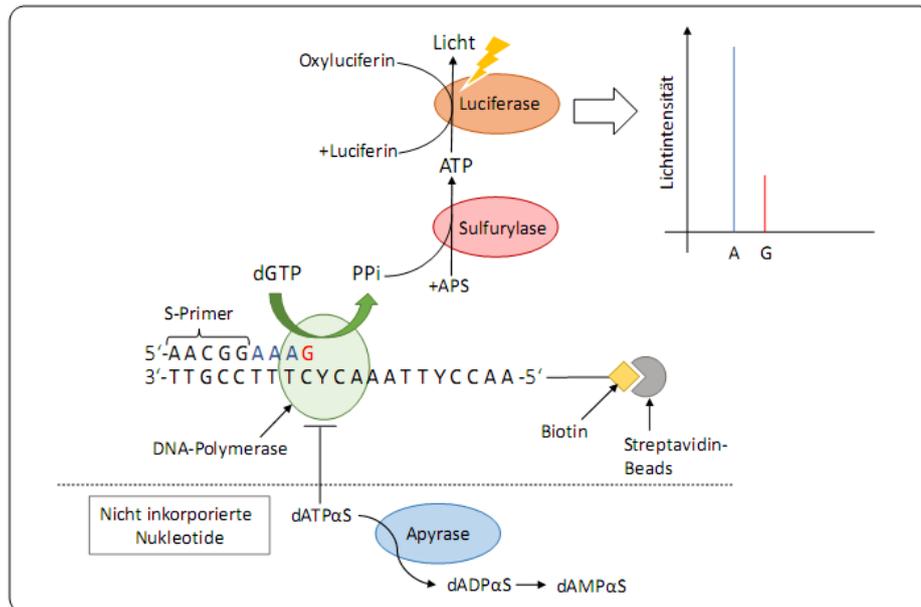


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Bisulfit-Pyrosequenzierung

Nach der PCR-Amplifikation erfolgt die Aufreinigung der PCR-Produkte. Der als Matrize dienende DNA-Strang wird dabei über seine 5'-Biotinylierung an Streptavidin-ummantelte Beads gebunden. Die Hybridisierung eines spezifischen Sequenzierungsprimers ermöglicht eine Elongation in der nachfolgenden Pyrosequenzierungs-Reaktion. Zunächst werden Enzym und Substrat in die Reaktionskammern injiziert. Anschließend erfolgt die sequenzielle Zugabe der Nucleotide (dATP α S, dCTP, dGTP und dTTP) basierend auf der zu analysierenden Sequenz. Beim Einbau der Nucleotide setzt die DNA-Polymerase Pyrophosphat (PPi) frei. Über die Sulfurylase wird PPi mit APS zu ATP verstoffwechselt. ATP wiederum dient der Luciferase als Substrat zur Generierung eines Lichtsignals. Die Intensität des Lichtsignals verhält sich dabei proportional zur Anzahl der inkorporierten Nucleotide. Das Lichtsignal wird von einer Kamera erfasst und über eine Software in Form von Pyrogrammen dargestellt. Nicht inkorporierte Nucleotide werden durch die Apyrase zu Monophosphatnucleotiden abgebaut, sodass sie der Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Modifiziert nach Ammerpohl et al. 2016; Harrington et al. 2013.

PPi = Pyrophosphat, APS = Adenosin-5'-Phosphosulfat; ATP = Adenosin-Triphosphat, dATP α S = Desoxyadenosin-5'-(alpha-thio)-Triphosphat, dADP α S = Desoxyadenosin-5'-(alpha-thio)-Diphosphat, dAMP α S = Desoxyadenosin-5'-(alpha-thio)-Monophosphat, dGTP = Desoxyguanosintriphosphat, S-Primer = Sequenzierungsprimer.

Die Auswertung des HM450K BC (siehe Kapitel 2.2.1) hatte zur Generierung der Hypothese geführt, dass SQCCs und ADCs signifikante Methylierungsunterschiede im Bereich des Gens *TWIST1* zeigen. Zur Validierung der Daten wurden in dieser Arbeit insgesamt 15 CpG-Dinucleotide in 6 Sequenzen aus *TWIST1* untersucht. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der BSPS-Assays war Bestandteil dieser Arbeit. Außerdem konnten anhand der Daten, die mittels HM450K BC generiert wurden, weitere CpGs identifiziert werden, die in allen Lungenkarzinomentitäten eine veränderte Methylierung im Vergleich mit tumorfreiem Lungengewebe aufwiesen. Diese Ergebnisse sollten in einem zweiten Schritt ebenfalls mittels BSPS validiert werden. Hierfür kamen sieben weitere Assays, die insgesamt 28 CpG-Dinucleotide enthielten, zum Einsatz. Das Primerdesign und die Optimierung der Reaktionsbedingungen für diese Assays erfolgten im Rahmen der Dissertationsarbeit von Dr. rer. nat. Swetlana Scheufele aus dem Institut für Humangenetik, UKSH Campus Kiel. Die Primer wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der DNA-Sequenz mit den zu analysierenden CpGs wurden spezifische PCR-Primer designed. Das Design erfolgte unter Zuhilfenahme der PyroMark Assay Design Software von Qiagen. Beim Primerdesign ist es wichtig zu bedenken, dass nach der Bisulfitkonversion nicht-komplementäre DNA-Stränge vorliegen. Die PCR- und Sequenzierprimer müssen daher spezifisch für den Plus- oder Minusstrang der DNA generiert werden. Aufgrund ihres unbekanntes Methylierungsstatus sollten CpG-Dinukleotide in den Primeroligonukleotiden außerdem vermieden werden (Ammerpohl et al. 2016). Für den DNA-Strang, der später als Matrize in der Pyrosequenzierung dienen soll, werden 5'-biotinylierte Primer verwendet. Über diese Biotinylierung bindet der DNA-Strang an die Sepharose Beads, die zur Aufbereitung des PCR-Amplifikats für die Pyrosequenzierung verwendet werden.

Alle Primer wurden für den Reaktionsansatz auf eine Zielkonzentration von 20 pmol/μl verdünnt. Der Standardreaktionsansatz für die PCR wurde mit dem PyroMark PCR Kit von Qiagen nach folgendem Schema in SafeSeal Reaktionsgefäßen angesetzt, die zuvor 15 min mit UV-C-Strahlung behandelt wurden:

8 μl Aqua dest.
12,5 μl Mastermix (PyroMark PCR Kit)
2,5 μl CL-Reagenz (PyroMark PCR Kit)
0,5 μl Forward-Primer
0,5 μl Reverse-Primer
24 μl gesamt (je Probe)

Zu 24 μl des Mastermixes wurde je 1 μl bisulfitkonvertierte DNA pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes im Thermocycler. Zusätzlich wurde bei jedem Reaktionsansatz eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der ddH₂O statt DNA zu dem Reaktionsansatz gegeben wurde.

Die PCR verläuft in drei Schritten: In der ersten Phase der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA bei hohen Temperaturen von 90 °C– 95 °C in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagern sich bei Temperaturen zwischen 55 °C und 65 °C Primer und DNA-Polymerase an den DNA-Einzelstrang an. Variationen der Temperatur in dieser Phase ermöglichen die Optimierung von Spezifität und Produktivität der PCR. In der letzten Phase der Elongation synthetisiert die DNA-Polymerase bei 72 °C den komplementären DNA-Strang, sodass neue dsDNA entsteht. Alle drei Schritte werden in 45 Zyklen wiederholt, sodass möglichst alle Primer inkorporiert werden. Insbesondere biotinylierte Primer können sonst die nachfolgende Pyrosequenzierung beeinträchtigen (Ammerpohl et al. 2016).

Für die PCR wurde folgendes Standard-Thermocyclerprotokoll angewandt:

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit	
Initiale Denaturierung	95	15 min	
Denaturierung	94	30 s	} 45 Zyklen
Annealing	55/ 60/ 62/ 65	30 s	
Elongation	72	30 s	
Elongation	72	10 min	
Lagerung	4	∞	

Zur Ermittlung der optimalen PCR-Bedingungen wurde die PCR zunächst an Kontrollen bei verschiedenen Annealing-Temperaturen (initial 55 °C, 60 °C, 65 °C; Abkürzung: Ta) durchgeführt. Für die Austestung der Primer kamen drei Kontroll-DNAs zum Einsatz: eine vollständig methylierte Positivkontrolle (MK) der Firma Millipore (Deutschland), eine Gesamt-Genom-Amplifizierte DNA (WGA) als unmethylierte Kontrolle, sowie eine genomische Kontrolle (gDNA), die nicht mit Bisulfit konvertiert wurde. Nach einer Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.3.2) wurde visuell das beste PCR-Ergebnis ermittelt. Dies entsprach einer möglichst kräftigen, spezifischen Bande in der erwarteten Produktgröße für die methylierte und unmethylierte Kontrolle. Gegebenenfalls wurde die Ta weiter angepasst und zum Beispiel bei 62°C oder 63°C durchgeführt. Weitere Mittel zur Optimierung der Reaktionsbedingungen waren die Reduktion der eingesetzten Primerkonzentration, um in der BSPS störende, nicht-inkorporierte Primer zu reduzieren und die Anpassung der MgCl₂-Konzentration im Reaktionsansatz. Magnesiumionen erfüllen bei der PCR mehrere Aufgaben. Sie sind wichtiger Kofaktor der DNA-Polymerase, bilden lösliche Komplexe mit den dNTPs und wirken sowohl auf die spezifische als auch die unspezifische Anlagerung des Primers an die Template-DNA stabilisierend. Sie können daher die Produktivität der DNA-Polymerase steigern und zu mehr PCR-Produkt führen, begünstigen jedoch auch die Synthese unspezifischer DNA-Produkte. Die optimierten Ta und Modifikationen des Reaktionsansatzes der PCR, die für die nachfolgende Analyse mittels Pyrosequenzierung verwendet wurden, sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Optimierte PCR-Bedingungen der Assays für die Pyrosequenzierung
Besonderheiten beziehen sich auf den Reaktionsansatz von 24 µl je Probe.

Name des Assays	CpG*	Gen	Ta [°C]	Besonderheiten
Assay 1 <i>PAX9</i>	cg04415798	<i>PAX9</i>	60	
Assay 2 cg2332	cg23322933		60	Einsatz von 1/3 der Primermenge laut Standardreaktionsansatz
Assay 3 cg1810	cg18103859		55	
Assay 4 <i>MEIS1</i>	cg05877497	<i>MEIS1</i>	60	Einsatz von 1/2 der Primermenge laut Standardreaktionsansatz
Assay 5 cg0239	cg02391713		60	
Assay 6 cg2262	cg22620090		60	
Assay 7 <i>ALX3</i>	cg06809252	<i>ALX3</i>	60	
<i>TWIST1</i> Sequenz 1	cg13588800	<i>TWIST1</i>	60	
<i>TWIST1</i> Sequenz 2	cg20052718	<i>TWIST1</i>	62	
<i>TWIST1</i> Sequenz 3	cg17839237	<i>TWIST1</i>	62	
<i>TWIST1</i> Sequenz 4.1	cg24446548	<i>TWIST1</i>	65	
<i>TWIST1</i> Sequenz 4.2	cg00240432	<i>TWIST1</i>	62	+ 0,5 µl MgCl ₂ (25mM) je Reaktionsansatz
<i>TWIST1</i> Sequenz 5	cg14782672	<i>TWIST1</i>	60	

*CpG: target ID gemäß Infinium HumanMethylation450K BeadChip. Ta. = Annealing-Temperatur.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %-igen Agarosegel auf ihre Fragmentgröße überprüft. Hierzu wurden 4 µl des Reaktionsansatzes zusammen mit einem Längenstandard von 100 bp (TriDye 100bp DNA Ladder) aufgetragen und bei 10 V pro 1 cm Gellänge über einen Zeitraum von etwa einer Stunde aufgetrennt. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht betrachtet. Der Dokumentation diene die BioDoc Analyze 2.1 Software. Amplifikate, die in der Agarose-Gelelektrophorese eine kräftige Bande der zu erwartenden Länge zeigten, wurden anschließend pyrosequenziert.

2.2.3.3 Durchführung der Bisulfit-Pyrosequenzierung (BSPS)

Zur Vorbereitung der BSPS wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen der verschiedenen Assays in das Programm eingegeben, sodass die Nukleotide in der Reihenfolge der bekannten DNA-Sequenz in das Reaktionsgemisch injiziert werden konnten.

Zur BSPS wurden die PCR Produkte auf eine PCR Plate 96 übertragen und mit ddH₂O auf 40 µl aufgefüllt. Je Probe wurden 40 µl Binding-Buffer mit 5 µl Streptavidin Sepharose Beads versetzt. Hiervon wurden jeweils 43 µl zu den Proben pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und für ca. 10 min bei 3000 rpm auf dem Plattenschüttler gemischt, um die Bindung der biotinylierten PCR-Produkte an die Sepharose Beads zu ermöglichen.

In der Zwischenzeit wurde die Sequenzierplatte (PSQ-Plate) vorbereitet. Je Reaktionsansatz wurden 40 µl Annealing Buffer mit 1 µl Sequenzierprimer versetzt und hiervon jeweils 40 µl auf die entsprechenden Wells der Sequenzierplatte pipettiert.

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit Hilfe der Vacuum Prep Workstation. Diese wurde mit je einer Wanne (PyroMark Vacuum Prep Trough) mit destilliertem Wasser, 70 % Ethanol, 0,2 M NaOH bzw. Waschpuffer (Herstellung siehe Material, Kapitel 2.1.3) sowie der PCR Platte mit den gebundenen PCR-Produkten bestückt. Nach einmaliger Reinigung des Prep Tools in destilliertem Wasser wurde das Tool vorsichtig auf die vorbereitete PCR-Platte abgesenkt, sodass die gebundene dsDNA von den Filtertips des Prep Tools durch das Vakuum aufgenommen wurde. Das Prep Tool wurde danach in halbkreisförmigen Bewegungen geschwenkt, um das Abfließen verbleibender Flüssigkeit aus dem Prep Tool zu begünstigen. Hiernach wurde das Prep Tool vorsichtig in die erste Wanne mit 70 % Ethanol abgesenkt, um die gebundene dsDNA zu reinigen. Als nächstes erfolgte die Denaturierung der dsDNA in der vorbereiteten Natronlauge. Bei diesem Schritt bleibt der biotinylierte DNA-Einzelstrang über die Sepharose Beads an die Filter Tips gebunden, während der nicht-biotinylierte DNA-Einzelstrang über das Vakuum des Prep Tools entfernt wird. Zuletzt erfolgte eine weitere Aufreinigung der PCR-Produkte im Waschpuffer. Nach den einzelnen Aufreinigungsschritten wurde das Prep Tool jeweils zwei bis drei Mal in halbkreisförmigen Bewegungen geschwenkt, um verbleibende Flüssigkeiten über das Vakuum aus dem Prep Tool zu entfernen. Abschließend wurde die Vakuumpumpe mit der biotinylierten ssDNA bis kurz über die Sequenzierplatte abgesenkt, das Vakuum abgestellt und das Tool auf der Sequenzierplatte abgestellt. Durch leichtes Rütteln

wurde die ssDNA vorsichtig in den Annealing-Buffer mit den Primern überführt. Anschließend erfolgte eine erneute zweiminütige Denaturierung der PCR-Produkte bei 85 °C. Während der folgenden Abkühlung auf Raumtemperatur fand das Annealing der Sequenzierprimer an die DNA-Sequenz statt.

Die Kartusche (PyroMark Q96 Cartridge) für die Pyrosequenzierung wurde entsprechend der mit der PyroMark 2.0 Software ermittelten Volumenangaben mit dem Substrat-/ Enzymmix sowie den Nukleotiden aus dem PyroMark Gold Q96 Kit befüllt. Die abgekühlte Sequenzierplatte und die Kartusche wurden dann in den PyroMark Q96 ID Pyrosequenzierer von Qiagen eingesetzt und die Sequenzierung gestartet.

2.2.3.4 Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung

Für die Auswertung der BSPS wurde die PyroMark CpG Software 1.0.11 von Qiagen verwendet, die die Ergebnisse zunächst in Form von Pyrogrammen darstellt (siehe Abbildung 6) und automatisiert auch einige Warnhinweise im Hinblick auf die Qualität der Sequenzierung gibt. In den Pyrogrammen wird auf der vertikalen Achse die Intensität des Lichtsignals [arbiträre Einheiten] über der auf der horizontalen Achse dargestellten Nukleotidfolge angezeigt. Die Intensität des Lichtsignals ist hierbei proportional zur Anzahl der inkorporierten Nukleotide (Ammerpohl et al. 2016; Harrington et al. 2013). Innerhalb der zu analysierenden Sequenz sind Kontrollpunkte zur Überprüfung der Vollständigkeit der Bisulfitkonversion enthalten (siehe Abbildung 6). Eine weitere Beurteilung der Pyrogramme erfolgte manuell. Als ausreichende Signalintensität wurde ein Lichtsignal von > 15 arbiträre Einheiten je Einzelnukleotid gewertet. Niedrigere Werte sprechen für eine schlechte Qualität des Pyrogramms aufgrund einer ungünstigen Signal-to-Noise-Ratio (Ammerpohl et al. 2016). Insbesondere während der Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Sequenzierung kann es zu Verlusten von PCR-Produkt kommen, was eine geringe Qualität der Pyrogramme zur Folge hat. Für Proben mit qualitativ niedrigwertigen Pyrogrammen wurde die Pyrosequenzierung daher wiederholt, um eine bessere Auswertbarkeit zu erreichen.

Bei jeder Pyrosequenzierung wurden sowohl eine vollständig methylierte, als auch eine unmethylierte Kontrolle mitgeführt. Eine Negativkontrolle mit ddH₂O anstelle von DNA diente dem Ausschluss von Kontaminationen.

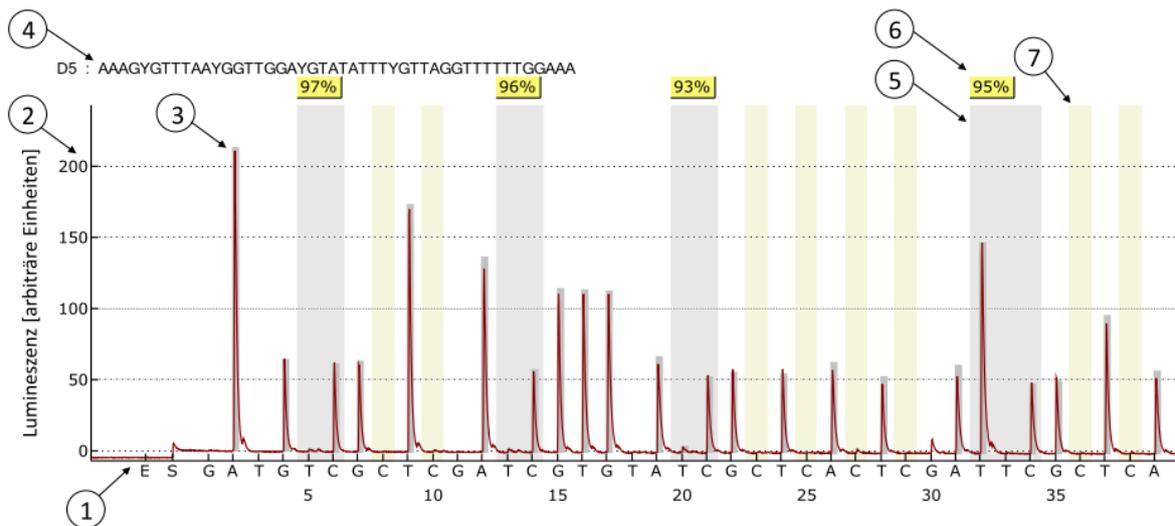


Abbildung 6: Pyrogramm der methylierten Kontrolle (MK) der Sequenz 3 aus dem *TWIST1*-Gen

Auf der horizontalen Achse (1) des Pyrogramms wird die Reihenfolge der Injektion der Nukleotide dargestellt. Aus der vertikalen Achse (2) ist die Intensität des Lichtsignals bei Injektion der Einzelnukleotide abzulesen. Diese ist proportional zur Anzahl der inkorporierten Nukleotide. Die kleinen grauen Balken (3) hinter den Peaks geben die zu erwartende Signalintensität an. Oberhalb des Pyrogramms ist zum Vergleich die zu analysierende, bekannte Sequenz angegeben (Sequence to Analyze, 4). Potenziell methylierte Cytosine sind im Pyrogramm durch große, graue Felder (5) hinterlegt. An dieser Stelle werden nacheinander Thymidin und Cytosin in das Reaktionsgemisch injiziert. Aus dem Verhältnis der Signalintensität von Thymidin zu Cytosin wird der Anteil methylierter Cytosine durch die Software errechnet. Dieser Methylierungswert ist in den gelben Feldern oberhalb des Diagramms angegeben (6). Kontrollpunkte zur Überprüfung der Bisulfitkonversion sind durch orangene Balken (7) hinterlegt. Unter der (vereinfachten) Annahme, dass einzelne Cytosine außerhalb von CpG-Dinukleotiden stets unmethyliert sind und daher durch die vorangegangene Bisulfitkonversion vollständig zu Thymidin umgewandelt wurden, werden an diesen Kontrollpunkten Cytosine injiziert. Wird dabei ein Lichtsignal gemessen, spricht dies für eine unvollständige Bisulfitkonversion. Modifiziert nach Ammerpohl et al. 2016.

2.2.4 Statistische Auswertung der Bisulfit-Pyrosequenzierung

Zur Validierung der mittels HM450K BC erhobenen Daten wurden die Methylierungsdaten aus der BSPS mit den Werten des HM450K BC verglichen. Hierzu erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Darüber hinaus erfolgte eine Darstellung in Form eines Bland-Altman-Plots. Zur statistischen Berechnung und Erstellung der Diagramme wurde das Statistikprogramm SPSS verwendet.

Zur Auswertung der Methylierungswerte aus der Bisulfit-Pyrosequenzierung erfolgte zunächst ein Gruppenvergleich der Proben. Um die Ergebnisse auf signifikante Unterschiede zwischen Tumor- und Lungengewebe zu überprüfen, wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Proben angewandt. Zur Auswertung des Methylierungsstatus der CpG-Loci aus *TWIST1* erfolgte die Anwendung des Wilcoxon-Tests jeweils getrennt für ADCs bzw. SQCCs (Vergleich mit den Werten im Lungengewebe desselben Patienten). Bei der Auswertung der Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe per se wurde der Methylierungsstatus aller untersuchter Proben aus Tumorgewebe (ADCs und SQCCs) mit den Werten im Lungengewebe derselben Patienten verglichen. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ definiert und nicht für multiples Testen korrigiert. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt.

Darüber hinaus wurde für alle Assays ein direkter Vergleich der Methylierungswerte aus ADCs und SQCCs durchgeführt. In diesem Sinne erfolgte eine Berechnung des Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS.

Eine graphische Auswertung der Daten erfolgte in Form von Box-Whisker-Plots, die mithilfe von SPSS erstellt wurden. Die Enden der Box zeigen die 25. bzw. 75. Perzentile an. Die Höhe der Box entspricht also dem Interquartilsabstand (IQR). Über die Whiskers wird der Messwert angezeigt, der gerade noch innerhalb des 1,5-fachen IQR liegt. Als Ausreißer sind Messwerte mit einem 1,5- bis 3-fachen IQR definiert. Extreme Werte liegen außerhalb des 3-fachen IQR.

Darüber hinaus wurde das Online Tool BiQ Analyzer zur Erstellung von Lollipop-Diagrammen verwendet (Bock et al. 2005), die anschließend mit Paint (Version 1607) entsprechend des Methylierungsgrades eingefärbt wurden.

Ein weiterer Ansatz zur Datenanalyse diente der individuellen Auswertung der Einzelproben im Hinblick auf Hypo- bzw. Hypermethylierung. Um Methylierungsgrenzwerte zu definieren, wurden zunächst die Mittelwerte der Proben aus Lungengewebe, sowie ihre Standardabweichungen ermittelt. Per definitionem lag in dieser Arbeit eine Hypo- bzw. Hypermethylierung bei einer Abweichung von mehr als drei Standardabweichungen vom Mittelwert vor.

Die Methylierungsdaten wurden darüber hinaus auf eine Korrelation mit klinischen Parametern überprüft. Die Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten erfolgte mithilfe von SPSS.

2.2.5 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Etablierung einer methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR), um die Darstellbarkeit des Methylierungsgrades von Bronchialkarzinomen in einem weniger zeit- und kostenintensiven Verfahren zu erproben. Hierfür wurden neue Primer für Assay 3 *cg1810* und Assay 4 *MEIS1* zur Unterscheidung von Tumor- und Lungengewebe, sowie für Sequenz 2 und Sequenz 3 aus *TWIST1* zur Unterscheidung von ADCs und SQCCs entwickelt. Die Auswahl der CpGs erfolgte basierend auf den Ergebnissen der Pyrosequenzierungen. Es wurden jene Assays ausgewählt, die sowohl qualitativ hochwertige Pyrogramme lieferten, als auch in der statistischen Auswertung signifikante Unterschiede zwischen den zu differenzierenden Gruppen aufwiesen.

Das Prinzip der MS-PCR beruht auf dem Einsatz von Primerpaaren, die in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus der Cytosine binden. Das bedeutet, dass sie entweder die unmethylierte oder die methylierte DNA erkennen und daher zu einer methylierungsspezifischen Amplifikation führen. Vorab ist eine Bisulfitbehandlung der DNA nötig, sodass unmethylierte Cytosine zu Thymidin konvertiert werden und durch spezifische Primer von methylierten Cytosinen zu unterscheiden sind. Zur Untersuchung eines CpGs sind zwei Primerpaare notwendig, von denen eines unmethylierte (U-Primer/ U-PCR) und eines methylierte Sequenzen (M-Primer/ M-PCR) amplifiziert. Im Gegensatz zur Pyrosequenzierung liegt das zu analysierende CpG hierbei nicht innerhalb der amplifizierten PCR-Sequenz, sondern in den Primern selbst. Um eine

möglichst spezifische Bindung der Primer zu erzielen, sollte das CpG möglichst nah am 3'-Ende der Primer gelegen sein, optimaler Weise in den letzten drei Basen (Derks et al. 2004; Ku et al. 2011). Die Sequenz der M-Primer wird dabei so designed, dass sie an potenziell methylierten Cytosin-Loci an Cytosin und somit ursprünglich methylierte Cytosine bindet, während die Sequenz der U-Primer an denselben Stellen stattdessen Thymidine bindet und somit ursprünglich unmethylierte Sequenzen erkennt. Die Schmelztemperaturen der Primer einer Reaktion sollten möglichst ähnlich sein und vorzugsweise ≥ 55 °C betragen (Ku et al. 2011). Da das Primerpaar für methylierte DNA zwangsläufig einen höheren Cytosin-Gehalt und daher eine höhere Schmelztemperatur hat, sind unterschiedliche Primerlängen von U- bzw. M-Primern in der Regel nicht zu vermeiden (Ku et al. 2011). Um die Spezifität der Primer für bisulfitkonvertierte DNA zu erhöhen, kann es sinnvoll sein, dass auch Nicht-CpG-Cytosine in der nicht-bisulfitkonvertierten DNA-Sequenz enthalten sind (Derks et al. 2004).

Über das Online Tool Bisulfite Primer Seeker 12S wurde die bisulfitkonvertierte Sequenz zur Entwicklung der Primer ermittelt. Mithilfe des Online Tools „BiSearch: Primer Design and Search Tool“ wurden die manuell erstellten Primer auf ihre Spezifität überprüft (Arányi et al. 2006; Tusnády et al. 2005). Das Online-Tool „Oligo Calc“ diente zur Ermittlung der Schmelztemperaturen (Kibbe 2007). Die Primeroptimierung erfolgte erneut mit dem PyroMark Kit von Qiagen und wurde wie in Kapitel 2.2.3.1 für die Pyrosequenzierung beschrieben durchgeführt. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die optimierten PCR-Bedingungen.

Tabelle 11: Optimierte PCR-Bedingungen der Primer für methylierte bzw. unmethylierte DNA in der MS-PCR

CpG	Assay	Annealing-Temperatur	
		Methyliert	Unmethyliert
cg18103859	Assay 3 cg1810	67 °C	63 °C
cg05877497	Assay 4 <i>MEIS1</i>	67 °C	64 °C
cg18103859	<i>TWIST1</i> Sequenz 2	66 °C	65 °C
cg17839237	<i>TWIST1</i> Sequenz 3	72 °C	64 °C

3 Ergebnisse

Die vorliegende Studie wurde auf der Basis von Daten entwickelt, die mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip (kurz: HM450K BC) am Institut für Humangenetik, UKSH Campus Kiel gewonnen wurden. Diese Vorgängerstudien führten zur Generierung der Hypothese, dass verschiedene Lungenkarzinomentitäten differenzielle Methylierungsmuster u.a. im Gen *TWIST1* zeigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Daten mittels weiterer Methoden zu validieren. Dazu wurden die BSPS und die MS-PCR ausgewählt. Sechs Assays dienten der Analyse des Methylierungsstatus im Bereich von *TWIST1* mittels BSPS. Sie deckten insgesamt 15 CpG-Dinukleotide ab.

Darüber hinaus konnten anhand der Daten, die mittels HM450K BC generiert wurden, weitere CpGs identifiziert werden, die in allen Lungenkarzinomentitäten eine veränderte Methylierung aufwiesen. Diese Ergebnisse sollten in einem zweiten Schritt ebenfalls mittels Pyrosequenzierung validiert werden. Hierfür kamen sieben weitere Assays zur Analyse von insgesamt 28 CpG-Dinukleotiden zum Einsatz. Die PCR-Bedingungen zur Analyse dieser 28 CpG-Dinukleotide wurden im Rahmen der Dissertation von Dr. rer. nat. Swetlana Scheufele optimiert und wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zuletzt wurde für ausgewählte Assays eine MS-PCR entwickelt.

3.1 Etablierung der Bisulfit-Pyrosequenzierungs-Assays

In diesem Kapitel wird zunächst die Etablierung der Assays zur Pyrosequenzierung am Beispiel von *TWIST1* beschrieben. Das Vorgehen ist bereits in Kapitel 2.2.3 dargestellt worden, sodass die Konzentration in diesem Kapitel auf den erzielten Resultaten liegt.

Abbildung 7 stellt die Optimierung der Annealing-Temperaturen (T_a) und $MgCl_2$ -Gehalte dar. Für Sequenz 1 *TWIST1* (Abbildung 7A) ist die Variation der T_a bei einheitlicher Zusammensetzung des Reaktionsansatzes abgebildet. Der Reaktionsansatz erfolgte jeweils mit den Kontroll-DNAs (methyliert = MK, unmethyliert = WGA), der nicht konvertierten genomischen DNA (gDNA) und einer Negativkontrolle mit ddH₂O statt DNA. Die PCR wurde initial bei drei verschiedenen T_a s (55 °C/ 60 °C/ 65 °C) durchgeführt. Bei Durchführung der PCR mit einer T_a von 55 °C ließ sich gelelektrophoretisch eine spezifische Amplifikation der MK und WGA mit kräftigen Banden der erwarteten Produktgröße (364 bp) nachweisen. Es fand jedoch auch eine unspezifische Amplifikation der nicht-bisulfitkonvertierten DNA (gDNA) statt, sodass in der Gelelektrophorese eine unspezifische Bande sichtbar war (siehe Abbildung 7A, markiert durch *). Durch Erhöhung der T_a auf 60 °C konnte die Spezifität der Polymerase erhöht werden, sodass keine Amplifikation der gDNA stattfand. Die PCR der Kontroll-DNAs wurde gleichzeitig nicht beeinträchtigt. Bei Durchführung der PCR bei 65 °C fand keine Amplifikation der Kontroll-DNAs statt. Somit betrug die optimierte Annealing-Temperatur für die Sequenz 1 aus *TWIST1* 60 °C.

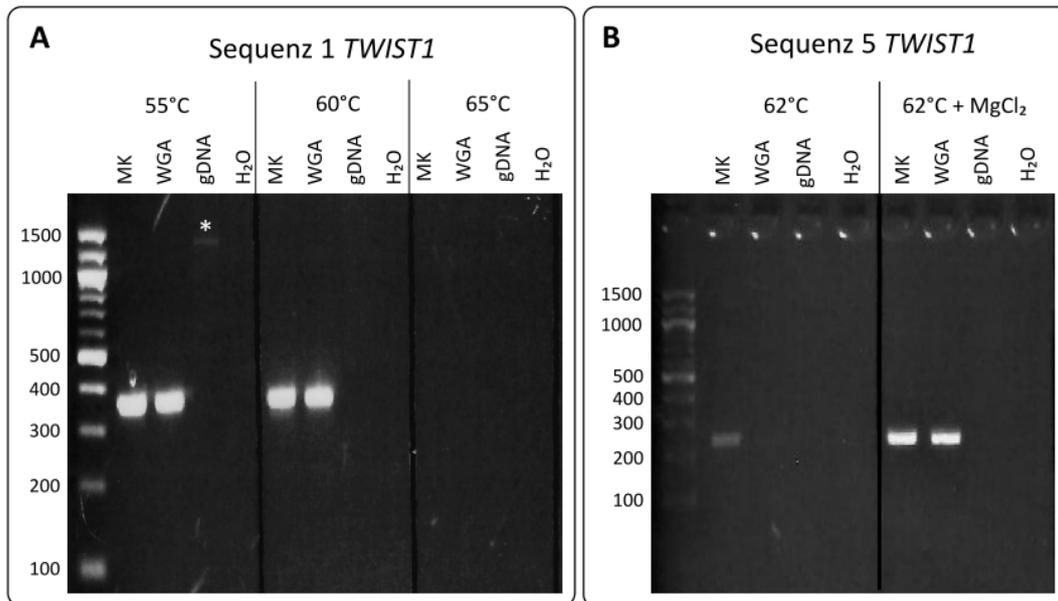


Abbildung 7: Optimierung der PCR-Bedingungen für Sequenz 1 (A) und Sequenz 5 (B) aus *TWIST1* an Kontrollen
A Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte nach Durchführung der PCR bei 55°C/ 60°C/ 65°C Anhealing-Temperatur (T_a) bei einheitlicher Zusammensetzung des Reaktionsansatzes. Bei einer T_a von 55°C findet eine unspezifische Amplifikation der nicht-bisulfitkonvertierten Kontrolle (gDNA, markiert durch *) statt. Durch Erhöhung der T_a auf 60°C kann die Spezifität der DNA-Polymerase erhöht werden, sodass bei erhaltener Amplifikation der methylierten bzw. unmethylierten Kontroll-DNA (MK und WGA) keine Amplifikation der gDNA mehr stattfindet. Bei 65°C findet keine Amplifikation der Kontroll-DNAs mehr statt.
B Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration im Reaktionsansatz bei gleicher T_a (62°C) für Sequenz 5. Durch Steigerung der $MgCl_2$ -Konzentration wird die Produktivität der Polymerase im Reaktionsansatz erhöht, sodass sich gelelektrophoretisch kräftige, spezifische Banden für die Kontroll-DNAs nachweisen lassen.
 MK = methylierte Kontrolle, WGA = unmethylierte Kontrolle, gDNA = nicht-bisulfitkonvertierte DNA-Kontrolle, H_2O = destilliertes Wasser (Negativkontrolle).

Für Sequenz 5 *TWIST1* wurde die $MgCl_2$ -Konzentration im Reaktionsansatz bei gleicher T_a (62 °C) durch zusätzliche Zugabe von $MgCl_2$ zum Mastermix des PCR-Kits erhöht (siehe Abbildung 7B). Im Reaktionsansatz mit den Standardreaktionsbedingungen des verwendeten Kits erfolgte eine geringe Amplifikation der MK, jedoch keine Amplifikation der WGA. Durch Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration im Reaktionsansatz konnte die Produktivität der DNA-Polymerase gesteigert werden, sodass sich gelelektrophoretisch eine deutliche Zunahme der Bandenintensität nachweisen ließ (siehe Abbildung 7B). Eine unspezifische Amplifikation war nicht nachweisbar.

Insgesamt wurden 6 Sequenzen aus *TWIST1* mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung untersucht. Initial war auch für das CpG mit der Target ID cg10420952 gemäß HM450K BC versucht worden, Pyrosequenzierungsprimer zu erstellen. Aufgrund der sehr hohen Dichte an CpGs in der Sequenz sowie einer hohen Anzahl repetitiver Nukleotidabfolgen, wurde jedoch von der verwendeten Software (PyroMark Assay Design 2.0) die Fehlermeldung ausgegeben, dass für die Sequenz kein Assaydesign möglich sei. Weiterhin waren auch für das CpG mit der Target ID cg26818735 gemäß HM450K BC Pyrosequenzierungsprimer erstellt worden (Twist_6_Fw/Rv/Seq, siehe Tabelle 7). Für die Primer konnten jedoch keine PCR-Bedingungen eingestellt werden, die dazu führen, dass ein spezifisches PCR-Produkt entsteht (siehe Abbildung 8).

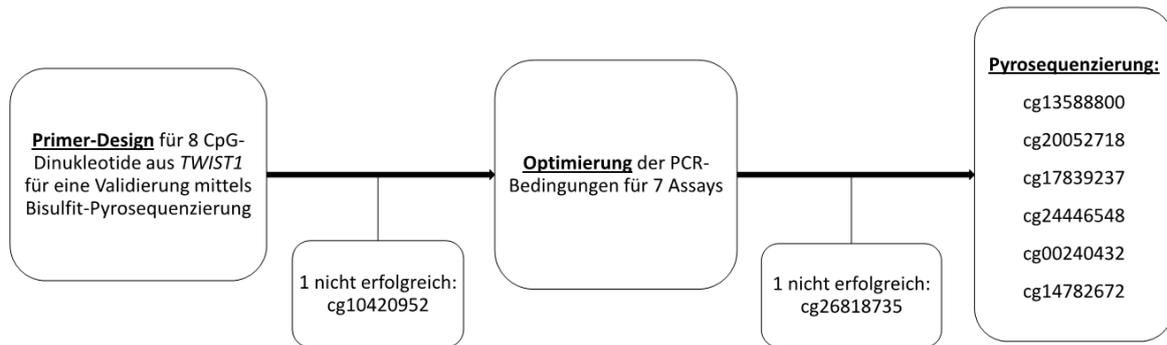


Abbildung 8: Ablauf der Assayoptimierung für die Sequenzen aus *TWIST1*

Angabe der CpG target ID gemäß HumanMethylation450K BeadChip.

Neben den Primern zur BSPS der Sequenzen aus *TWIST1* kamen weitere, bereits optimierte Primer zum Einsatz. Sie wurden im Rahmen der Dissertation von Dr. rer. nat. Swetlana Scheufele erstellt und wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zu den Primern aus *TWIST1* sollten sie nicht zwischen ADCs und SQCCs differenzieren, sondern wurden für jene CpGs entwickelt, die in allen NSCLCs ein verändertes Methylierungsmuster in den Voruntersuchungen mittels HM450K BC zeigten. Die optimierten Primerbedingungen, die für die anschließende Bisulfitpyrosequenzierung verwendet wurden, sind Tabelle 10 in Kapitel 2.2.3 des Methodenteils zu entnehmen.

Nach der Optimierung der Pyrosequenzierungsassays wurde die Sequenzierung der Proben (siehe Kapitel 2.1.1 Tabelle 1 und Tabelle 2) durchgeführt. Die folgenden Kapitel befassen sich mit der Auswertung der erhobenen Daten sowie dem Abgleich mit den Ergebnissen des zuvor durchgeführten HM450K BC.

3.2 Methylierungswerte aus der Pyrosequenzierung der OP-Präparate korrelieren mit den Ergebnissen aus Infinium HumanMethylation450K BeadChip

Zur Validierung der Methylierungsdaten des HM450K BC wurde eine Pyrosequenzierung von DNA aus insgesamt 20 Tumorresektaten sowie dem zugehörigen tumorfreien Lungengewebe ($n = 40$) durchgeführt. Die Ergebnisse aus der Pyrosequenzierung wurden mit den vorhandenen Daten aus der Messung mittels HM450K BC verglichen (Vergleich von 14 CpG-Loci). In der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab sich eine signifikante Korrelation ($R = 0,890$; $p < 0,01$; siehe Abbildung 9). Die Darstellung als Bland-Altman-Plot lässt eine gute Korrelation im niedrigen Methylierungsbereich erkennen, insbesondere im mittleren Methylierungsbereich liegt jedoch eine breitere Streuung der Messwerte vor.

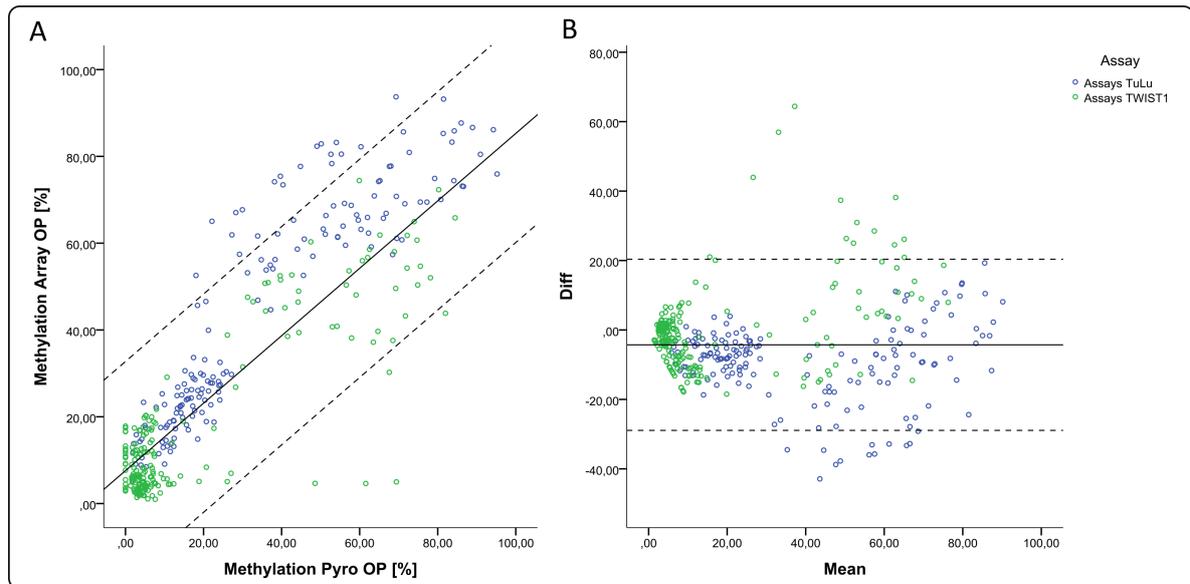


Abbildung 9: Vergleich der Messwerte aus HumanMethylation450K Bead Chip (HM450K BC) und Bisulfitypyrosequenzierung (BSPS)

A Dargestellt ist ein Punktdiagramm der Methylierungswerte derselben Proben aus der BSPS (x-Achse) und der β -Werte aus der Analyse mittels HM450K BC (y-Achse). Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der beiden Messungen mit einem Pearsons Korrelationskoeffizient von $R=0,890$, $p<0,01$.

B Korrespondierender Bland-Altman-Plot der Messungen. Abweichungen der Methylierungswerte zeigen sich insbesondere im mittleren Methylierungsbereich. Die Messwerte der CpGs zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe (Assays TuLu) sind blau abgebildet, die Messwerte der CpGs im *TWIST1*-Gen sind grün dargestellt.

3.3 DNA aus OP-Präparaten von Adenokarzinomen zeigt eine Hypermethylierung im Gen *TWIST1*

Das folgende Kapitel stellt die weitere Auswertung der Ergebnisse der BSPS von *TWIST1* dar. Insgesamt wurden sechs Sequenzabschnitte aus *TWIST1* in DNA-Proben aus OP-Präparaten von Lungenkarzinompatienten untersucht. Da die Auswertung des HM450K BC auf eine entitätspezifische Methylierung hinwies, wurde DNA aus acht ADCs und neun SQCCs sowie DNA aus nicht-malignem Lungengewebe derselben Patienten als Kontrollgruppe verwendet. Insgesamt wurden 15 CpG-Dinukleotide untersucht. Abbildung 10 schafft einen Überblick über die Sequenzen mit ihren einzelnen CpG-Positionen in Form eines Lollipop-Diagramms. Der Methylierungsgrad der Einzelpositionen in Abhängigkeit vom Gewebetyp ist farblich gekennzeichnet.

Sowohl die Sequenz 4.1 als auch die Sequenz 4.2 enthielten das cg00240432, dessen Methylierungsgrad bereits mittels HM450K BC ermittelt worden war. Da die Sequenz 4.2 keine zusätzlichen CpG-Dinukleotide im Vergleich mit der Sequenz 4.1 enthielt, wird in den folgenden Kapiteln bevorzugt die Sequenz 4.1 dargestellt. Zudem lieferte die Sequenz 4.1 Pyrogramme einer höheren Qualität. Hierzu siehe auch Kapitel 2.2.3.4 der Methoden sowie Kapitel 3.3.1.

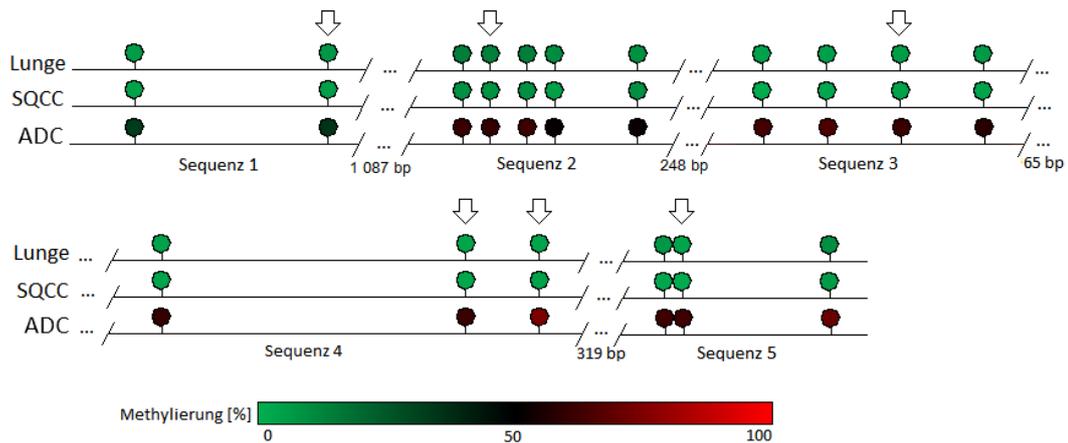


Abbildung 10: Darstellung des Methylierungsgrades im *TWIST1*-Gen als Lollipop-Diagramm

Ergebnisse aus der Bisulfitpyrosequenzierung (BSPS) der OP-Präparate aus Tumor- und Lungengewebe. Die Kreise repräsentieren die untersuchten CpG-Dinukleotide und sind entsprechend des Mittelwertes der Methylierung aus allen Proben der jeweiligen Gruppe (Lungengewebe, Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome) eingefärbt. Die Pfeilspitzen weisen auf die CpGs, die in Vorgängerstudien mittels HM450K BC untersucht wurden.

Zur Auswertung des DNA-Methylierungsstatus der beiden Karzinomentitäten wurde ein Gruppenvergleich mit dem tumorfreien Lungengewebe durchgeführt. Hierfür wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Proben angewandt. Die Teststatistiken wurden sowohl auf der Grundlage der Mittelwerte aus allen CpGs des jeweiligen Assays als auch für die jeweiligen Einzelpositionen berechnet.

Für die Methylierung der Adenokarzinome konnte an allen Positionen der verwendeten Assays eine signifikante Abweichung ($p < 0,05$) von der Methylierung des Lungengewebes nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11A). Die Differenz des Methylierungsgrades zwischen ADCs und dem entsprechenden Lungengewebe betrug 30 – 60 % (vgl. Abbildung 11B). Einzelheiten wie die genauen Methylierungswerte sowie die statistischen Berechnungen sind in Tabelle 16 im Anhang zusammengefasst.

DNA aus SQCCs zeigte hingegen tendenziell eine geringere Methylierung im Vergleich mit DNA aus Lungengewebe. Die Differenz betrug jedoch meist nur wenige Prozent (zwischen 0,5 % und 6 %). Somit ergab sich im Wilcoxon-Test auch nur an einzelnen CpGs eine signifikante Abweichung vom Lungengewebe. Eine signifikante Abweichung lag für Positionen 1 und 4 der Sequenz 2 ($p = 0,028$; $p = 0,036$), Position 1,2 und 4 der Sequenz 3 ($p = 0,008$ bzw. $p = 0,012$) und Pos. 1 und 3 der Sequenz 5 ($p = 0,038$, $p = 0,015$) vor (siehe Tabelle 16 im Anhang).

Darüber hinaus wurde ein direkter Vergleich der DNA-Methylierung von ADCs und SQCCs durch den Einsatz des Mann-Whitney-U-Tests für ungepaarte Stichproben durchgeführt. An allen untersuchten CpG-Loci zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tumorentitäten (siehe Tabelle 16 im Anhang). Abbildung 11A zeigt eine grafische Darstellung der mittleren Methylierung in den untersuchten DNA-Sequenzen in Abhängigkeit vom Gewebetyp in Form von Box Plots.

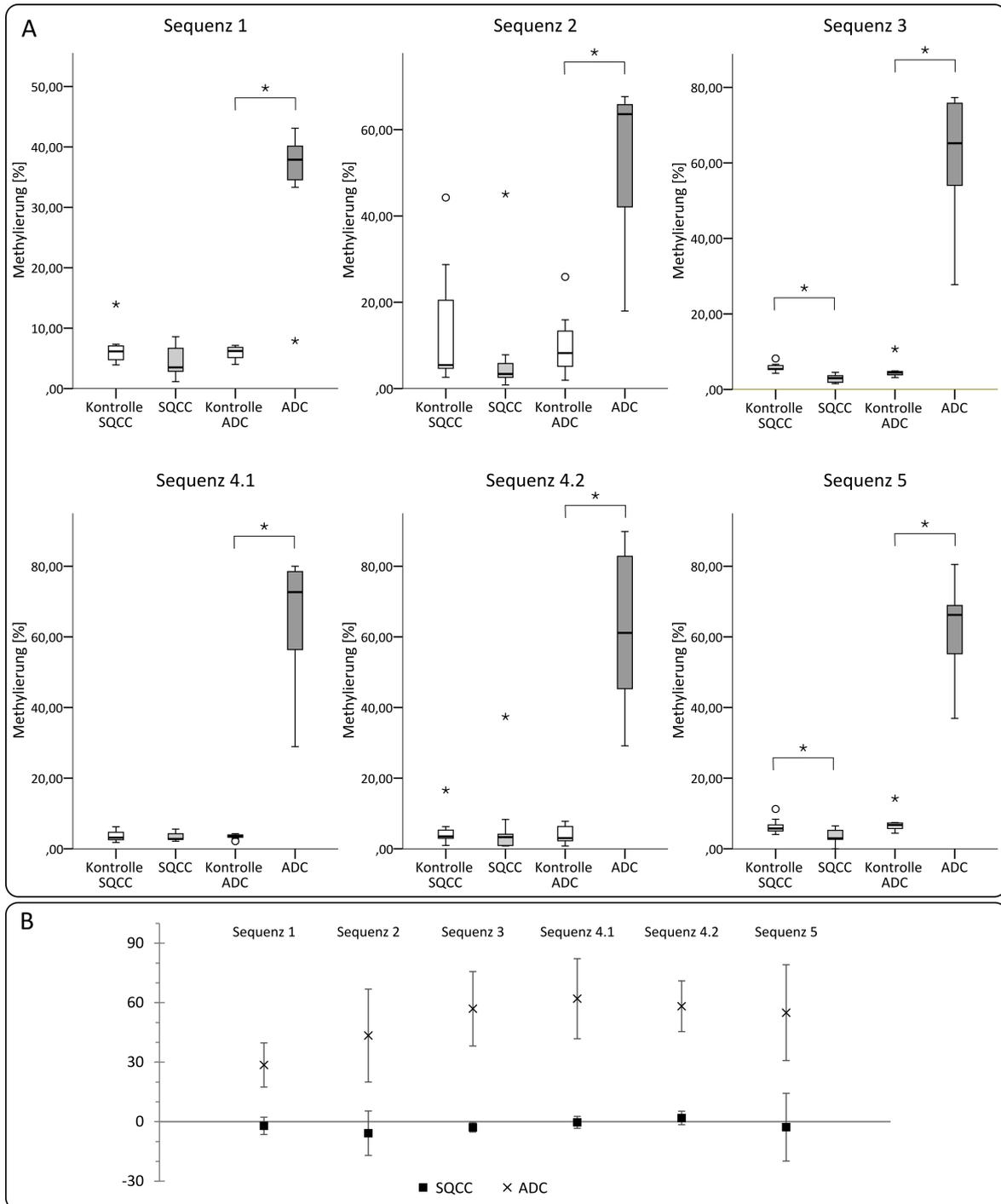


Abbildung 11: A Darstellung der Methylierung im Gen *TWIST1* als Box Plot: Vergleich von Lungengewebe, Adeno- und Plattenepithelkarzinom

Ergebnisse der Bisufit-Pyrosequenzierung. Analysiert wurden DNA-Proben aus OP-Präparaten von 17 Patienten, jeweils aus Lungen- und Tumorgewebe, hierunter neun Plattenepithelkarzinome und acht Adenokarzinome. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Methylierungsgrades aus allen Positionen einer Sequenz. Die Enden der Box zeigen die 25./ 75. Perzentile an, die Linie in der Box den Median; ○ = Ausreißer; * = extreme Werte. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$) markiert mit *.

B Differenz der Methylierung zwischen Tumor- und Lungengewebe in Abhängigkeit von der Tumorentität

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Differenz zwischen Tumor- und Lungengewebe. Die Differenz wurde aus den Methylierungswerten von Tumor- und Lungengewebe desselben Patienten für die Einzelpositionen der jeweiligen Assays errechnet. Die Adenokarzinome zeigten im Vergleich mit dem Lungengewebe gesteigerte Methylierung. Die Methylierung der Plattenepithelkarzinome war im Gegensatz dazu eher vermindert. SQCC = Plattenepithelkarzinom, ADC = Adenokarzinom.

Zur weiteren Analyse der Daten wurde für die einzelnen Assays jeweils ein Normalbereich der Methylierung anhand der Messwerte im Lungengewebe festgelegt. Hierzu wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aller Proben aus Lungengewebe ($n = 17$) gemittelt über alle Positionen des jeweiligen Assays berechnet. Als Hypo- bzw. Hypermethylierung wurde eine Abweichung von > 3 Standardabweichungen vom Mittelwert definiert (siehe Tabelle 12). Da die Methylierung im Lungengewebe allseits niedrig war, wurde für alle Assays ein negativer Wert als Grenzwert zur Hypomethylierung errechnet. Anhand der genannten Kriterien war eine Hypomethylierung von *TWIST1* somit formal nicht möglich. Basierend auf den errechneten Normalwerten wurden die Proben auf Hypermethylierung untersucht. Abbildung 12 stellt diese Auswertung im Hinblick auf Hypermethylierung der einzelnen Proben in einer farblich markierten Übersicht dar.

Zusammengefasst konnte anhand der definierten Normalbereiche eine Hypermethylierung für einen Großteil der DNA-Proben aus ADCs nachgewiesen werden. Im Einzelnen zeigte sich jedoch für zwei Proben eine normwertige Methylierung an mehreren CpG-Positionen (T10 und T16). Dies war insbesondere in der Sequenz 2 der Fall. Für diese Sequenz hatte sich insgesamt eine breitere Streuung des Methylierungsgrades in der DNA aus tumorfreiem Lungengewebe gezeigt (siehe Abbildung 11A, Sequenz 2). Die Grenze zur Hypermethylierung wurde als $> 49,6\%$ festgelegt und lag somit vergleichsweise hoch (vergleiche Tabelle 12).

Weiterhin wurden einzelne CpGs aus DNA von Lungengewebe bzw. SQCCs als hypermethyliert klassifiziert. In der Sequenz 2 betrug die Methylierung einer Probe aus Lungengewebe (L4) bis zu 60% . In der Sequenz 4.2 zeigte die DNA aus einem SQCC (T7) und aus Lungengewebe (L2) mit $69,4\%$ bzw. $30,4\%$ ebenfalls eine deutliche Abweichung vom definierten Normalbereich ($< 20,8\%$). Im Gegensatz dazu lag die Methylierung der übrigen als hypermethyliert klassifizierten Proben (siehe Abbildung 12) nur leicht oberhalb des definierten Normalbereiches (bis 2%).

Tabelle 12: Methylierungsgrad der verschiedenen Gewebearten im Gen *TWIST1* und der berechnete Normalbereich
Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) wurden aus allen Positionen des jeweiligen Assays errechnet. Hypo- bzw. Hypermethylierung wurden als Abweichung von > 3 SD vom MW des Lungengewebes definiert.

<i>TWIST1</i>	Methylierungsgrad [%]			Hypo- methylierung (MW[Lunge] - 3s)	Hyper- methylierung (MW[Lunge] + 3s)
	ADC ($n=8$) MW (SD)	SQCC ($n=9$) MW (SD)	Lungengewebe ($n=17$) MW (SD)		
Sequenz 1	34,5 (11,0)	4,5 (3,0)	6,3 (2,6)	-1,7	14,2
Sequenz 2	53,6 (18,8)	8,3 (13,5)	12,3 (12,5)	-25,2	49,6
Sequenz 3	61,9 (17,0)	2,9 (1,9)	5,4 (2,4)	-1,8	12,6
Sequenz 4.1	65,5 (20,1)	3,4 (2,2)	3,6 (2,0)	-2,4	9,7
Sequenz 4.2	62,2 (24,7)	6,7 (15,4)	4,4 (5,5)	-11,9	20,8
Sequenz 5	62,3 (14,3)	3,6 (3,3)	6,8 (4,2)	-5,8	19,4

		SQCC									ADC							Lungengewebe																	
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17
Seq. 1	M	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C1	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
Sequenz 2	M	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C1	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C2	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C3	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C4	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
Sequenz 3	M	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C1	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C2	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C3	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
Sequenz 4.1	M	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C1	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C2	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
Sequenz 4.2	M	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C1	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C2	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
Sequenz 5	M	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C1	[Grey]									[Red]							[Grey]																	
	C2	[Grey]									[Red]							[Grey]																	

Abbildung 12: Individuelle Auswertung der Proben im Hinblick auf Hypermethylierung im Gen *TWIST1*

Ergebnisse aus der Pyrosequenzierung von DNA aus Tumor- und Lungenproben von 16 Patienten. Eine Spalte repräsentiert eine Probe. Die Zeilen bilden die einzelnen CpG-Dinukleotide ab, die erste Zeile einer Sequenz deren Mittelwert (M). Das CpG aus den vorangegangenen Infinium HumanMethylation450K BeadChip-Analysen ist gelb markiert. Grau= Methylierung innerhalb des Normalbereichs, rot= Hypermethylierung. ADC= Adenokarzinom, SQCC= Plattenepithelkarzinom, Seq.= Sequenz, M= Mittelwert auf allen Positionen des Sequenz, C1-C5= Cytosin-Loci der Sequenz, T1-T17= DNA-Proben aus Tumorgewebe, L1-L17= DNA-Proben aus Lungengewebe.

3.3.1 Vergleich von Sequenz 4.1 und Sequenz 4.2

Die Sequenzen 4.1 und 4.2 deckten teilweise den gleichen Sequenzbereich aus *TWIST1* ab. Beide Sequenzen enthielten cg09799658 (jeweils Position 1 des BSPS-Assays) sowie cg00240432 (jeweils Position 2), welches bereits mittels HM450K BC untersucht wurde. Die Sequenz 4.1 enthielt darüber hinaus auch cg24446548 (Position 3), für das ebenfalls Methylierungsdaten aus der Untersuchung mittels HM450K BC vorlagen.

Der Sequenzierprimer der Sequenz 4.2 lag etwas weiter von dem ersten enthaltenen CpG-Locus entfernt, wobei die Sequenz mit einem Homopolymer aus vier Cytosinen begann. Dies führte letztlich zu einer schlechteren Qualität der Pyrogramme, da sich bereits an dieser Position leichte Abweichungen zwischen der berechneten und der gemessenen Signalintensität ergaben, sodass häufig ein Warning durch die Pyrosequenzierungs-Software ausgegeben wurde. Dieses Phänomen stellt ein häufiges Problem in der Auswertung sequenzbasierter DNA-Methylierungsanalysen dar (Ledergerber und Dessimoz 2011; Quinlan et al. 2008). In Sequenz 4.2 lag somit bereits zu Beginn der Sequenz eine mögliche Fehlerquelle vor, sodass die Sequenz 4.1 als sicherer bewertet wurde. Darüber hinaus betrug die Signalintensität je Einzelnukleotid

in der Sequenz 4.1 etwa 40-50 arbiträre Einheiten, während sie in der Sequenz 4.2 nur bei 20-25 arbiträren Einheiten lag. Auch dies spricht für eine höhere Qualität der Pyrosequenzierung der Sequenz 4.1.

Zum ausführlicheren Vergleich der Sequenzen wurde die Korrelation nach Pearson für cg00240432 mit den Werten aus dem HM450K BC für die Ergebnisse aus Sequenz 4.1 und 4.2 getrennt berechnet. Für Sequenz 4.1 ergab sich ein Wert von $R = 0,961$ mit einer signifikanten Korrelation ($p < 0,000001$). Die Korrelation in der Sequenz 4.2 betrug $R = 0,835$ ($p < 0,000001$). Beide Sequenzen zeigten für cg00240432 also eine signifikante Korrelation mit den Ergebnissen des HM450K BC. Für Sequenz 4.1 lag R hierbei näher an 1 als für Sequenz 4.2.

In der statistischen Auswertung der erhobenen Methylierungsdaten für Sequenz 4.1 und 4.2 ließ sich in beiden Sequenzen ein signifikanter Unterschied des Methylierungsgrades zwischen ADC und Lungengewebe (Wilcoxon-Test in beiden Sequenzen: $p = 0,012$) sowie zwischen ADC und SQCC nachweisen (Mann-Whitney-U-Test: p zwischen 0,002 und 0,00008; siehe Tabelle 16 im Anhang).

Aufgrund der oben genannten Vorteile der Sequenz 4.1 wurde diese für die weiteren Untersuchungen der Paired Biopsies herangezogen.

3.3.2 Korrelation der Methylierungsdaten mit klinischen Parametern

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der DNA-Methylierung von klinischen Parametern wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.

Für den Methylierungszustand der DNA aus Lungengewebe war keine Korrelation mit den klinischen Parametern Alter oder Geschlecht der Patienten nachweisbar (Alter: Spearman $\rho = 0,118$; $p = 0,237$; Geschlecht: Spearman $\rho = -0,151$; $p = 0,131$).

Der Methylierungszustand der DNA aus Tumorgewebe wurde mit den Parametern der TNM-Klassifikation aus dem histopathologischen Befund der Tumoren korreliert. Dabei zeigte sich eine Korrelation der Eindringtiefe (pT-Stadium) und des Nodalstatus (pN-Stadium) mit der Methylierung (pT: Spearman $\rho = 0,239$; $p = 0,015$; pN: Spearman $\rho = 0,337$; $p = 0,001$). Einzelheiten der Berechnungen sind Tabelle 18 im Anhang zu entnehmen.

3.4 OP-Präparate aus Lungenkarzinomen zeigen eine Hypermethylierung in verschiedenen Zielgenen

Die Untersuchung der Sequenzen aus *TWIST1* mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bestätigte, dass ADCs im Gegensatz zu SQCCs eine Hypermethylierung im *TWIST1*-Locus aufweisen. In den vorhergehenden Studien mit dem HM450K BC konnten außerdem CpG-Dinukleotide in verschiedenen Genen identifiziert werden, die sowohl in ADCs als auch in SQCCs eine veränderte Methylierung im Vergleich mit gesundem Lungengewebe zeigten. Um auch diese Ergebnisse zu validieren, kamen sieben weitere Assays zum Einsatz, mit denen insgesamt 28 CpG-Dinukleotide untersucht wurden. Verwendet wurde DNA aus zwölf Tumorresektaten (sieben SQCCs und fünf ADCs) sowie DNA aus dem Lungengewebe derselben Patienten. Analog zur Auswertung des Methylierungsstatus von ADCs und SQCCs wurde ein Gruppenvergleich zwischen Tumor- und Lungengewebe mittels Wilcoxon-Test für gepaarte Proben durchgeführt. Die statistische Auswertung erbrachte den Nachweis, dass alle untersuchten CpG-Dinukleotide ($n = 28$) eine signifikante Abweichung des Methylierungszustands in der Tumor-DNA zeigten ($p < 0,05$, vergleiche Abbildung 13).

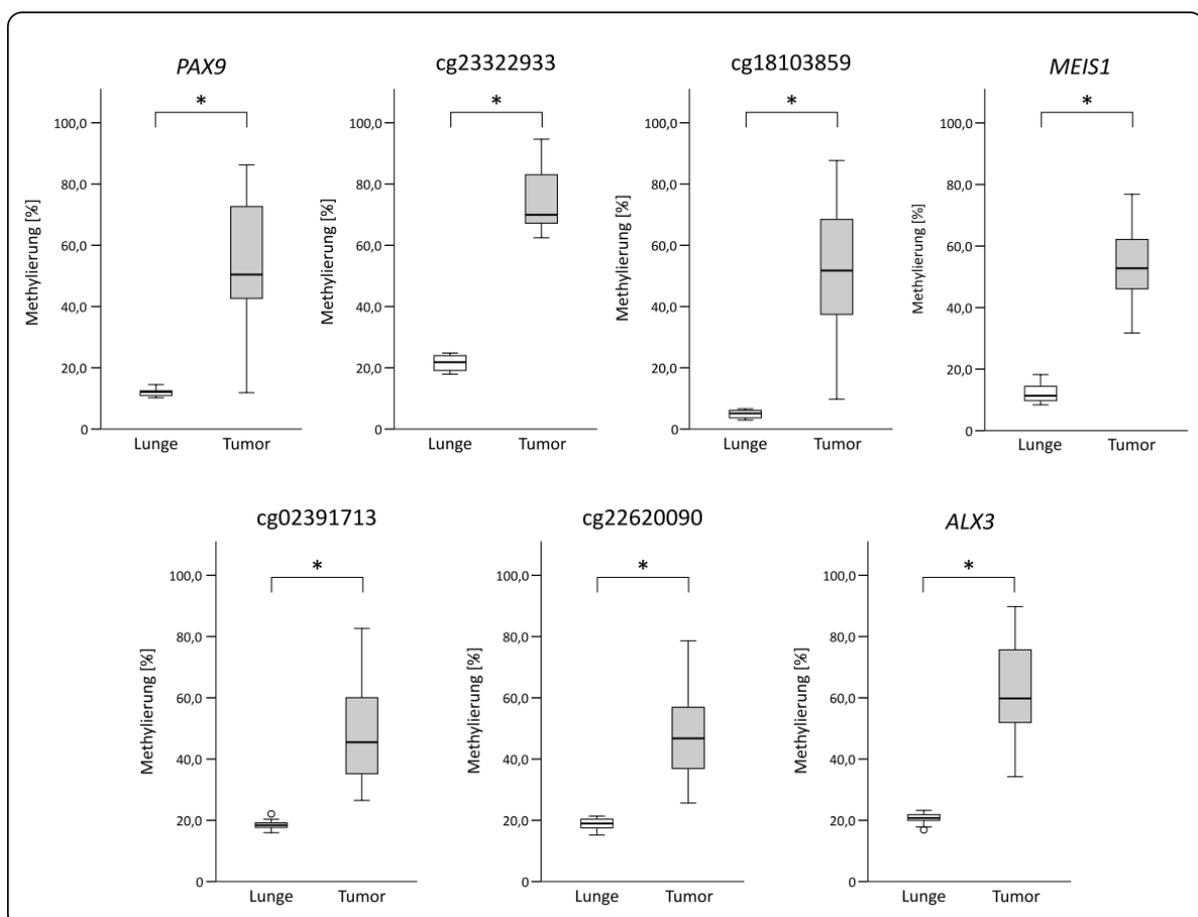


Abbildung 13: Darstellung der Methylierung als Box Plot: Vergleich von Lungen- und Tumorgewebe

Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung. Analysiert wurden DNA-Proben aus OP-Präparaten von 12 Patienten, jeweils aus Lungen- und Tumorgewebe (7 Plattenepithelkarzinome, 5 Adenokarzinome). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Methylierungsgrades aus allen Positionen einer Sequenz. Die Enden der Box zeigen die 25./ 75. Perzentile an, die Linie in der Box den Median; \circ = Ausreißer; * = extreme Werte. Im Wilcoxon-Test für gepaarte Proben zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Methylierungszustand von Tumor- und Lungengewebe in allen untersuchten CpG-Dinukleotiden ($n = 28$; $p < 0,05$), markiert mit *.

Darüber hinaus wurde auch hier ein Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der Methylierungsdaten von ADCs und SQCCs durchgeführt. Darin zeigte sich, dass keine signifikanten Methylierungsunterschiede zwischen den beiden Tumorentitäten vorlagen. Eine Ausnahme hiervon stellten Position 1 und Position 4 des Assays 5 dar ($p = 0,03$). Einzelheiten wie Methylierungswerte und statistische Berechnungen sind in Tabelle 17 im Anhang zusammengefasst.

Zur weiteren Analyse der Proben wurde ebenfalls ein Normalbereich des Methylierungsgrades anhand der Messwerte im Lungengewebe festgelegt. Hierzu wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Methylierung aus allen Positionen der Assays in den Lungenproben ($n = 12$) errechnet. Der Normalbereich wurde als Mittelwert \pm drei Standardabweichungen definiert (siehe Tabelle 13).

Insgesamt wurden nach diesem Vorgehen fast alle DNA-Proben aus Tumorgewebe als hypermethyliert klassifiziert (siehe Abbildung 14). Einige Proben ($n = 6$) zeigten in einzelnen Sequenzen eine normwertige Methylierung. Bei den normwertig methylierten Proben handelte es sich vornehmlich um SQCCs ($n = 5$). Die Tumorprobe T1 (SQCC, pT2b) wies in der gesamten Sequenz aus *PAX9* sowie für zwei CpGs aus *ALX3* eine normwertige Methylierung auf. Auch die Tumorprobe T2 (SQCC) wurde in der Sequenz aus *ALX3* als normalmethyliert klassifiziert (MW = 36,1 %). Die Tumorprobe T7 (SQCC) zeigte sowohl in der gesamten Sequenz um cg02391713 als auch in der Sequenz um cg22620090 keine Hypermethylierung (MW = 26,5 % bzw. MW = 25,6 %). Drei weitere Tumorproben (T6 = SQCC; T8 = SQCC; T10 = ADC) waren in denselben Sequenzen teilweise normwertig methyliert (zwischen 17,2 % und 28,3 %). Für die DNA aus Lungengewebe ergab sich keine Abweichung vom Normalbereich.

Tabelle 13: Methylierungsgrad von Tumor und Lungengewebe in den Assays 1-7 mit den berechneten Normalbereichen
Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) wurden aus allen Positionen des jeweiligen Assays errechnet. Hypo- bzw. Hypermethylierung wurden als Abweichung von > 3 SD vom MW des Lungengewebes definiert.

	Methylierungsgrad [%]		Normalbereich	
	<i>Tumorgewebe</i> ($n=12$)	<i>Lungengewebe</i> ($n=12$)	Hypomethylierung (MW[Lunge]-3SD)	Hypermethylierung (MW[Lunge]+3SD)
	MW (SD) [%]	MW (SD) [%]	[%]	[%]
Assay 1 <i>PAX9</i>	54,4 (22,7)	11,9 (2,8)	3,7	20,2
Assay 2 <i>cg2332</i>	74,6 (11,3)	21,6 (3,2)	11,9	31,2
Assay 3 <i>cg1810</i>	52,6 (22,0)	4,9 (1,7)	0,1	9,7
Assay 4 <i>MEIS1</i>	53,5 (14,7)	12,1 (3,9)	0,4	23,9
Assay 5 <i>cg0239</i>	49,7 (19,0)	18,6 (3,4)	8,5	28,7
Assay 6 <i>cg2262</i>	48,7 (16,7)	18,9 (3,1)	9,5	28,3
Assay 7 <i>ALX3</i>	62,2 (18,7)	20,7 (9,1)	-6,6	48,0

		SQCC							ADC					Lungengewebe											
		T1	T2	T5	T6	T7	T8	T18	T10	T11	T15	T19	T20	L1	L2	L5	L6	L7	L8	L18	L10	L11	L15	L19	L20
Assay 1 <i>PAX9</i>	MW																								
	CpG1																								
	CpG2																								
	CpG3																								
	CpG4																								
	CpG5																								
	CpG6																								
Assay 2 <i>cg2332</i>	MW																								
	CpG1																								
	CpG2																								
	CpG3																								
Assay 3 <i>cg1810</i>	MW																								
	CpG1																								
	CpG2																								
Assay 4 <i>MEIS1</i>	MW																								
	CpG1																								
	CpG2																								
	CpG3																								
Assay 5 <i>cg0239</i>	MW																								
	CpG1																								
	CpG2																								
	CpG3																								
	CpG4																								
	CpG5																								
Assay 6 <i>cg2262</i>	MW																								
	CpG1																								
	CpG2																								
	CpG3																								
	CpG4																								
	CpG5																								
Assay 7 <i>ALX3</i>	MW																								
	CpG1																								
	CpG2																								
	CpG3																								

Abbildung 14: Individuelle Auswertung der Proben im Hinblick auf Hypermethylierung

Ergebnisse aus der Pyrosequenzierung von DNA aus Tumor- und Lungenproben von 12 Patienten. Eine Spalte repräsentiert eine Probe. Die Zeilen bilden einzelne CpG-Dinukleotide ab, die erste Zeile eines Assays ihren Mittelwert (MW). Das CpG aus den vorangegangenen Infinium HM450K BC-Analysen ist gelb markiert. Grau= Methylierung innerhalb des Normalbereichs, rot= Hypermethylierung. ADC = Adenokarzinom, SQCC = Plattenepithelkarzinom, T1-T20: DNA-Proben aus Tumorgewebe, L1-L20: DNA-Proben aus Lungengewebe.

3.4.1 Korrelation mit klinischen Parametern

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der erhobenen Methylierungsdaten von klinischen Parametern wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Es zeigte sich an den untersuchten CpG-Loci keine Korrelation des Methylierungsgrades im Lungengewebe mit dem Alter oder dem Geschlecht der Patienten. Eine Ausnahme stellt cg04415798 im Gen *PAX9* dar, dessen Methylierung im Lungengewebe mit dem Alter der Patienten korrelierte (Spearman rho= -0,650; p= 0,022). Es wurde daraufhin überprüft, ob cg04415798 als Teil der sogenannten Epigenetic Clock von Horvath beschrieben wurde (Horvath 2013). Es befand sich jedoch nicht unter den untersuchten CpG-Loci.

Die Methylierung des Tumorgewebes zeigte keine Korrelation zu den klinischen Parametern Alter, Geschlecht, Eindringtiefe des Tumors (T-Stadium) oder Nodalstatus (N-Stadium). Einzelheiten der Berechnungen sind in Tabelle 18 im Anhang aufgeführt.

3.5 Diagnostik von Bronchialkarzinomen anhand des Methylierungsstatus von Paired Biopsies

Nach der Optimierung der Pyrosequenzierungs-Assays anhand der OP-Präparate und der Validierung der Ergebnisse durch den Vergleich mit dem HM450K BC, wurden die Assays an Paired Biopsies erprobt. Hierzu wurden zunächst einige Assays ausgewählt. Kriterien waren hierbei zum einen die Qualität der Pyrogramme, zum anderen die Deutlichkeit der Signifikanz in der Unterscheidung von Tumor- und Lungengewebe bzw. ADCs und SQCCs in der Auswertung der OP-Präparate.

Die Paired Biopsies wurden mittels Kryokonservierung aus malignitätsverdächtigen Tumoren in der Lunge von 14 Patienten gewonnen (siehe Kapitel 2.1.1). In der histologischen Untersuchung der Paired Biopsies kann jedoch auch von Spezialisten zum Teil keine sichere Aussage über die Entität des gewonnenen Gewebes gemacht werden. Für das verwendete Material lag initial ebenfalls nur für einen Teil der Proben eine kurze pathologische Beurteilung vor (siehe Tabelle 2). Im weiteren Verlauf wurde für einen Großteil der Proben durch weitere klinisch-diagnostische Untersuchungen die endgültige Diagnose bekannt, sodass die Methylierungsdaten mit der endgültigen klinischen Diagnose abgeglichen werden konnten.

Da das untersuchte Material auf eine andere Art und Weise gewonnen wurde als die OP-Präparate und bekannt ist, dass die Art der Gewebefixierung einen entscheidenden Einfluss auf den Methylierungsstatus der DNA haben kann, wurden für die Paired Biopsies die Normalwerte der Methylierung neu berechnet. Hierzu wurde analog zur Auswertung der OP-Präparate vorgegangen. Anschließend wurden die Proben aus dem malignitätsverdächtigen Gewebe auf Hypo- bzw. Hypermethylierung untersucht.

3.5.1 Mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip ermittelte Methylierungswerte von gepaarten Biopsien aus Lungen- und Tumorgewebe sind durch Bisulfit-Pyrosequenzierung validierbar

Zur Validierung der Daten wurden die Ergebnisse aus der Pyrosequenzierung zunächst mit den vorhandenen Ergebnissen aus der Messung mittels HM450K BC verglichen. In die erste Berechnung wurden die Messungen aller Assays der Paired Biopsies eingeschlossen. Dabei zeigte der Korrelationskoeffizient nach Pearson eine signifikante Korrelation der Daten ($R = 0,895$; $p < 0,01$; siehe Abbildung 15). Im Bland-Altman-Plot ließ sich eine breitere Streuung der Daten insbesondere im mittleren Methylierungsbereich erkennen (Abbildung 15B).

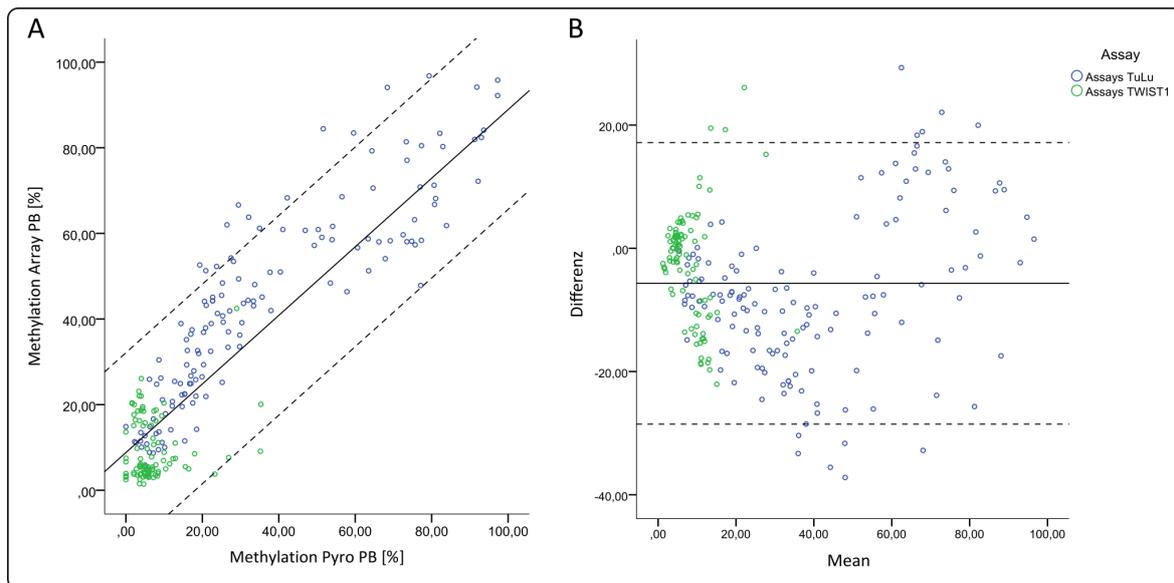


Abbildung 15: Vergleich der Messwerte aus HumanMethylation450K Bead Chip (HM450K BC) und Bisulfidpyrosequenzierung (BSPS)

A Dargestellt ist ein Punktdiagramm der Methylierungswerte derselben Proben aus der BSPS (x-Achse) und der β -Werte aus der Analyse mittels HM450K BC (y-Achse). Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der beiden Messungen mit einem Pearsons Korrelationskoeffizient von $R^2 = 0,890$, $p < 0,01$.

B Korrespondierender Bland-Altman-Plot der Messungen. Abweichungen der Methylierungswerte zeigen sich insbesondere im mittleren Methylierungsbereich.

Die Messwerte der CpGs aus den Bisulfid-Pyrosequenzierungs-Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe (Assays TuLu) sind blau abgebildet, die Messwerte der CpGs aus *TWIST1* sind grün dargestellt.

Außerdem wurde auch die Korrelation für die Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe einerseits und die Assays zur Differenzierung von ADCs und SQCCs andererseits (*TWIST1*) separat untersucht. Für die Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe konnte eine signifikante Korrelation nach Pearson ermittelt werden ($R = 0,883$; $p < 0,001$). Für die Assays aus *TWIST1* hingegen zeigte sich separat betrachtet keine signifikante Korrelation nach Pearson ($R = 0,173$; $p = 0,091$).

Bei genauerer Betrachtung der Daten zeigte sich, dass alle Messwerte der Paired Biopsies für CpG-Loci im Bereich von *TWIST1* im niedrig methylierten Bereich lagen (75 % der Messwerte zwischen 0 % und 7,8 % Methylierung mittels BSPS bzw. zwischen 1,4 % und 15,1 % mittels HM450K BC). Der Mittelwert aller Proben betrug in der Bestimmung mittels BSPS 6,80 %, während er für die Messung mittels HM450K BC 9,30 % betrug. Die absolute Differenz zwischen den Methylierungsdaten betrug im Mittel 6,70 % (maximal 26,09 %). Für die Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe ergab sich zum Vergleich ein Mittelwert der absoluten Differenz von 12,52 % (maximal 37,20 %). Abbildung 16 veranschaulicht die Differenz der Messwerte für die verschiedenen Sequenzen.

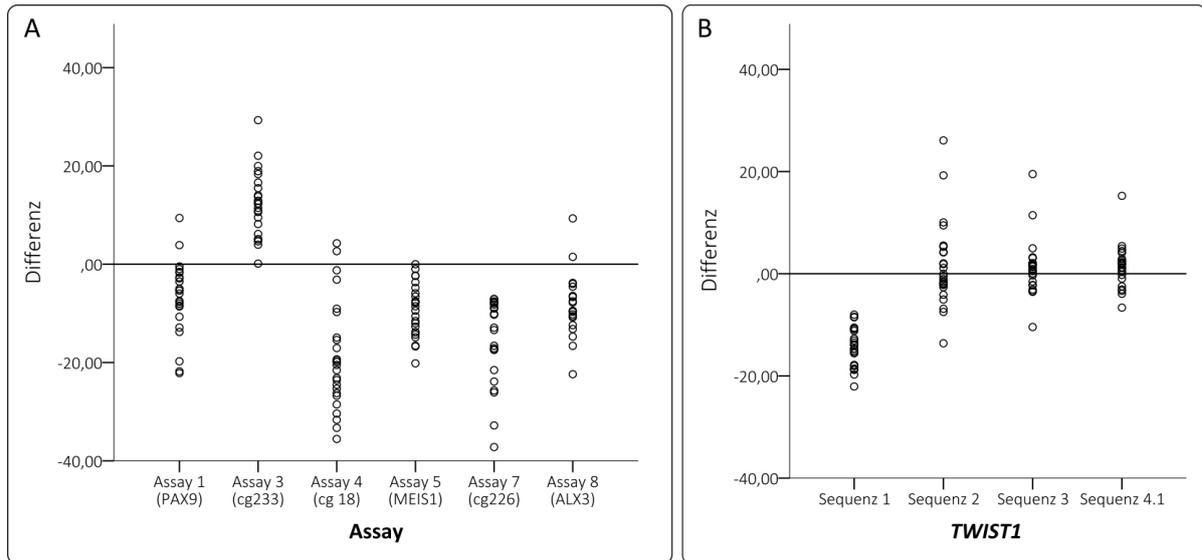


Abbildung 16: Differenz zwischen den Messwerten aus HM450K BC und BSPS

Dargestellt ist die Differenz (Methylierung BSPS [%] – Methylierung HM450K BC [%]) zwischen den Ergebnissen der Methylierungsanalyse mittels BSPS und HM450K BC für die Paired Biopsies. **A** CpG-Loci zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe. **B** CpG-Loci zur Differenzierung von Adeno- und Plattenepithelkarzinom (*TWIST1*).

3.5.2 Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe bzw. Adeno- und Plattenepithelkarzinom anhand der DNA-Methylierung

Um feststellen zu können, ob es sich bei dem malignitätsverdächtigen Gewebe tatsächlich um Bronchialkarzinome handelte, wurden zwölf Paired Biopsies mit Hilfe der Assays zur Unterscheidung von Bronchialkarzinomen und Lungengewebe untersucht. Anhand der Methylierung des Kontrollgewebes wurden Normalbereiche der Methylierung für die jeweiligen Sequenzen definiert. Diese können Tabelle 14A entnommen werden.

Anhand der Auswertung der DNA-Methylierung des malignitätsverdächtigen Gewebes mithilfe der neu definierten Normalbereiche ließen sich vier Proben (M5, M6, M7 und M8) identifizieren, die in vier der Assays (Assay 1 *PAX9*, Assay 3 cg18103859, Assay 4 *MEIS1* und Assay 6 cg22620090) eine Hypermethylierung aufwiesen (siehe Abbildung 17). Eine weitere Probe (M11) war in drei Assays an mehreren CpGs hypermethyliert (Assay 1 *PAX9*, Assay 4 *MEIS1* und Assay 6 cg22620090).

Um auch eine Differenzierung zwischen ADCs und SQCCs zu ermöglichen, wurden die Proben auch in den Sequenzen aus *TWIST1* untersucht. Die Unterscheidung von ADCs und SQCCs ist vor allem unter dem Aspekt der Therapieplanung bei Patienten mit Bronchialkarzinomen entscheidend (siehe Kapitel 1.1.2). Auch für die Sequenzen aus *TWIST1* wurden anhand der Paired Biopsies aus Kontrollungengewebe derselben Patienten neue Normalbereiche des Methylierungsgrades errechnet (siehe Tabelle 14B).

In der Auswertung der Proben aus malignitätsverdächtigem Gewebe stellte sich die Probe M13 vollständig hypermethyliert in den Sequenzen aus *TWIST1* dar (siehe Abbildung 17). Dies legte den Schluss nahe, dass es sich bei der Probe um ein ADC handelte. Aufgrund von Materialmangel konnte die Probe nicht mittels

der Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe untersucht werden. Zu der Probe waren jedoch histopathologische Befunde vorhanden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem Bronchialkarzinom unklarer Entität ausgingen. Auch die Probe M14 wies in zwei untersuchten Sequenzen aus *TWIST1* eine Hypermethylierung auf. Die Probe konnte zwar ebenfalls nicht mit den Assays 1-7 untersucht werden, doch auch hier gingen die Pathologen mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem Bronchialkarzinom unklarer Entität aus.

Außerdem zeigte die Probe M8 an allen CpGs der Sequenz 1 sowie einzelnen CpGs in den Sequenzen 2 und 4 aus *TWIST1* eine Hypermethylierung. Auch in den Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe hatte die Probe M8 überwiegend eine Hypermethylierung gezeigt. Die übrigen Proben, die in den Assays 1-7 eine Hypermethylierung gezeigt hatten (M5, M6, M7, M11), wiesen in den untersuchten Sequenzabschnitten aus *TWIST1* keine Hypermethylierung auf.

Tabelle 14 A + B: Methylierungsgrad des Lungengewebes in den verschiedenen Assays sowie die neu errechneten Grenzen des Normalbereichs

Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) wurden aus allen Positionen des jeweiligen Assays errechnet.

A	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Assay 4	Assay 6	Assay 7
	<i>PAX9</i>	cg2332	cg1810	<i>MEIS1</i>	cg2262	<i>ALX3</i>
Methylierungsgrad Lungengewebe [%] (n=12)	10,73 (6,56)	77,96 (5,88)	29,27 (8,44)	13,06 (4,90)	23,35 (5,44)	50,83 (15,57)
Hypomethylierung [%] (=MW- 3 SD)	-8,94	60,32	3,94	-1,65	7,02	4,11
Hypermethylierung [%] (= MW+ 3 SD)	30,41	95,60	54,61	27,77	39,68	97,54

B	<i>TWIST1</i>	<i>TWIST1</i>	<i>TWIST1</i>	<i>TWIST1</i>
	Sequenz 1	Sequenz 2	Sequenz 3	Sequenz 4
Methylierungsgrad Lungengewebe [%] (n=12)	4,78 (2,27)	7,58 (9,13)	9,93 (10,74)	5,24 (3,74)
Hypomethylierung [%] (=MW- 3 SD)	-2,03	-18,82	-22,29	-5,97
Hypermethylierung [%] (= MW+ 3 SD)	11,60	34,99	42,15	16,45

		M1	M8	M9	M5	M10	M11	M12	M3	M2	M6	M7	M4	M13	M14	K1	K8	K9	K5	K10	K11	K12	K3	K2	K6	K7	K4	K13	K14
		NSCLC								SCLC				Kontrollen															
		ADC	ADC	ADC	SQCC	SQCC	SQCC	SQCC	NSCLC	SCLC	SCLC	SCLC	other	unknown	unknown														
Assay 1	M													/	/												/	/	
	C1													/	/												/	/	
	C2													/	/												/	/	
	C3													/	/												/	/	
	C4													/	/												/	/	
	C5													/	/												/	/	
C6													/	/												/	/		
Assay 2	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
	C2													/	/											/	/		
	C3													/	/											/	/		
Assay 3	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
Assay 4	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
	C2													/	/											/	/		
Assay 6	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
	C2													/	/											/	/		
	C3													/	/											/	/		
	C4													/	/											/	/		
	C5													/	/											/	/		
Assay 7	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
	C2													/	/											/	/		
T.Seq1	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
TWIST1 Seq.2	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
	C2													/	/											/	/		
	C3													/	/											/	/		
	C4													/	/											/	/		
TWIST1 Seq3	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
	C2													/	/											/	/		
	C3													/	/											/	/		
T Seq4.1	M													/	/											/	/		
	C1													/	/											/	/		
	C2													/	/											/	/		
	C3													/	/											/	/		

Abbildung 17: Individuelle Auswertung der Paired Biopsies im Hinblick auf Hypermethylierung
 Ergebnisse aus der Pyrosequenzierung von bioptisch gewonnenen DNA aus Tumor- und Lungenproben von 14 Patienten. Eine Spalte repräsentiert eine Probe. Die Zeilen bilden einzelne CpG-Dinukleotide ab, die erste Zeile eines Assays ihren Mittelwert. Das CpG aus den vorangegangenen Infinium HumanMethylation450K BeadChip-Analysen ist gelb markiert. Grau= Methylierung innerhalb des Normalbereichs, rot= Hypermethylierung. /= keine Messwerte mittels Pyrosequenzierung vorhanden. M = Mittelwert der Sequenz, 1-6 = Nummer des CpG in der Sequenz. M1-M14 = DNA-Proben aus malignitätsverdächtigem Gewebe, K1-K14 = DNA-Proben aus Lungengewebe.

Zum Zeitpunkt der Durchführung der BSPS und Auswertung der Daten war die Entität des untersuchten Gewebes nicht bekannt. Daher konnte bei der Auswahl des untersuchten Materials nicht zwischen Proben aus NSCLC, SCLC oder anderen nicht malignen Raumforderungen der Lunge selektiert werden. Erst nach erster Auswertung und Analyse der Methylierungsdaten lagen weitere Befunde vor, sodass für einen Großteil der untersuchten Proben eine endgültige klinische Diagnose bekannt wurde. So stellte sich letztlich heraus, dass unter dem untersuchten Material (n=14) bei 8 Patienten ein NSCLC diagnostiziert wurde, hierunter 3 ADCs, 4 SQCCs sowie 1 nicht weiter spezifiziertes NSCLC. 3 Patienten erhielten die Diagnose eines SCLC, bei einem Patienten wurde eine nicht-maligne Raumforderung diagnostiziert. Bei zwei der untersuchten Proben blieb die endgültige Diagnose weiterhin unklar.

Bei allen Proben, die in der Pyrosequenzierung in einzelnen oder mehreren der untersuchten CpGs eine Hypermethylierung gezeigt hatten, wurde im weiteren Verlauf die Diagnose einer malignen Raumforderung der Lunge gestellt. Eine Hypermethylierung der Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe lag jedoch nicht nur in NSCLC vor, sondern auch in SCLC (1 von 3 ADC; 3 von 4 SQCC, 2 von 3 SCLC).

Drei Proben, bei denen letztlich ein NSCLC diagnostiziert wurde, zeigten in den untersuchten Sequenzen hingegen keine Hypermethylierung. Laut den vorläufigen histopathologischen Befunden aus der initialen Begutachtung des untersuchten Probenmaterials wurde für zwei dieser Proben (M1, M3) initial der Verdacht auf eine nicht-maligne Raumforderung geäußert. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung unterstützten diese Aussage (keine Hypermethylierung). Eine mögliche Ursache für diese Befunddiskrepanz zwischen vorläufiger histopathologischer Untersuchung/ Interpretation des Methylierungsstatus und endgültiger klinischer Diagnose könnte ein niedriger Tumorzellgehalt der untersuchten malignitätsverdächtigen Gewebeproben sein.

Eine Hypermethylierung in mehreren oder einzelnen Positionen der untersuchten CpG-Loci im Bereich von *TWIST1* zeigte sich in insgesamt 3 der untersuchten malignitätsverdächtigen Raumforderungen. Bei einem der Patienten (Probe M8) wurde letztlich die Diagnose eines ADC gestellt. Für die anderen beiden hypermethylierten Proben (M13: hypermethyliert über alle Sequenzen, M14: hypermethyliert in *TWIST1* Sequenz 2-3) blieb die endgültige klinische Diagnose bis auf weiteres unklar. Die vorläufige histopathologische Beurteilung ging hier jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer malignen Raumforderung der Lunge aus.

Von den drei Patienten, bei denen letztlich die Diagnose eines ADC gestellt wurde, hatte somit eine der untersuchten DNA-Proben eine Hypermethylierung im Bereich des Gens *TWIST1* gezeigt (siehe Abbildung 17).

Nachdem die endgültige Diagnose für eine Mehrzahl der untersuchten Gewebeproben bekannt war, erfolgte auch eine graphische Gegenüberstellung des Methylierungsgrades in Tumor-/Lungengewebe für die einzelnen Subentitäten (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Hierbei zeigt sich, dass die Methylierung des Kontrollgewebes im Vergleich mit dem malignitätsverdächtigen Gewebe eine geringere Streuung der Methylierungswerte zeigte. Eine statistische Auswertung der Daten war aufgrund der geringen Probenanzahl in den einzelnen Subgruppen nicht sinnvoll durchführbar.

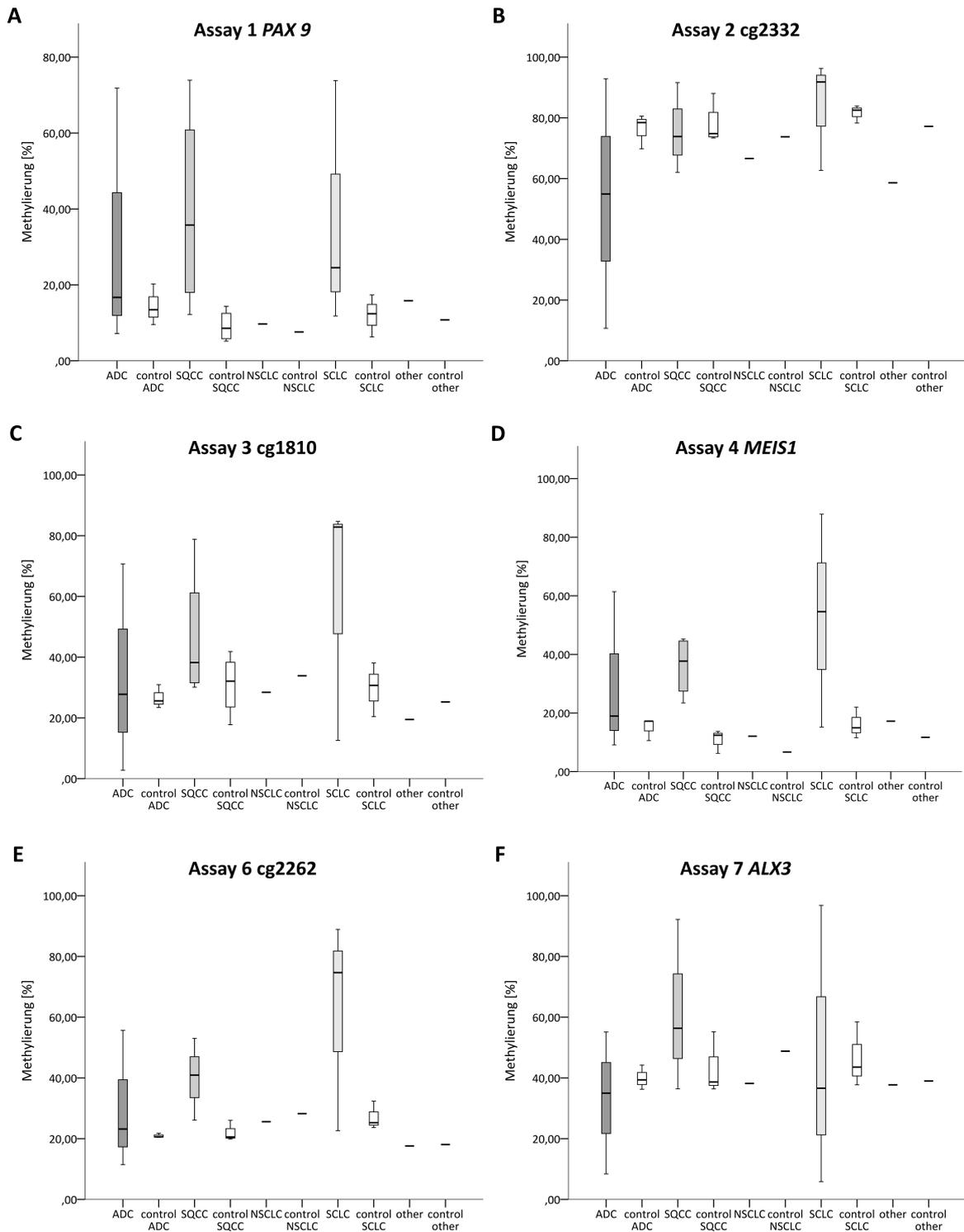


Abbildung 18: Darstellung der Methylierung als Box Plot: Vergleich der Methylierungsdaten aus Paired Biopsies

Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung. Analysiert wurden DNA-Proben aus Paired Biopsies, jeweils aus Lungen- und Tumorgewebe. **A-D:** ADC (n=3), SQCC (n=4), NSCLC (n=1), SCLC (n=3), others (n=1). **E-F** ADC (n=3), SQCC (n=3), NSCLC (n=1), SCLC (n=3), others (n=1). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Methylierungsgrades aus allen Positionen einer Sequenz. Die Enden der Box zeigen die 25./ 75. Perzentile an, die Linie in der Box den Median; o = Ausreißer; * = extreme Werte. ADC = Adenokarzinom, SQCC = Plattenepithelkarzinom, NSCLC = Non-small cell lung cancer, SCLC = Small cell lung cancer

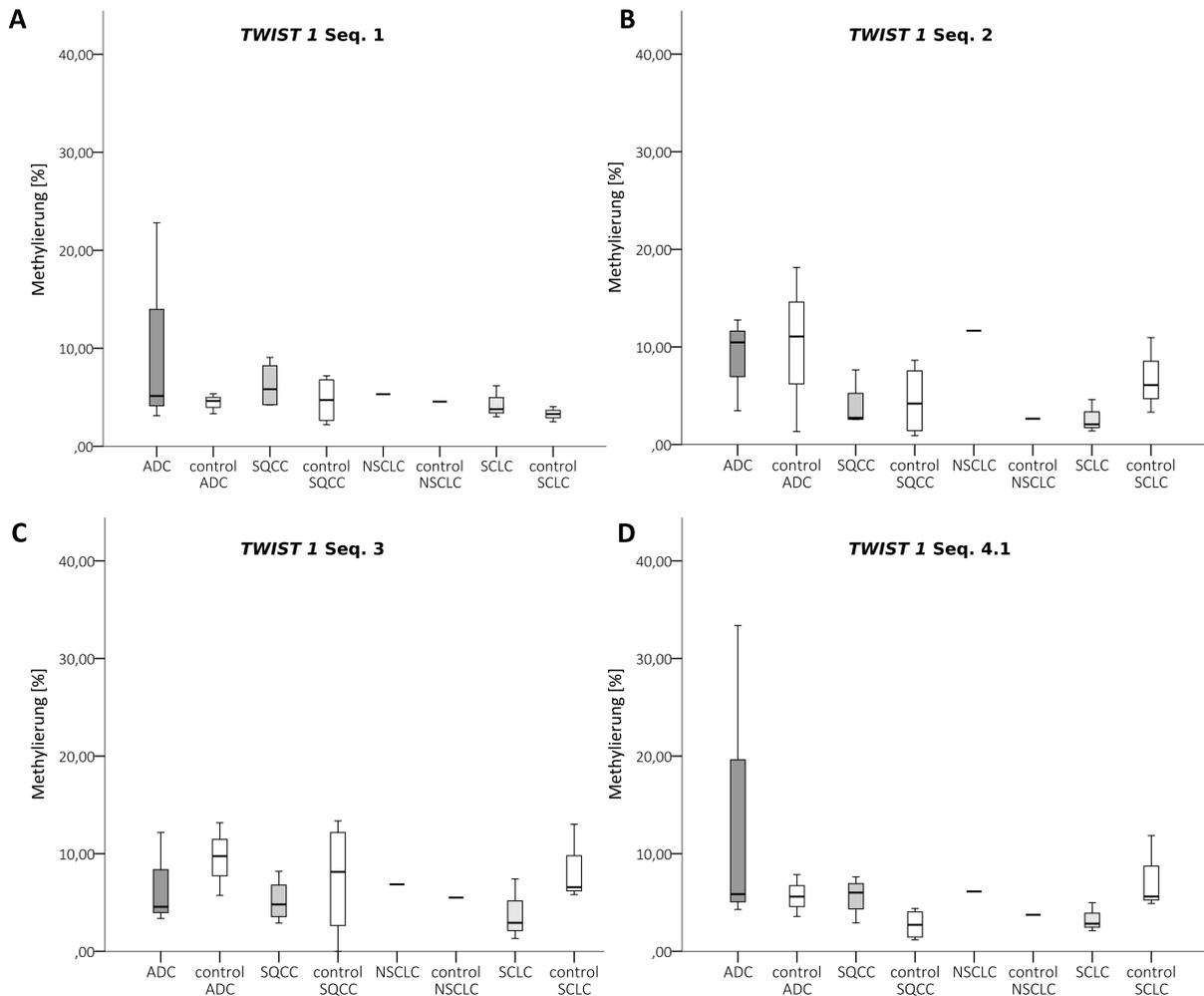


Abbildung 19: Darstellung der Methylierung als Box Plot: Vergleich der Methylierungsdaten aus Paired Biopsies im Gen *TWIST1*)

Ergebnisse der Bisulfit-Pyrosequenzierung. Analysiert wurden DNA-Proben aus Paired Biopsies, jeweils aus Lungen- und Tumorgewebe. **A-C:** ADC (n=3), SQCC (n=4), NSCLC (n=1), SCLC (n=3) **D** ADC (n=3), SQCC (n=3), NSCLC (n=1), SCLC (n=3). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Methylierungsgrades aus allen Positionen einer Sequenz. Die Enden der Box zeigen die 25./ 75. Perzentile an, die Linie in der Box den Median; ○ = Ausreißer; * = extreme Werte. ADC = Adenokarzinom, SQCC = Plattenepithelkarzinom, NSCLC = Non-small cell lung cancer. SCLC = Small cell lung cancer.

3.6 Anwendung der MS-PCR in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen

Anschließend an die Optimierung der BSPS-Assays und die Auswertung der Ergebnisse sollte der Methylierungszustand von ADCs und SQCCs mit Hilfe der MS-PCR analysiert werden. Die Kosten und der Zeitaufwand sind bei der Durchführung dieser Methode deutlich geringer als bei einer Pyrosequenzierung. Zudem werden nur einfache Geräte benötigt, die in fast allen Laboren zur Verfügung stehen. Die MS-PCR könnte daher insbesondere für Screening-Untersuchungen von Patienten von Nutzen sein. Ausgewählt wurden jeweils zwei CpGs zur Erkennung von Tumorgewebe sowie zwei CpGs aus *TWIST1*. In die Auswahl der CpG-Loci wurden jene CpGs einbezogen, die sowohl mittels BSPS als auch mittels HM450K BC untersucht wurden. Kriterien für die Auswahl waren der Grad der Signifikanz des Methylierungsunterschiedes an den jeweiligen Positionen des Assays in der BSPS, die absolute Differenz der Methylierung zwischen den zu unterscheidenden Gruppen (Lungengewebe und Karzinom einerseits, ADC und SQCC andererseits) sowie die Stabilität der PCR und die Qualität der Pyrogramme in der BSPS.

Bei den analysierten CpGs handelte es sich um cg18103859 (Assay 3) und cg05877497 (Assay 4 *MEIS1*) zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe, sowie cg20052718 (Sequenz 2) und cg17839237 (Sequenz 3) aus *TWIST1*, um zwischen ADC und SQCC zu unterscheiden. Untersucht wurden DNA-Proben aus jeweils 10 OP-Präparaten von Tumorgewebe und tumorfreiem Lungengewebe derselben Patienten.

Im Folgenden möchte ich zunächst auf die CpG-Loci zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe eingehen. In der Optimierungsphase der MS-PCR wurde für cg18103859 (aus Assay 3) bei 67 °C die höchstspezifische Annealing-Temperatur zur Amplifikation von methylierter DNA (M-PCR) erreicht. Die höchste Spezifität für unmethylierte DNA (U-PCR) zeigte sich bei 63 °C. Bei 67 °C erfolgte in der M-PCR eine spezifische Amplifikation der methylierten Kontroll-DNA (MK), während unmethylierte Kontroll-DNA (WGA) und nicht-bisulfitbehandelte DNA (gDNA) kein PCR-Produkt erzeugten. Umgekehrt erfolgte in der U-PCR bei 63 °C ausschließlich eine Amplifikation der WGA (siehe hierzu Abbildung 20A I+II: Kontrollen).

Nach der Optimierung erfolgte die PCR von DNA aus OP-Präparaten von Tumor- und Lungengewebe. Die M-PCR erzeugte dabei reichlich Amplifikat aus den DNA-Proben aus Tumorgewebe von ADCs und SQCCs mit kräftigen Banden in der Gelelektrophorese. Lungengewebs-DNA wurde hingegen kaum amplifiziert, sodass im gelelektrophoretischen Nachweis ein deutlicher Unterschied der Bandenintensität von Tumor- bzw. Lungengewebe sichtbar war (siehe Abbildung 20 AI). Teilweise entstanden „niedrige“, schnell laufende Banden, welche am ehesten in der PCR nicht-inkorporierten freien Primern entsprachen.

Die U-PCR erzeugte sowohl aus Tumor- als auch aus Lungengewebs-DNA Amplifikat, sodass gelelektrophoretisch kein Unterschied in der Bandenintensität sichtbar war (siehe Abbildung 20 AII). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der quantitativen Bestimmung des Methylierungsgrades mittels BSPS ist dies nicht verwunderlich, da die Methylierung im Tumorgewebe durchschnittlich 50,9 % (SD = 22,0 %) betrug. Daher lag im Tumorgewebe ein ähnlich großer Anteil unmethylierter DNA vor, sodass die U-Primer reichlich DNA binden und amplifizieren konnten.

Für cg05877497 (*MEIS1*) wurde die höchstspezifische Annealing-Temperatur in der M-PCR bei 67 °C, in der U-PCR bei 64 °C erreicht (siehe Abbildung 20B I+II, Kontrollen). Die Durchführung mit der DNA aus OP-Präparaten zeigte, dass sowohl in der M- als auch in der U-PCR aus allen Proben Amplifikat erzeugt wurde (Ausnahme M-PCR: Probe L10, Lunge, methyliert negativ; siehe Abbildung 20B I). Eine Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe anhand der Bandenintensität war daher nicht möglich. Dass auch das Lungengewebe in der M-PCR Produkt erzeugte, ist unter Berücksichtigung der quantitativen Methylierungsdaten erklärbar. In der BSPS wurde im Lungengewebe eine durchschnittliche Methylierung von 14,9 % an cg05877497 ermittelt (SD= 3,4 %), sodass ausreichend methylierte DNA für eine effektive Amplifikation in der M-PCR vorlag. An cg18103859 (Abbildung 20A) war die durchschnittliche Methylierung im Lungengewebe im Vergleich dazu deutlich geringer (MW= 3,8 %, SD= 1,1%).

Besser gelang die Differenzierung zwischen ADCs und SQCCs. Für cg20052718 (Abbildung 21A) lagen die optimierten Annealing-Temperaturen für methylierte DNA bei 67 °C und für unmethylierte DNA bei 64 °C. Unter den optimierten PCR-Bedingungen erzeugte die M-PCR Amplifikate aus allen DNA-Proben aus ADCs (siehe Abbildung 21 A I). DNA aus SQCCs wurde nicht amplifiziert, sodass eine Differenzierung der beiden Tumorentitäten in den untersuchten DNA-Proben möglich war. Es erfolgte jedoch auch eine Amplifikation einer DNA-Probe aus Lungengewebe (siehe Abbildung 21A I, Probe L15; Methylierung in BSPS 9,7 %). In der Auswertung der quantitativen Ergebnisse der BSPS hatte sich in der Region um cg20052718 (Sequenz 2) insgesamt eine breite Streuung der Methylierung im Lungengewebe gezeigt (siehe Kapitel 3.3, Abbildung 11 sowie Tabelle 12 im Anhang). Bei teilweise hohen Methylierungswerten um 30 % ist eine Amplifikation von Lungengewebe in der M-PCR daher erklärbar. Die U-PCR erzeugte aus allen Proben ein PCR-Produkt (siehe Abbildung 21 A II). Die mittlere Methylierung in ADCs in Sequenz 2 an Position 2 der BSPS-Assays betrug 58,1 % (SD = 17,2 %), sodass immer auch ausreichend unmethylierte DNA für eine Amplifikation vorhanden war. Es erfolgte jedoch keine Amplifikation der MK.

In der Optimierung der Assays zu cg17839237 (siehe Abbildung 21B) wurden die höchstspezifischen Annealing-Temperaturen bei 72 °C für methylierte DNA und bei 64 °C für unmethylierte DNA erreicht. Die M-PCR führte zur Amplifikation der DNA aus allen ADCs und aus einem SQCC (siehe Abbildung 21B I, Probe T18; Methylierung in BSPS maximal 7,6 %) mit deutlichen Banden in der Gelelektrophorese. Es erfolgte keine Amplifikation der DNA aus den übrigen SQCCs oder dem Lungengewebe. Die ADCs ließen sich somit mit einer Ausnahme von den SQCCs und dem tumorfreien Lungengewebe abgrenzen. Die U-PCR erzeugte ebenfalls für alle DNA-Proben ein PCR-Amplifikat (siehe Abbildung 21 B II). In allen Proben, inklusive der Kontrollen und Negativkontrollen (ddH₂O) zeigte sich außerdem eine weitere Bande, die am ehesten auf eine Zusammenlagerung von Primern zurückzuführen ist.

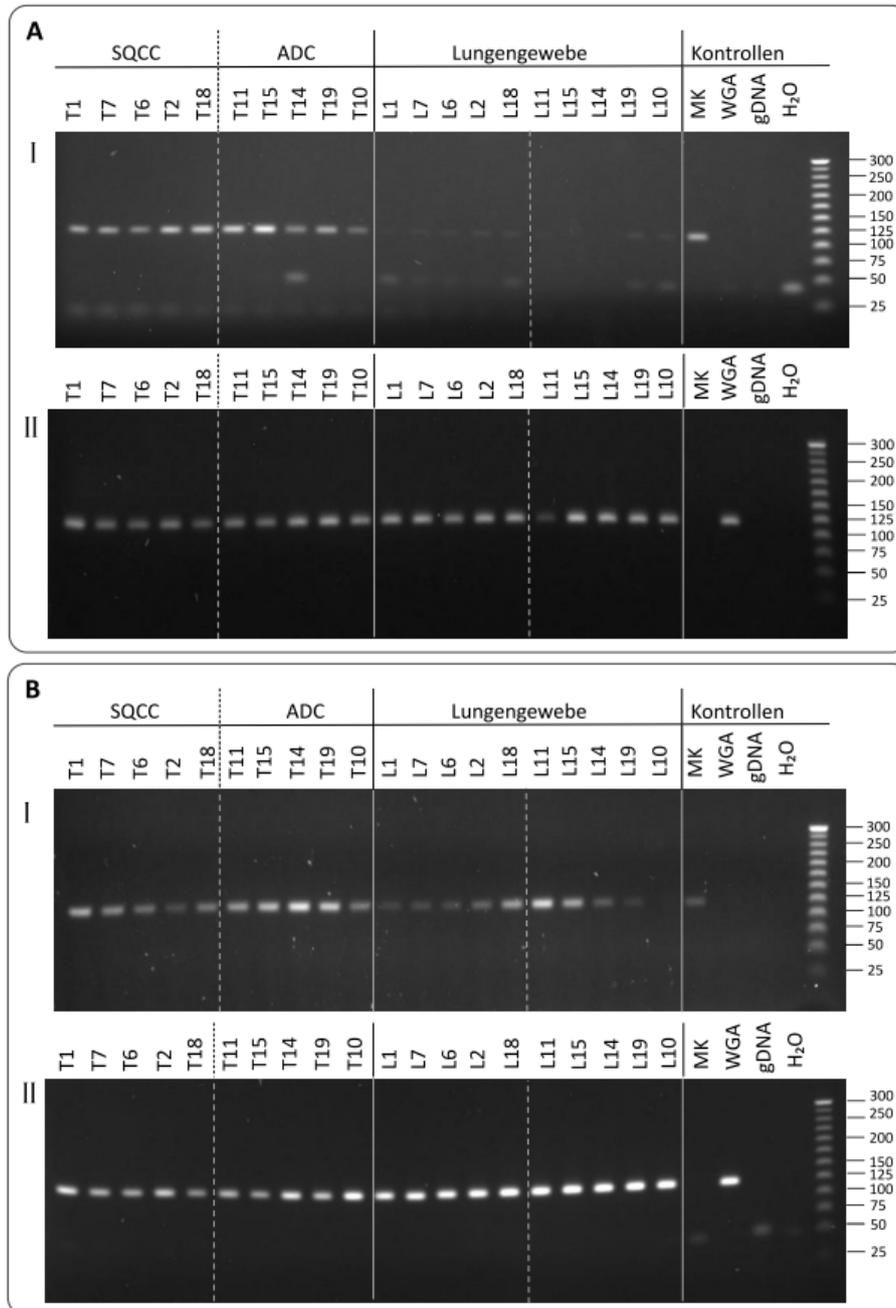


Abbildung 20: Methylierungsspezifische PCR. Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte für cg18103859 (A) und cg05877497 (B)

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus der MS-PCR für methylierte DNA (M-PCR, I) und für unmethylierte DNA (U-PCR, II). Amplifiziert wurden je 5 Proben aus Plattenepithelkarzinomen (SQCC) und Adenokarzinomen (ADC), sowie 10 Proben aus dem zugehörigen gesunden Lungengewebe. Kontrollen: Methylierte Kontrolle (MK), unmethylierte Kontrolle (WGA), Negativkontrollen: genomische DNA (gDNA) und Wasser (H₂O). Längenstandard = 25bp DNA Step Ladder.

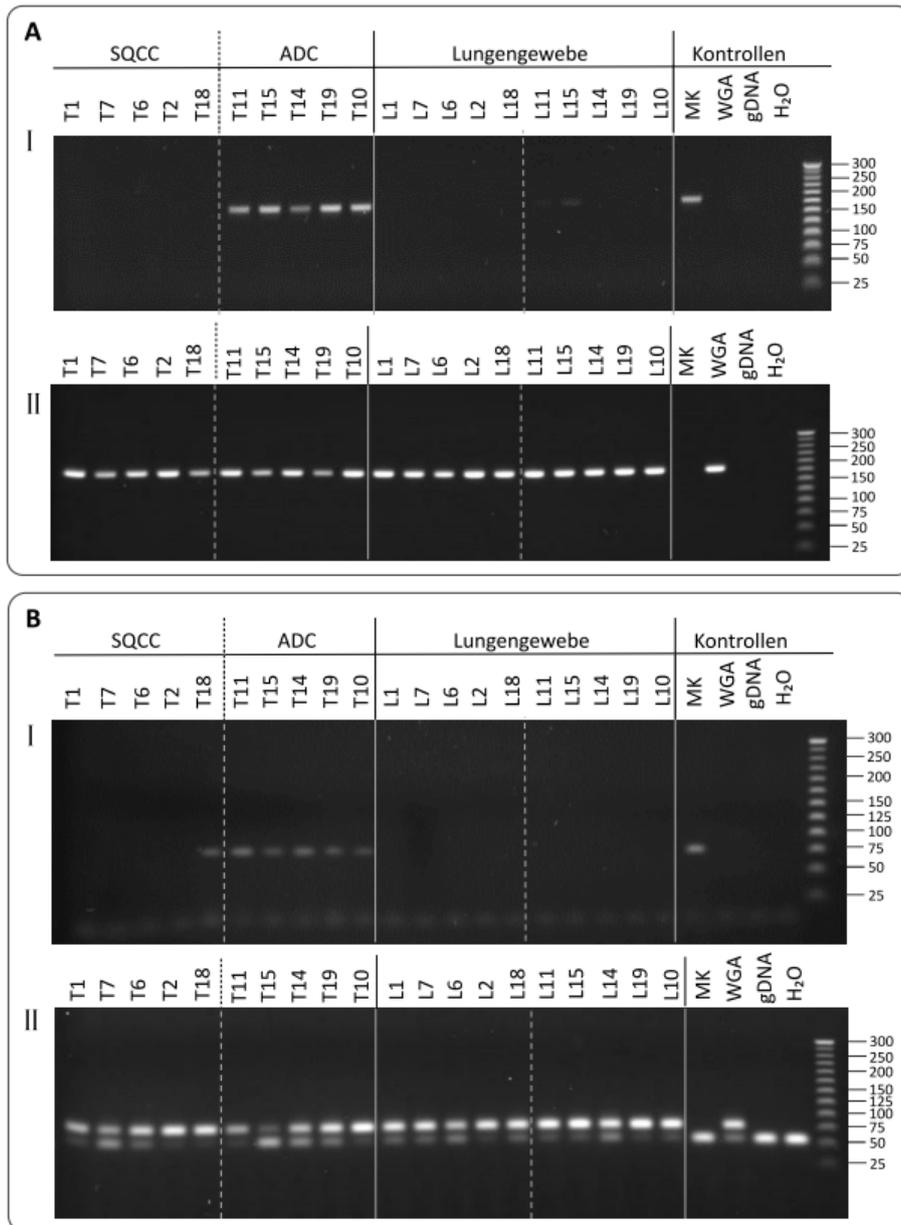


Abbildung 21: Methylierungsspezifische PCR. Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte für cg20052718 (A) und cg17839237 (B) aus *TWIST1*

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus der MS-PCR für methylierte DNA (M-PCR, I) und für unmethylierte DNA (U-PCR, II). Amplifiziert wurden je 5 Proben aus Plattenepithelkarzinomen (SQCC) und Adenokarzinomen (ADC), sowie 10 Proben aus dem zugehörigen gesunden Lungengewebe. Kontrollen: Methylierte Kontrolle (MK), unmethylierte Kontrolle (WGA), Negativkontrollen: genomische DNA (gDNA) und Wasser (H₂O). Längenstandard = 25bp DNA Step Ladder.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Methylierungszustand verschiedener CpG-Loci als potenzielle molekulare Biomarker des Bronchialkarzinoms. Grundlage für die Auswahl dieser Cytosine waren im Institut für Humangenetik, UKSH Campus Kiel erhobene Methylierungsdaten aus einer Untersuchung mittels HM450K BC. Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand in der Validierung der vorhandenen Daten mit der Methode der BSPS.

Der Fokus der Auswertung lag auf der Identifikation von Unterschieden in der DNA-Methylierung zwischen den beiden häufigsten Lungenkarzinomentitäten, dem ADC und SQCC. Sechs BSPS-Assays zur Methylierungsanalyse von Cytosinen im CpG-Island des Gens *TWIST1* konnten in dieser Arbeit etabliert werden. Für die untersuchten CpG-Loci gelang der Nachweis eines signifikanten Methylierungsunterschiedes von ADCs und SQCCs.

Darüber hinaus wurden Cytosine untersucht, die in den Vorgängerstudien eine differenzielle Methylierung in allen Entitäten des Bronchialkarzinoms gezeigt hatten. In insgesamt sieben Sequenzen aus fünf verschiedenen DNA-Regionen bestätigte die BSPS die mittels HM450K BC detektierten Unterschiede des Methylierungszustands zwischen Tumor- und Lungengewebe.

Die Methylierungsanalyse erfolgte sowohl an chirurgisch reseziertem Lungengewebe als auch an minimal-invasiv gewonnenen Gewebeprobe (Paired Biopsies). Beide Untersuchungsmaterialien zeigten eine Korrelation der Methylierungswerte aus den Messungen mittels HM450K BC bzw. BSPS. Der Vergleich der Daten deckte gleichwohl gewisse Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen auf, die im Folgenden ebenfalls thematisiert werden.

Abschließend wurde eine MS-PCR zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe bzw. ADCs und SQCCs etabliert.

In den folgenden Abschnitten möchte ich zunächst auf methodische Aspekte dieser Arbeit eingehen und ihre Vor- und Nachteile darlegen. Ein anschließender Vergleich der erhobenen Daten mit den Ergebnissen anderer Studien soll die gewonnen Erkenntnisse in einen Gesamtzusammenhang einordnen und die perspektivische Rolle epigenetischer Biomarker des Bronchialkarzinoms diskutieren.

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Vergleich der Messwerte von HM450K BC und BSPS zur quantitativen Methylierungsanalyse von DNA

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Validierung einer quantitativen Methylierungsanalyse mittels HM450K BC durch den Einsatz der BSPS. Insgesamt wurden DNA-Methylierungswerte von 14 CpG-Loci verglichen.

Die Auswertung der OP-Präparate (siehe Kapitel 3.2) zeigte eine signifikante Korrelation der erhobenen Daten mit den Ergebnissen des HM450K BC ($R^2 = 0,89$; $p < 0,01$). Auch für die Paired Biopsies (siehe Kapitel 3.5.1) konnte eine signifikante Korrelation der Methylierungswerte nachgewiesen werden

($R^2 = 0,883$; $p < 0,001$). Eine Ausnahme stellte der Vergleich der Ergebnisse aus den Paired Biopsies ausschließlich für die Sequenzen aus *TWIST1* dar. Für die vier untersuchten CpG-Loci konnte keine signifikante Korrelation der Methylierungswerte von HM450K BC und BSPS nachgewiesen werden ($R^2 = 0,173$; $p = 0,091$). Alle untersuchten Proben hatten an diesen CpG-Loci eine niedrige Methylierung (75 % der Messwerte zwischen 0 % und 7,8 % Methylierung in der BSPS bzw. zwischen 1,4 % und 15,1 % mittels HM450K BC) gezeigt. Bei genauerer Betrachtung der Differenz zwischen den Methylierungswerten aus HM450K BC und BSPS erwies sich diese in den Sequenzen aus *TWIST1* sogar als geringer als an anderen CpG-Loci (durchschnittliche Differenz von 6,70 %, maximale Differenz von 26,09 %). Vergleichbare Studien wiesen eine Abweichung der Messwerte zwischen HM450K BC und BSPS um 30 – 40 Prozentpunkte nach (Bibikova et al. 2011; Roessler et al. 2012). In den Studien von Bibikova et al. zeigte sich dennoch eine signifikante Korrelation der Messwerte von HM450K BC und BSPS ($R^2 = 0,96$).

Möglicherweise handelt es sich um einen statistischen Effekt, dass für die Paired Biopsies keine signifikante Korrelation im Vergleich der CpG-Loci aus *TWIST1* nachgewiesen werden konnte. Bei insgesamt niedrigen Messwerten in einem kleinen Probenkollektiv war die Differenz zwischen den gemessenen Werten durchschnittlich sogar geringer als in den Studien von Bibikova et al. und Roessler et al. Bei einer größeren Probenanzahl mit einer breiteren Streuung der Methylierungswerte ließe sich vermutlich ebenfalls eine signifikante Korrelation der Daten nachweisen. Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass bei Betrachtung aller CpG-Loci, die in den Paired Biopsies untersucht wurden, eine signifikante Korrelation nachweisbar war (siehe Kapitel 3.4.1).

Darüber hinaus kann der Studie von Bibikova et al. entnommen werden, dass ihre Messwerte im unteren Methylierungsbereich eine hohe Variabilität aufwiesen, wobei die Ergebnisse in der BSPS in der Regel niedriger ausfielen als im HM450K BC. Während für einige Loci mittels BSPS eine Methylierung nahe 0 % gemessen wurde, ergab die Analyse mittels HM450K BC Messwerte zwischen 0 % und 50 % Methylierung (Bibikova et al. 2011). Die Auswertung der eigenen Ergebnisse bestätigt diese Daten vor allen in den Sequenzen zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe (Auswertung der Paired Biopsies). Im Vergleich der eigenen Daten stellte sich die Methylierung in der Messung mittels BSPS hier ebenfalls in einer Vielzahl der Fälle niedriger als in den Ergebnissen des HM450K BC dar (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16 A, Kapitel 3.4.1). In den Sequenzen aus *TWIST1* (Ausnahme: Sequenz 1) zeigte sich hingegen eine Abweichung sowohl mit negativen als auch positiven Differenzen, was ebenfalls eine Erklärung für den fehlenden Nachweis einer signifikanten Korrelation bietet (siehe Abbildung 16B).

Eine mögliche Ursache für die negative Differenz zwischen den Ergebnissen von BSPS und HM450K BC könnte in den unterschiedlichen Denaturierungstemperaturen für methylierte und unmethylierte DNA aufgrund ihres Cytosin-Gehalts liegen. Diese Unterschiede können zu einer allel-spezifischen Amplifikation unmethylierter DNA führen (Bunyan et al. 2011), die in der anschließenden BSPS niedrigere DNA-Methylierungswerte zur Folge hat. Des Weiteren kann es durch das Vorliegen von CpG-Loci innerhalb der Primersequenzen zu einer präferenziellen Amplifikation von methylierter oder unmethylierter DNA kommen. Eine zusätzliche Fehlerquelle ergibt sich in der BSPS durch den 3-Basen-Code bisulfitkonvertierter

DNA. Insbesondere Homopolymere stellen bei sequenzbasierten Methylierungsanalysen ein Problem dar (Ammerpohl et al. 2016). In der Theorie besteht zwar eine direkte Korrelation von Signalintensität und Anzahl der inkorporierten Nukleotide, tatsächlich ergeben sich jedoch häufig Abweichungen von einem idealen, linearen Verhältnis (Quinlan et al. 2008; Ledergerber und Dessimoz 2011). Auch in den untersuchten Sequenzen 4.1 und 4.2 aus *TWIST1* hatten sich leichte Abweichungen zwischen den Methylierungswerten von CpG-Loci ergeben, die möglicherweise durch das Vorliegen von Homopolymeren begünstigt wurden (siehe Kapitel 3.3.1). Dennoch zeigten die Methylierungsdaten beider Sequenzen eine signifikante Korrelation mit der Messung mittels HM450K BC.

Insgesamt belegt diese Arbeit eine gute Korrelation der Ergebnisse aus den Methylierungsanalysen mittels HM450K BC und BSPS. Dies spricht dafür, dass beide Messverfahren robuste und zuverlässige Methoden zur Detektion von DNA-Methylierung darstellen. Etwaige Differenzen zwischen den Methylierungswerten lagen in einem Rahmen, der den Differenzen vergleichbarer Studien entsprach. Der fehlende Nachweis einer Korrelation für die Methylierungsdaten der Paired Biopsies in den Sequenzen aus *TWIST1* scheint am ehesten auf eine zu kleine Stichprobe zurückzuführen zu sein.

4.1.2 Qualitativer Nachweis von DNA-Methylierung

Zusätzlich zu den Methoden zur quantitativen Bestimmung von DNA-Methylierung wurde eine methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) etabliert (siehe Kapitel 2.2.5 und Kapitel 3.5). Vorteile des Verfahrens liegen in seiner einfachen Durchführbarkeit, da es weder spezielle Gerätschaften erfordert noch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden ist. Für Screening-Verfahren würde es sich daher besonders eignen. Ein entscheidender Nachteil der Methode gegenüber der BSPS oder dem HM450K BC besteht jedoch darin, dass keine verlässliche quantitative Aussage über den Methylierungsgrad getroffen werden kann (Ammerpohl et al. 2009). Insbesondere bei Vorliegen eines mittleren Methylierungsgrades können sowohl die PCR für methylierte, als auch für unmethylierte DNA ein Amplifikat erzeugen.

Dieser Nachteil des Verfahrens wurde bei der Etablierung der MS-PCR ebenfalls deutlich. Die hypermethylierten Proben zeigten durchschnittlich absolute DNA-Methylierungswerte um 50 % Methylierung (Ergebnisse aus der Messung mittels HM450K BC und BSPS), sodass auch in der PCR zur Erkennung von unmethylierter DNA in allen Reaktionsansätzen mit hypermethylierten Proben eine DNA-Amplifikation stattfand (siehe Kapitel 3.6). Daher waren methylierte und unmethylierte DNA-Proben in der U-PCR nicht zu differenzieren.

In der M-PCR gelang es hingegen in drei der vier Ansätze methylierte von unmethylierter DNA zu differenzieren. Schwächen zeigten sich insbesondere für die Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe, da in der M-PCR aus Lungengewebe allenfalls eine ineffektivere Amplifikation als in der PCR aus Tumorgewebe mit Nachweis einer geringeren Bandenintensität in der Gelelektrophorese erfolgte. Eine sicherere Differenzierung könnte in diesem Fall möglicherweise durch eine Real-Time-PCR ermöglicht werden. Aufgrund der insgesamt niedrigen Methylierungswerte in SQCCs war eine Differenzierung der

beiden Tumorentitäten anhand der MS-PCR besser möglich. Jedoch ergab sich auch hier ein „falsch-positiver Befund“ mit einer Amplifikation von DNA aus einem SQCC.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die MS-PCR insbesondere zur Erkennung von Malignität, aber auch zur Differenzierung der Tumorentitäten an den untersuchten CpG-Loci weniger geeignet ist als quantitative Untersuchungsverfahren wie die BSPS oder der HM450K BC. In der statistischen Auswertung der quantitativen Daten stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den zu differenzierenden Gruppen dar. In der gemeinsamen Betrachtung der M- und U-PCR war zwar für die Mehrzahl der Fälle eine Zuordnung der Entität möglich, es wäre jedoch auch zu „falsch-positiven Befunden“ gekommen. Durch die Reduktion auf ein qualitatives Messverfahren kam es somit insgesamt zu einem Informationsverlust, der eine eindeutige Zuordnung des Gewebes nicht für alle untersuchten DNA-Proben zuließ.

4.1.3 Auswahl des Probenmaterials

In der vorliegenden Studie wurden sowohl chirurgische Tumorsektate der Lunge als auch bronchoskopisch gewonnenes Material (sogenannte Paired Biopsies) untersucht. Das Vergleichsmaterial entstammte jeweils dem angrenzenden tumorfreien Lungengewebe derselben Patienten. Der Vorteil dieses Vorgehens besteht in der direkten Übereinstimmung der Kontrollgruppe in Faktoren wie Alter, Geschlecht, genetischem Hintergrund und der Exposition gegenüber Umwelteinflüssen. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen der Methylierung um tumorspezifische Methylierungsmuster handelt. Dies findet Bestätigung durch eine Studie von Tsou et al., die sowohl den Methylierungszustand von tumorfreiem Lungengewebe von Menschen mit Bronchialkarzinomen als auch von Lungengewebe von Menschen ohne Bronchialkarzinom als Kontrollgruppe heranzogen (Tsou et al. 2007). Im Vergleich der Kontrollgruppen zeigte sich dabei, dass das Lungengewebe tumorfreier Patienten generell eine geringere Methylierung in den untersuchten Loci aufwies. Als Kontrollgruppe zur Detektion von krebsspezifischer Hypermethylierung erwies es sich somit als weniger geeignet. Dieser Umstand findet Erklärung durch verschiedene Studien, die belegen, dass Umweltfaktoren wie zum Beispiel eine Nikotinboxposition zur Alteration von Methylierungsmustern auch in tumorfreiem Lungengewebe führen können (Spira et al. 2007; Spira et al. 2004; Divine et al. 2005; Belinsky et al. 2006; Baryshnikova et al. 2008).

In dieser Arbeit erfolgte in einem ersten Ansatz die Methylierungsanalyse des chirurgisch gewonnenen Materials. Zu dem verwendeten Gewebe lagen histopathologische Gutachten mit einer Klassifikation der Tumorentität vor, sodass eine Zuordnung von ADCs und SQCCs möglich war. Bei der Gewinnung von DNA aus chirurgischen Gewebeproben kann darüber hinaus ein hoher Tumorzellgehalt der DNA-Probe sichergestellt werden. Durch die primäre Durchführung einer Methylierungsanalyse des chirurgischen Materials war es möglich, die erhobenen Methylierungsdaten mit klinischen Parametern abzugleichen, um so eine Hypothese hinsichtlich der Veränderung des Methylierungszustands in Bronchialkarzinomen in Abhängigkeit von ihrer Entität zu generieren.

Wie eingangs erläutert erfolgt jedoch nur bei einem geringen Anteil (10-15 %) der Patienten mit Bronchialkarzinomen eine chirurgische Tumoresektion (Loo et al. 2010). Ein zweiter Ansatz diene daher der Untersuchung von bronchoskopisch gewonnenen Gewebeproben (Paired Biopsies) von Patienten, bei denen der Verdacht auf ein Bronchialkarzinom bestand. Biopsien nehmen einen besonders hohen Stellenwert in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen ein, da ihre Gewinnung mit einem geringeren Risiko für den Patienten verbunden ist. Problematisch ist jedoch, dass der Tumorzellgehalt der minimal-invasiv gewonnenen Gewebeproben geringer ausfallen kann als in chirurgisch reseziertem Gewebe. Dies kann dazu führen, dass die DNA-Methylierung der Probe geringer ausfällt als bei der Bestimmung aus reinem Tumorgewebe, sodass die Sensitivität des Tests abnimmt. Bedingt durch die morphologische Heterogenität von Bronchialkarzinomen ist darüber hinaus oftmals keine sichere Diagnosestellung, insbesondere hinsichtlich der Tumorentität, anhand der histologischen Beurteilung des minimal-invasiv gewonnenen Gewebes möglich (siehe Kapitel 1.1.2). So lag in dieser Studie initial für die bioptisch gewonnenen Gewebeproben ebenfalls keine endgültige histopathologische Befundung bzw. klinische Diagnose vor. Erst im weiteren Verlauf wurde bei einem Großteil der untersuchten Gewebeproben eine Diagnose gestellt. Dabei stellte sich heraus, dass unter den untersuchten Gewebeproben sowohl NSCLCs als auch SCLCs vorlagen, ebenso wie eine nicht-maligne Raumforderung. Statistische Berechnungen waren aufgrund einer geringen Probenanzahl für die jeweiligen Subentitäten nicht sinnvoll durchführbar. Für zwei der untersuchten Gewebeproben war eine endgültige Diagnose bis zum Schluss nicht bekannt.

Wünschenswert wäre daher die Untersuchung eines größeren Probenkollektivs, um auch statistische Berechnungen für die einzelnen Tumorentitäten durchführen zu können und zudem die Grenzen für Hypo- bzw. Hypermethylierung besser festlegen zu können.

Positiv hervorzuheben ist jedoch, dass die Ergebnisse der BSPS eine Übereinstimmung mit den Daten des HM450K BC zeigten und eine Hypermethylierung prinzipiell auch in den minimal-invasiv gewonnenen Proben nachweisbar war. Jedoch kam es bei dem Vergleich der Methylierungsdaten anhand der in dieser Studie definierten Methylierungsgrenzwerte mit den endgültigen klinischen Diagnosen auch zu falsch-negativen Befunden (Nachweis einer Hypermethylierung von *TWIST1* in 1 von 3 ADCs).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Neue Methoden zur Methylierungsanalyse im Hochdurchsatzverfahren wie der HM450K BC verhalfen der epigenetischen Forschung zu einem Durchbruch. Insbesondere die Erforschung von Methylierungsmustern als potenzielle molekulare Biomarker erfuhr in den vergangenen Jahren einen massiven Aufschwung. Zahlreiche Studien konnten verschiedenste DNA-Regionen identifizieren, die eine veränderte Methylierung für bestimmte Tumoren zeigen. Aufgrund der beachtlichen Menge epigenetischer Veränderungen entstand eine außerordentliche Komplexität, die bisher nur schwer überschaubar ist. Die folgenden Abschnitte sollen die in dieser Arbeit untersuchten CpG-Loci mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen vergleichen und versuchen, sie in einen Gesamtzusammenhang einzuordnen.

4.2.1 *TWIST1*

Die vorliegende Arbeit untersuchte die DNA-Methylierung von Bronchialkarzinomen in sechs DNA-Sequenzen im Bereich eines CpG-Islands im Gen *TWIST1*. Der Schwerpunkt lag dabei auf der differenzierten Betrachtung der beiden häufigsten Tumorentitäten: dem ADC und SQCC. *TWIST1* ist ein Onkogen, dessen vermehrte Expression in Tumorzellen eine Progression und Metastasierung begünstigt (Yang et al. 2004; Thiery et al. 2009; Fu et al. 2011). Darüber hinaus induziert die Expression des Gens in Tumorzellen Angiogenese und chromosomale Instabilität (Mironchik et al. 2005) und ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Okada et al. 2010).

Tabelle 15: Übersicht über die Ergebnisse von Methylierungs- und Expressionsstudien zu *TWIST1*

	Untersuchtes Karzinom (Tumorentität)	Referenz	Weitere Informationen
Nachweis einer <i>TWIST1</i> Hypermethylierung in Bronchialkarzinomen	NSCLC (ADC)	Tsou et al. 2007; Selamat et al. 2011	Hypermethylierung ausschließlich in invasiven ADCs, nicht in prämaligen Vorstufen (Selamat)
	NSCLC (ADC und SQCC)	Nelson et al. 2012	Keine differenzierte Angabe für ADC bzw. SQCC
Nachweis einer <i>TWIST1</i> -Hypermethylierung in anderen Tumorentitäten	Mamma-CA (ADC)	Gort et al. 2008; Bae et al. 2004; Fackler et al. 2004	Median Meth. = 51 % (Gort et al.)
	Pankreas-CA (ADC)	Sen-Yo et al. 2013	MW Meth. = 66,7%
	Kolorektales CA (ADC)	Okada et al. 2010	Median Meth. = 55,7 %
	Tonsillen-CA (SQCC)	Kwon et al. 2013	MW Meth. \pm SD = 7.30 % \pm 21.26 %
Assoziation einer <i>TWIST1</i> -Hypermethylierung mit positivem Nodalstatus	Mamma-CA	van der Auwera et al. 2009	Assoziation der Hypermethylierung mit ungünstiger Prognose
	Tonsillen-CA (SQCC)	Kwon et al. 2013	
Assoziation von <i>TWIST1</i> -Expression mit einer ungünstigen Prognose	NSCLC	Tian et al. 2018	Expression in Stadium II,III und IV höher als in Stadium I
	Magen-CA (ADC)	Zhu et al. 2014	
	Kolorektales CA (ADC)	Okada et al. 2010	
Zusammenhang von Methylierung und Expression	Keine Korrelation	Mamma-CA; Mamma-CA; Tonsillen-CA	Korrelationsnachweis für Exon 1, keine Korrelation für Promotor-CGI
	Korrelation	Zelllinien	

CA = Karzinom; ADC = Adenokarzinom; SQCC = Plattenepithelkarzinom; NSCLC = Non-small cell lung cancer (Nicht-kleinzelliges Bronchial-CA); CGI = CpG-Island; Meth. = Methylierung; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung.

Der Methylierungsstatus von *TWIST1* ist bereits in einer Vielzahl von malignen Erkrankungen, ebenso dem Bronchialkarzinom, untersucht worden (siehe Tabelle 15). Die vorliegende Studie ist hingegen eine der ersten Studien, die eine differenzierte Betrachtung des Methylierungsstatus von *TWIST1* in ADCs bzw. SQCCs der Lunge durchführte. Die Auswertung der erhobenen Methylierungsdaten in dieser Arbeit zeigte, dass eine Hypermethylierung von *TWIST1* in ADCs, hingegen nicht in SQCCs nachweisbar war (siehe Kapitel 3.3). Im Einklang mit diesen Ergebnissen beschreiben Tsou et al. und Selamat et al. ebenfalls eine

signifikante Hypermethylierung von *TWIST1* in ADCs der Lunge (Tsou et al. 2007; Selamat et al. 2011). Demgegenüber geben Nelson et al. in einer Studie aus dem Jahr 2012 eine Hypermethylierung von *TWIST1* in NSCLCs per se an (Nelson et al. 2012). Ihr Studienkollektiv beinhaltete sowohl ADCs als auch SQCCs, wobei keine differenzierte Auswertung der CpG-Loci im Gen *TWIST1* in Abhängigkeit von der Tumorentität publiziert wurde. Die Autoren wiesen aber grundsätzlich darauf hin, dass mehr hypermethylierte CpG-Loci in ADCs als in SQCCs nachweisbar waren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können die bestehende Literatur somit um einen wichtigen Aspekt ergänzen. Sie sprechen dafür, dass eine Hypermethylierung von *TWIST1* ADCs von SQCCs der Lunge unterscheidet. Da die Differenzierung von Subentitäten des NSCLC bislang eine Herausforderung in der histopathologischen Beurteilung darstellt (siehe Kapitel 1.1.2), könnte die Methylierungsanalyse von *TWIST1* die klassische Diagnostik zukünftig um einen bedeutenden Aspekt erweitern.

Eine Hypermethylierung von *TWIST1* scheint darüber hinaus nur in malignen, bereits invasiven Adenokarzinomen der Lunge aufzutreten. Selamat et al. untersuchten neben dem Methylierungszustand von invasiven ADCs auch präkanzeröse Läsionen der Lunge (Selamat et al. 2011). Eine Hypermethylierung von *TWIST1* ließ sich in ihrer Studie weder in atypischen adenomatösen Hyperplasien (AAH) noch in in situ ADCs nachweisen. Lediglich invasive ADCs stellten sich hypermethyliert dar. Hieraus ließe sich eine hohe Spezifität des Methylierungsstatus von *TWIST1* als potenziellem molekularem Biomarker zum Nachweis von Malignität ableiten. Auch in der vorliegenden Studie wurden in der ersten Untersuchung der OP-Präparate ausschließlich invasive Adenokarzinome untersucht. Die Auswertung konnte hier eine signifikant erhöhte Methylierung der Adenokarzinome nachweisen. Im Gegensatz dazu ließ sich in der Untersuchung der Paired Biopsies eine Hypermethylierung der ADCs in den Sequenzen aus *TWIST1* nur in einer der drei Gewebeproben aus ADCs nachweisen. Die Ergebnisse werfen daher die Frage auf, ob eine Hypermethylierung von *TWIST1* gleichzeitig in der Früherkennung von Bronchialkarzinomen einen geeigneten Marker darstellen kann. Der Methylierungszustand von *TWIST1* in Bronchialkarzinomen scheint vielmehr als diagnostischer und prognostischer Biomarker, denn als Risikobiomarker wertvoll zu sein. Zu bedenken gilt bei der Auswertung der eigenen Daten jedoch, dass der Tumorzellgehalt der Paired Biopsies sowie initial auch die endgültigen Diagnosen nicht bekannt waren. Ein möglicherweise niedriger Tumorzellgehalt der Proben könnte hier einen wichtigen Confounder darstellen, da dieser ebenfalls zu falsch-niedrigen Methylierungswerten führen kann. Um diese Fragestellung abschließend zu klären, wären prospektive Studien notwendig, die den Methylierungszustand von *TWIST1* im Lungengewebe von Risikopopulationen, insbesondere Rauchern, über einen längeren Zeitraum und bereits vor dem Auftreten von Rundherden in der Lunge untersuchen.

Die potenzielle Rolle als prognostischer Biomarker wird durch die Assoziation mit einem fortgeschrittenem pT-Stadium sowie einem positiven Nodalstatus (siehe Kapitel 3.3.2) und entsprechend fortgeschrittenem Tumorstadium bestärkt. Im Einklang mit diesem Befund weisen sowohl Tonsillenkarzinome (Kwon et al. 2013) als auch Mammakarzinome (van der Auwera et al. 2009) mit positivem Nodalstatus eine verstärkte Hypermethylierung von *TWIST1* auf. Erklärbar wird dies durch die Beteiligung von *TWIST1* an der epithelial-

mesenchymalen Transition (EMT), einem essenziellen Schritt zur Erhöhung der Zellmobilität, der Tumorprogression und Metastasierung begünstigt (Thiery et al. 2009; Yang et al. 2004). In diesem Zusammenhang belegen Expressionsstudien, dass eine vermehrte *TWIST1*-Expression in Tumoren mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert ist (Tian et al. 2018; Zhao et al. 2017; Ansieau et al. 2010; Martin et al. 2005; Okada et al. 2010).

Unklar ist bislang der Einfluss der Methylierung von *TWIST1* auf die Expression des Gens. Verschiedene Studien haben den Zusammenhang von *TWIST1*-Methylierung und *TWIST1*-Expression untersucht. Die Mehrzahl der Studien konnten keine Korrelation von Methylierung und Expression nachweisen (Gort et al. 2008; Kwon et al. 2013; Okada et al. 2010). Demgegenüber stellte eine Studie an Zelllinien von Sakamoto et al. heraus, dass bei einer Hypermethylierung von Cytosin-Loci in der Promotorregion von *TWIST1* zwar kein Zusammenhang zur Expression nachweisbar war, die Methylierung in der CpG-reichen Region des Exon 1 hingegen mit einer verminderten Expression von *TWIST1* einherging (Sakamoto et al. 2015). Mit Ausnahme von Sequenz 1 waren alle untersuchten Sequenzen aus *TWIST1* in der vorliegenden Studie ebenfalls in Exon 1 lokalisiert. Zur Expression von *TWIST1* in dem untersuchten Tumorgewebe lagen keine Daten vor. Die Tatsache, dass der Methylierungszustand der Tumoren mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert war, würde basierend auf den Ergebnissen der Expressionsstudien somit eher für eine vermehrte Expression von *TWIST1* sprechen.

4.2.2 CpGs zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe

Neben den CpG-Loci im Bereich des Gens *TWIST1* untersuchte die vorliegende Studie weitere CpG-Loci zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe im Allgemeinen. Für alle CpG-Loci konnte ein signifikanter Methylierungsunterschied zwischen Tumor- und Lungengewebe nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.4). Die Cytosine lagen in drei verschiedenen Genen (*MEIS1*, *ALX3* und *PAX9*), in einem CpG-Island und der nicht-kodierenden RNA-Region *SALRNA1* (siehe Kapitel 2.1.7.2).

In der Literatur fanden sich nur für einige der DNA-Regionen vergleichbare Studiendaten. Eine Studie beschreibt zum Beispiel eine Hypermethylierung von *MEIS1* in Bronchialkarzinomen, bezieht sich jedoch ausschließlich auf SQCCs (Rauch et al. 2008). In dem untersuchten Studienkollektiv hatten 17 von 20 untersuchten SQCCs eine Hypermethylierung in der Promotorregion von *MEIS1* gezeigt. Da das Probenmaterial in der genannten Studie keine ADCs beinhaltete, stehen die Ergebnisse nicht im Widerspruch zu den eigenen erhobenen Daten.

Eine spätere Publikation von Rauch et al. wertete neben der DNA-Methylierung von SQCCs auch ADCs aus (Rauch et al. 2012). Dabei wird in den tabellarischen Übersichten auch *ALX3* aufgeführt. Eine Hypermethylierung des Gens wird sowohl im Zusammenhang mit ADCs als auch mit SQCCs angegeben. Dies findet Bestätigung durch die eigenen Methylierungsdaten, die ebenfalls in beiden Tumorentitäten eine Hypermethylierung im DNA-Bereich von *ALX3* nachwies.

Die Studie von Rauch et al. aus dem Jahr 2012 untersuchte des Weiteren die DNA-Methylierung von *PAX9*. Im Einklang mit den eigenen Ergebnissen zeigten sowohl ADCs als auch SQCCs in der Studie eine

Hypermethylierung des Gens (Rauch et al. 2012). Eine weitere Studie untersuchte nicht nur die DNA-Methylierung in malignen, sondern auch in fibrotischen und chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen (Wielscher et al. 2015). Dabei stellte sich eine Hypermethylierung von *PAX9* als spezifisches Merkmal von Bronchialkarzinomen heraus. Die weitere Erforschung von *PAX9* als potenziellen molekularen Marker zur Diagnosesicherung scheint daher besonders erfolgversprechend.

Zur Methylierung der untersuchten CpG-Loci im CpG-Island auf Chromosom 6 sowie in *SALRNA1* lagen keine vergleichbaren Methylierungsstudien vor.

Obwohl zu den in dieser Arbeit untersuchten CpG-Loci bislang nur wenige Methylierungsdaten zum Vergleich vorhanden waren, scheint es sich um vielversprechende Targets in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen zu handeln. Die eigenen Daten ergeben in Zusammenschau mit der vorhandenen Literatur ein homogenes Bild. Um die Bedeutung der untersuchten CpG-Loci weiter zu klären, wären zukünftig darüber hinaus weiterführende Studien mit einem größeren Probenkollektiv sinnvoll. Insbesondere die Erforschung von CpG-Loci in den Genen *PAX9*, *ALX3* und *MEIS1* scheint erfolgsversprechend.

4.2.3 Rolle von DNA-Methylierung als molekularer Biomarker in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen

Molekulare Biomarker nehmen in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen einen zunehmenden Stellenwert ein. Die Erkenntnis, dass epigenetische Veränderungen z.B. der DNA-Methylierung zu den „hallmarks of cancer initiation and progression“ gehören (Balgkouranidou et al. 2013) und dass diese Veränderungen darüber hinaus tumorspezifische Muster zeigen (Costello et al. 2000; Hoque et al. 2008; Esteller et al. 2001), hat in den vergangenen Jahren zahlreiche Methylierungsstudien ins Leben gerufen. Auch für das Bronchialkarzinom ist bereits eine Vielzahl potenzieller epigenetischer Biomarker bekannt. Ziel der Erforschung von DNA-Methylierung ist es, diese molekularen Marker in der Früherkennung und Diagnostik von Bronchialkarzinomen sowie der Entwicklung therapeutischer Regime zu nutzen.

Die vorliegende Studie untersuchte mit Hilfe der BSPS verschiedene CpG-Loci, die für die Diagnostik von Bronchialkarzinomen relevant sein könnten. Der Vergleich der Methylierungswerte in chirurgisch resezierten Gewebeproben konnte signifikante Unterschiede zwischen Tumor- und Lungengewebe bzw. ADC und SQCC an den untersuchten CpG-Loci aufdecken.

Der Nachweis hypermethylierter DNA gelang darüber hinaus auch in Paired Biopsies. Für den Einsatz in der klinischen Diagnostik ist die Möglichkeit des Nachweises aus minimal-invasiv gewonnenen Gewebeproben von entscheidender Relevanz. Nachdem die endgültigen klinischen Diagnosen bekannt wurden, stellte sich jedoch heraus, dass nur ein Teil der malignen Raumforderungen eine Hypermethylierung in den Sequenzen zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe gezeigt hatte. Von den Adenokarzinomen hatte darüber hinaus auch nur ein Teil der untersuchten Gewebeproben eine Hypermethylierung in den CpG-Loci aus *TWIST1* gezeigt. Ein möglicherweise entscheidender Faktor zum Nachweis von Hypermethylierung ist hier der Tumorzellgehalt des untersuchten Gewebes. Leider waren für die untersuchten Gewebeproben

keine Angaben zum Tumorzellgehalt der Proben vorhanden, sodass eine genauere Auswertung im Hinblick auf den Tumorzellgehalt nicht möglich war.

Entscheidende klinische Relevanz gewinnt derzeit die Differenzierung von ADCs und SQCCs (siehe Kapitel 1.1.2). Aufgrund der Heterogenität von Bronchialkarzinomen gestaltet sich diese in der histopathologischen Diagnostik anhand von kleinen Gewebeproben dementsgegen bislang schwierig. Die untersuchten CpG-Loci im Gen *TWIST1* stellen daher wichtige potenzielle Marker dar und könnten die bestehende Diagnostik um einen wesentlichen Aspekt ergänzen. Ein weiterer entscheidender Aspekt, um die Detektionsrate von Hypermethylierung zu verbessern, scheint jedoch der Tumorzellgehalt der untersuchten Gewebeproben zu sein.

Der Vergleich der erhobenen Methylierungsdaten mit der Literatur zeigte, dass die eigenen Befunde im Einklang mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen stehen. Dies unterstreicht die Rolle der untersuchten Loci als vielversprechende Targets für die Diagnostik von Bronchialkarzinomen. Ein entscheidender limitierender Faktor für den Umsatz der vorhandenen Ergebnisse in die Praxis besteht jedoch darin, dass die Daten bislang primär in akademischen Studien mit kleinen Fallzahlen und ohne klinisches Follow-Up erhoben wurden. Des Weiteren fehlen prospektive Studien. Die Vergleichbarkeit der vorhandenen Studien bleibt darüber hinaus eingeschränkt, da sie sich in einer Vielzahl methodischer Aspekte, z.B. der Art der Proben, ihrer Gewinnung und Lagerung, vor allem aber in der verwendeten Methode zur Messung von DNA-Methylierung unterscheiden (Liloglou et al. 2014). Um den Einzug von DNA-Methylierungsmarkern in die klinische Diagnostik zu ermöglichen, wäre daher eine Vereinheitlichung des Studiendesigns mit prospektiven Studien, größeren Fallzahlen und klinischem Follow-Up notwendig.

4.3 Fazit

Die vorliegende Arbeit konnte die Ergebnisse einer Methylierungsanalyse mittels HM450K BC validieren, indem sie eine Korrelation der Messwerte mit den Ergebnissen einer anderen quantitativen Messmethode, der BSPS, nachwies (siehe Kapitel 3.2, 3.5.1). Die Auswertung der Methylierungsdaten belegte darüber hinaus signifikante Methylierungsunterschiede zwischen Tumor- und Lungengewebe bzw. Adeno- und Plattenepithelkarzinom an den untersuchten CpG-Loci (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). Die untersuchten CpG-Loci stellen somit potenzielle Methylierungsmarker in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen dar. Der Vergleich mit der bestehenden Literatur unterstreicht darüber hinaus die Relevanz der untersuchten DNA-Regionen (siehe Kapitel 4.2). Die vorliegende Studie hebt sich dabei durch eine differenziertere Betrachtung von Methylierungsmustern in Abhängigkeit von der Tumorentität der Bronchialkarzinome hervor. Die Differenzierung der verschiedenen Tumorentitäten des Bronchialkarzinoms gewinnt derzeit zunehmende klinische Relevanz, unter anderem da sie therapeutische Entscheidungen in maßgebender Weise beeinflusst (siehe Kapitel 1.1.2).

In dieser Studie gelang der Nachweis von Hypermethylierung sowohl in chirurgischen Tumorsektaten, als auch in minimal-invasiv gewonnenen Gewebeproben. Die endgültige Auswertung zeigte jedoch, dass bei der Untersuchung von Biopsien Unsicherheiten hinsichtlich der Zuordnung der Tumorentität bestehen

bleiben. Um Methylierungsmarker in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen sinnvoll einsetzen zu können, ist ihre Nachweisbarkeit in Biopsien von besonderer Bedeutung. Ein wichtiger Faktor zur Optimierung der Ergebnisse scheint die Erhöhung des Tumorzellgehalts der bioptisch gewonnen Proben.

Zusammengefasst konnte die vorliegende Studie einen relevanten Beitrag zur Identifizierung von Methylierungsmarkern des Bronchialkarzinoms leisten. Insbesondere durch die direkte Gegenüberstellung des Methylierungszustands von ADC und SQCC hebt sie sich von vorherigen Studien ab. Um Methylierungsmarker in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen etablieren zu können, wäre jedoch eine Vereinheitlichung von Studiendesigns für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten sinnvoll. Schließlich könnten Methylierungsmarker die Diagnostik von Bronchialkarzinomen um einen wesentlichen Aspekt ergänzen: Durch ihr frühzeitiges Auftreten könnten sie die Entwicklung von Früherkennungsmethoden vorantreiben und auf diese Weise einen wichtigen Beitrag zur Senkung der ausgesprochen hohen Letalität dieser malignen Erkrankung leisten.

5 Zusammenfassung

In der Diagnostik von Bronchialkarzinomen gewinnen molekulare Biomarker zunehmende Bedeutung. Epigenetische Veränderungen wie die DNA-Methylierung stellen geeignete Biomarker dar, da sie bereits früh im Krankheitsverlauf auftreten und darüber hinaus tumorspezifische Muster zeigen. In der vorliegenden Arbeit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, inwieweit sich die Methylierung bestimmter CpG-Loci für die Diagnostik von Bronchialkarzinomen eignet. Im Fokus standen dabei Methylierungsunterschiede zwischen den beiden häufigsten Tumorentitäten des Bronchialkarzinoms, den Adeno- (ADC) und Plattenepithelkarzinomen (SQCC), deren Differenzierung von entscheidender klinisch-therapeutischer Relevanz ist.

Die untersuchten CpG-Loci waren zuvor im Rahmen einer quantitativen DNA-Methylierungsanalyse mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip (HM450K BC) identifiziert worden. Die Ergebnisse sollten zunächst durch den Einsatz der Bisulfitpyrosequenzierung (BSPS) validiert werden. Insgesamt wurden DNA-Methylierungswerte von 14 CpG-Loci verglichen. Als Untersuchungsmaterial dienten DNA-Proben aus OP-Resektaten (n= 20) sowie aus Paired Biopsies (n= 14). Sowohl für die OP-Präparate ($R^2= 0,89$; $p < 0,01$) als auch für die Paired Biopsies insgesamt ($R^2= 0,883$; $p < 0,001$) stellte sich eine gute Korrelation der Methylierungsdaten aus den beiden Messmethoden dar.

Die Auswertung der mittels BSPS erhobenen Methylierungsdaten aus OP-Präparaten bestätigte signifikante Unterschiede an den untersuchten CpG-Loci. Einerseits wurden CpG-Loci identifiziert, die sowohl in ADCs als auch in SQCCs eine veränderte Methylierung aufwiesen. Sie lagen in drei verschiedenen Genen (*MEIS1*, *ALX3* und *PAX9*), in einem CpG-Island und der nicht-kodierenden DNA-Region SALARNA1. Andererseits zeigten die untersuchten CpG-Loci im Gen *TWIST1* ausschließlich in ADCs eine veränderte Methylierung. An allen untersuchten CpG-Loci zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Tumorentitäten ($p < 0,001$). Darüber hinaus gelang der Nachweis einer Hypermethylierung auch in DNA-Proben aus minimal-invasiv gewonnenem Gewebe, welche in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen einen besonders hohen Stellenwert einnehmen.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob die Methylierungsunterschiede auch in einem qualitativen Messverfahren, der methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR) nachweisbar sind. Hierfür wurden je zwei Reaktionsansätze zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe bzw. ADC und SQCC etabliert. Die Durchführung an DNA aus OP-Präparaten zeigte jedoch, dass die MS-PCR insbesondere zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe weniger geeignet war als quantitative Methoden. Eine Zuordnung von ADC bzw. SQCC mit Hilfe der MS-PCR gelang hingegen in 90 % der untersuchten DNA-Proben (n = 10).

Zukünftig könnten die untersuchten CpG-Loci potenzielle Biomarker in der Diagnostik und Früherkennung von Bronchialkarzinomen darstellen und die bestehende Diagnostik um einen bedeutenden Aspekt ergänzen.

6 Literaturverzeichnis

- Aberle, D. R.; Adams, A. M.; Berg, C. D.; Black, W. C.; Clapp, J. D.; Fagerstrom, R. M.; Gareen, I. F.; Gatsonis, C.; Marcus, P. M.; Sicks, J. D. (2011): Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. In: *N Engl J Med* 365 (5), S. 395–409. DOI: 10.1056/NEJMoa1102873.
- Ahrendt, S. A.; Chow, J. T.; Xu, L. H.; Yang, S. C.; Eisenberger, C. F.; Esteller, M.; Herman, J. G.; Wu, L.; Decker, P. A.; Jen, J.; Sidransky, D. (1999): Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. In: *J Natl Cancer Inst* 91 (4), S. 332–339.
- Ahuja, N.; Issa, J. P. (2000): Aging, methylation and cancer. In: *Histol Histopathol* 15 (3), S. 835–842.
- Alberg, A. J.; Samet, J. M. (2003): Epidemiology of Lung Cancer*. In: *Chest* 123 (1), S. 21–49. DOI: 10.1378/chest.123.1_suppl.21S.
- Ammerpohl, O.; Haake, A.; Kolarova, J.; Siebert, R. (2016): Quantitative DNA Methylation Profiling in Cancer. In: *Methods Mol Biol* 1381, S. 75–92. DOI: 10.1007/978-1-4939-3204-7_5.
- Ammerpohl, O.; Martín-Subero, J. I.; Richter, J.; Vater, I.; Siebert, R. (2009): Hunting for the 5th base. Techniques for analyzing DNA methylation. In: *Biochim Biophys Acta* 1790 (9), S. 847–862. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.02.001.
- Andrey, G.; Duboule, D. (2014): SnapShot. Hox gene regulation. In: *Cell* 156 (4), 856-856.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.060.
- Ansieau, S.; Morel, A.-P.; Hinkal, G.; Bastid, J.; Puisieux, A. (2010): TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. In: *Oncogene* 29 (22), S. 3173–3184. DOI: 10.1038/onc.2010.92.
- Arányi, T.; Váradi, A.; Simon, I.; Tusnády, G. E. (2006): The BiSearch web server. In: *BMC Bioinformatics* 7, S. 431. DOI: 10.1186/1471-2105-7-431.
- Bae, Y. Kyung; Brown, A.; Garrett, E.; Bornman, D.; Fackler, M. Jo; Sukumar, S.; Herman, J. G.; Gabrielson, E. (2004): Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. In: *Clin Cancer Res* 10 (18 Pt 1), S. 5998–6005. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0667.
- Balgkouranidou, I.; Liloglou, T.; Lianidou, E. S. (2013): Lung cancer epigenetics: emerging biomarkers. In: *Biomark Med* 7 (1), S. 49–58. DOI: 10.2217/bmm.12.111.
- Baryshnikova, E.; Destro, A.; Infante, M. Valentino; Cavuto, S.; Cariboni, U.; Alloisio, M.; Ceresoli, G. Luca; Lutman, R.; Brambilla, G.; Chiesa, G.; Ravasi, G.; Roncalli, M. (2008): Molecular alterations in spontaneous sputum of cancer-free heavy smokers. Results from a large screening program. In: *Clin Cancer Res* 14 (6), S. 1913–1919. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1741.
- Baylin, S. B.; Ohm, J. E. (2006): Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? In: *Nat Rev Cancer* 6 (2), S. 107–116. DOI: 10.1038/nrc1799.
- Belinsky, S. A.; Liechty, K. C.; Gentry, F. D.; Wolf, H. J.; Rogers, J.; Vu, K.; Haney, J.; Kennedy, T. C.; Hirsch, F. R.; Miller, Y.; Franklin, W. A.; Herman, J. G.; Baylin, S. B.; Bunn, P. A.; Byers, T. (2006): Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. In: *Cancer Res* 66 (6), S. 3338–3344. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3408.
- Belinsky, S. A.; Nikula, K. J.; Palmisano, W. A.; Michels, R.; Saccomanno, G.; Gabrielson, E.; Baylin, S. B.; Herman, J. G. (1998): Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (20), S. 11891–11896.
- Bhattacharjee, A.; Richards, W. G.; Staunton, J.; Li, C.; Monti, S.; Vasa, P.; Ladd, C.; Beheshti, J.; Bueno, R.; Gillette, M.; Loda, M.; Weber, G.; Mark, E. J.; Lander, E. S.; Wong, W.; Johnson, B. E.; Golub, T. R.; Sugarbaker, D. J.;

- Meyerson, M. (2001): Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (24), S. 13790–13795. DOI: 10.1073/pnas.191502998.
- Bibikova, M.; Barnes, B.; Tsan, C.; Ho, V.; Klotzle, B.; Le, J. M.; Delano, D.; Zhang, L.; Schroth, G. P.; Gunderson, K. L.; Fan, J.-B.; Shen, R. (2011): High density DNA methylation array with single CpG site resolution. In: *Genomics* 98 (4), S. 288–295. DOI: 10.1016/j.ygeno.2011.07.007.
- Biomarkers and surrogate endpoints. Preferred definitions and conceptual framework (2001). In: *Clin Pharmacol Ther* 69 (3), S. 89–95.
- Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. In: *Genes Dev* 16 (1), S. 6–21. DOI: 10.1101/gad.947102.
- Bock, C.; Reither, S.; Mikeska, T.; Paulsen, M.; Walter, J.; Lengauer, T. (2005): BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. In: *Bioinformatics* 21 (21), S. 4067–4068. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti652.
- Brait, M.; Sidransky, D. (2011): Cancer epigenetics: above and beyond. In: *Toxicol Mech Methods* 21 (4), S. 275–288. DOI: 10.3109/15376516.2011.562671.
- Bunyan, D. J.; Bullman, H. M. S.; Lever, M.; Saminathan, S. D.; Keng, W. Teik; Araffin, R.; Robinson, D. O. (2011): Different denaturation rates between methylated and non-methylated genomic DNA can result in allele-specific PCR amplification. In: *OJGen* 01 (02), S. 13–14. DOI: 10.4236/ojgen.2011.12003.
- Ciuleanu, T.; Brodowicz, T.; Zielinski, C.; Kim, J. Hang; Krzakowski, M.; Laack, E.; Wu, Y.-L.; Bover, I.; Begbie, S.; Tzekova, V.; Cucevic, B.; Pereira, J. Rodrigues; Yang, S. Hyun; Madhavan, J.; Sugarman, K. P.; Peterson, P.; John, W. J.; Krejcy, K.; Belani, C. P. (2009): Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study. In: *Lancet* 374 (9699), S. 1432–1440. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61497-5.
- Costello, J. F.; Frühwald, M. C.; Smiraglia, D. J.; Rush, L. J.; Robertson, G. P.; Gao, X.; Wright, F. A.; Feramisco, J. D.; Peltomäki, P.; Lang, J. C.; Schuller, D. E.; Yu, L.; Bloomfield, C. D.; Caligiuri, M. A.; Yates, A.; Nishikawa, R.; Su Huang, H.; Petrelli, N. J.; Zhang, X.; O'Dorisio, M. S.; Held, W. A.; Cavenee, W. K.; Plass, C. (2000): Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. In: *Nat Genet* 24 (2), S. 132–138. DOI: 10.1038/72785.
- Deaton, A. M.; Bird, A. (2011): CpG islands and the regulation of transcription. In: *Genes Dev* 25 (10), S. 1010–1022. DOI: 10.1101/gad.2037511.
- Derks, S.; Lentjes, Marjolein H F M; Hellebrekers, Debby M E I; Bruïne, A. P. de; Herman, J. G.; van Engeland, M. (2004): Methylation-specific PCR unraveled. In: *Cell Oncol* 26 (5-6), S. 291–299.
- Devesa, S. S.; Bray, F.; Vizcaino, A. Paloma; Parkin, D. Max (2005): International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. In: *Int J Cancer* 117 (2), S. 294–299. DOI: 10.1002/ijc.21183.
- Divine, K. K.; Pulling, L. C.; Marron-Terada, P. G.; Liechty, K. C.; Kang, T.; Schwartz, A. G.; Bocklage, T. J.; Coons, T. A.; Gilliland, F. D.; Belinsky, S. A. (2005): Multiplicity of abnormal promoter methylation in lung adenocarcinomas from smokers and never smokers. In: *Int J Cancer* 114 (3), S. 400–405. DOI: 10.1002/ijc.20761.
- Esteller, M.; Corn, P. G.; Baylin, S. B.; Herman, J. G. (2001): A gene hypermethylation profile of human cancer. In: *Cancer Res* 61 (8), S. 3225–3229.
- Fackler, M. Jo; McVeigh, M.; Mehrotra, J.; Blum, M. A.; Lange, J.; Lapidus, A.; Garrett, E.; Argani, P.; Sukumar, S. (2004): Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. In: *Cancer Res* 64 (13), S. 4442–4452. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3341.
- Feinberg, A. P.; Ohlsson, R.; Henikoff, S. (2006): The epigenetic progenitor origin of human cancer. In: *Nat Rev Genet* 7 (1), S. 21–33. DOI: 10.1038/nrg1748.

- Ferlay, J.; Shin, H.-R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Parkin, D. Maxwell (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. In: *Int J Cancer* 127 (12), S. 2893–2917. DOI: 10.1002/ijc.25516.
- Field, J. K.; Oudkerk, M.; Pedersen, J. Holst; Duffy, S. W. (2013): Prospects for population screening and diagnosis of lung cancer. In: *Lancet* 382 (9893), S. 732–741. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61614-1.
- Fischle, W.; Tseng, B. Shan; Dormann, H. L.; Ueberheide, B. M.; Garcia, B. A.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Funabiki, H.; Allis, C. David (2005): Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. In: *Nature* 438 (7071), S. 1116–1122. DOI: 10.1038/nature04219.
- Flehinger, B. J.; Kimmel, M.; Melamed, M. R. (1992): The Effect of Surgical Treatment on Survival from Early Lung Cancer. In: *Chest* 101 (4), S. 1013–1018. DOI: 10.1378/chest.101.4.1013.
- Frommer, M.; McDonald, L. E.; Millar, D. S.; Collis, C. M.; Watt, F.; Grigg, G. W.; Molloy, P. L.; Paul, C. L. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (5), S. 1827–1831.
- Fu, J.; Qin, L.; He, T.; Qin, J.; Hong, J.; Wong, J.; Liao, L.; Xu, J. (2011): The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. In: *Cell Res* 21 (2), S. 275–289. DOI: 10.1038/cr.2010.118.
- Fujii, T.; Dracheva, T.; Player, A.; Chacko, S.; Clifford, R.; Strausberg, R. L.; Buetow, K.; Azumi, N.; Travis, W. D.; Jen, J. (2002): A preliminary transcriptome map of non-small cell lung cancer. In: *Cancer Res* 62 (12), S. 3340–3346.
- Futscher, B. W.; Oshiro, M. M.; Wozniak, R. J.; Holtan, N.; Hanigan, C. L.; Duan, H.; Domann, F. E. (2002): Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. In: *Nat Genet* 31 (2), S. 175–179. DOI: 10.1038/ng886.
- Goldberg, A. D.; Allis, C. David; Bernstein, E. (2007): Epigenetics. A Landscape Takes Shape. In: *Cell* 128 (4), S. 635–638. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.006.
- Gort, E. H.; Suijkerbuijk, K. P.M.; Roothaan, S. M.; Raman, V.; Vooijs, M.; van der Wall, E.; van Diest, P. J. (2008): Methylation of the TWIST1 Promoter, TWIST1 mRNA Levels, and Immunohistochemical Expression of TWIST1 in Breast Cancer. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17 (12), S. 3325–3330. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0472.
- Harrington, C. T.; Lin, E. I.; Olson, M. T.; Eshleman, J. R. (2013): Fundamentals of Pyrosequencing. In: *Arch Pathol Lab Med* 137 (9), S. 1296–1303. DOI: 10.5858/arpa.2012-0463-RA.
- Hasan, N.; Kumar, R.; Kavuru, M. S. (2014): Lung cancer screening beyond low-dose computed tomography: the role of novel biomarkers. In: *Lung* 192 (5), S. 639–648. DOI: 10.1007/s00408-014-9636-z.
- Hassanein, M.; Callison, J. Clay; Callaway-Lane, C.; Aldrich, M. C.; Grogan, E. L.; Massion, P. P. (2012): The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer. In: *Cancer Prev Res (Phila)* 5 (8), S. 992–1006. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0441.
- Hayatsu, H.; Wataya, Y.; Kai, K.; Iida, S. (1970): Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. In: *Biochemistry* 9 (14), S. 2858–2865.
- HAYATSU, H. (2008): Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis — A personal account. In: *Proc Jpn Acad, Ser B* 84 (8), S. 321–330. DOI: 10.2183/pjab.84.321.
- Hoque, M. Obaidul; Kim, M. Sook; Ostrow, K. Laskie; Liu, J.; Wisman, G. Bea A.; Park, H. Lui; Poeta, M. Luana; Jeronimo, C.; Henrique, R.; Lendvai, A.; Schuurin, E.; Begum, S.; Rosenbaum, E.; Ongenaert, M.; Yamashita, K.; Califano, J.; Westra, W.; van der Zee, Ate G J; van Criekinge, W.; Sidransky, D. (2008): Genome-wide promoter analysis uncovers portions of the cancer methylome. In: *Cancer Res* 68 (8), S. 2661–2670. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5913.
- Horvath, S. (2013): DNA methylation age of human tissues and cell types. In: *Genome Biol* 14 (10), R115. DOI: 10.1186/gb-2013-14-10-r115.

- Hsu, D. S.; Acharya, C. R.; Balakumaran, B. S.; Riedel, R. F.; Kim, M. K.; Stevenson, M.; Tuchman, S.; Mukherjee, S.; Barry, W.; Dressman, H. K.; Nevins, J. R.; Powers, S.; Mu, D.; Potti, A. (2009): Characterizing the developmental pathways TTF-1, NKX2-8, and PAX9 in lung cancer. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (13), S. 5312–5317. DOI: 10.1073/pnas.0900827106.
- Illingworth, R. S.; Gruenewald-Schneider, U.; Webb, S.; Kerr, A. R. W.; James, K. D.; Turner, D. J.; Smith, C.; Harrison, D. J.; Andrews, R.; Bird, A. P. (2010): Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. In: *PLoS Genet* 6 (9), e1001134. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001134.
- Jaenisch, R.; Bird, A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression. How the genome integrates intrinsic and environmental signals. In: *Nat Genet* 33 Suppl, S. 245–254. DOI: 10.1038/ng1089.
- Johnson, D. H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W. F.; Herbst, R. S.; Nemunaitis, J. J.; Jablons, D. M.; Langer, C. J.; DeVore, R. F.; Gaudreault, J.; Damico, L. A.; Holmgren, E.; Kabbinar, F. (2004): Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. In: *J Clin Oncol* 22 (11), S. 2184–2191. DOI: 10.1200/JCO.2004.11.022.
- Jones, P. A.; Baylin, S. B. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. In: *Nat Rev Genet* 3 (6), S. 415–428. DOI: 10.1038/nrg816.
- Jones, P. A.; Baylin, S. B. (2007): The Epigenomics of Cancer. In: *Cell* 128 (4), S. 683–692. DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.029.
- Jones, P. A.; Takai, D. (2001): The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. In: *Science* 293 (5532), S. 1068–1070. DOI: 10.1126/science.1063852.
- Jones, P. L.; Veenstra, G. J.; Wade, P. A.; Vermaak, D.; Kass, S. U.; Landsberger, N.; Strouboulis, J.; Wolffe, A. P. (1998): Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. In: *Nat Genet* 19 (2), S. 187–191. DOI: 10.1038/561.
- Kass, S. U.; Landsberger, N.; Wolffe, A. P. (1997): DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. In: *Curr Biol* 7 (3), S. 157–165.
- Kibbe, W. A. (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. In: *Nucleic Acids Res* 35 (Web Server issue), S. 6. DOI: 10.1093/nar/gkm234.
- Kim, J. Seuk; Han, J.; Shim, Y. Mog; Park, J.; Kim, D.-H. (2005): Aberrant methylation of H-cadherin (CDH13) promoter is associated with tumor progression in primary nonsmall cell lung carcinoma. In: *Cancer* 104 (9), S. 1825–1833. DOI: 10.1002/cncr.21409.
- Knudson, A. G. (1971): Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (4), S. 820–823.
- Kropf-Sanchen, C.; Merk, J. (2013): Epidemiologie und Ätiologie von Lungentumoren. In: *TumorDiagnostik und Therapie* (34), S. 438–443.
- Ku, J.-L.; Jeon, Y.-K.; Park, J.-G. (2011): Methylation-specific PCR. In: *Methods Mol Biol* 791, S. 23–32. DOI: 10.1007/978-1-61779-316-5_3.
- Kwon, M. Jung; Kwon, J. Hyun; Nam, E. Sook; Shin, H. Sik; Lee, D. Jin; Kim, J. Hwan; Rho, Y. Soo; Sung, C. Ohk; Lee, W. Jae; Cho, S. Jin (2013): TWIST1 promoter methylation is associated with prognosis in tonsillar squamous cell carcinoma. In: *Hum Pathol* 44 (9), S. 1722–1729. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.03.004.
- Laird, P. W. (2003): Early detection. The power and the promise of DNA methylation markers. In: *Nat Rev Cancer* 3 (4), S. 253–266. DOI: 10.1038/nrc1045.
- Le Bras, G. F.; Taubenslag, K. J.; Andl, C. D. (2012): The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. In: *Cell Adh Migr* 6 (4), S. 365–373. DOI: 10.4161/cam.21326.

- Ledergerber, C.; Dessimoz, C. (2011): Base-calling for next-generation sequencing platforms. In: *Brief Bioinformatics* 12 (5), S. 489–497. DOI: 10.1093/bib/bbq077.
- Liloglou, T.; Bediaga, N. G.; Brown, B. R. B.; Field, J. K.; Davies, M. P. A. (2014): Epigenetic biomarkers in lung cancer. In: *Cancer Lett* 342 (2), S. 200–212. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.04.018.
- Lin, Q.; Geng, J.; Ma, K.; Yu, J.; Sun, J.; Shen, Z.; Bao, G.; Chen, Y.; Zhang, H.; He, Y.; Luo, X.; Feng, X.; Zhu, J. (2009): RASSF1A, APC, ESR1, ABCB1 and HOXC9, but not p16INK4A, DAPK1, PTEN and MT1G genes were frequently methylated in the stage I non-small cell lung cancer in China. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 135 (12), S. 1675–1684. DOI: 10.1007/s00432-009-0614-4.
- Lindeman, N. I.; Cagle, P. T.; Beasley, M. Beth; Chitale, D. Arun; Dacic, S.; Giaccone, G.; Jenkins, R. Brian; Kwiatkowski, D. J.; Saldivar, J.-S.; Squire, J.; Thunnissen, E.; Ladanyi, M. (2013): Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. In: *J Thorac Oncol* 8 (7), S. 823–859. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318290868f.
- Loo, P. Sun; Thomas, S. C.; Nicolson, M. C.; Fyfe, M. N.; Kerr, K. M. (2010): Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. In: *J Thorac Oncol* 5 (4), S. 442–447. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181d40fac.
- Martin, T. A.; Goyal, A.; Watkins, G.; Jiang, W. G. (2005): Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. In: *Ann Surg Oncol* 12 (6), S. 488–496. DOI: 10.1245/ASO.2005.04.010.
- Maunakea, A. K.; Nagarajan, R. P.; Bilenky, M.; Ballinger, T. J.; D'Souza, C.; Fouse, S. D.; Johnson, B. E.; Hong, C.; Nielsen, C.; Zhao, Y.; Turecki, G.; Delaney, A.; Varhol, R.; Thiessen, N.; Shchors, K.; Heine, V. M.; Rowitch, D. H.; Xing, X.; Fiore, C.; Schillebeeckx, M.; Jones, S. J. M.; Haussler, D.; Marra, M. A.; Hirst, M.; Wang, T.; Costello, J. F. (2010): Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. In: *Nature* 466 (7303), S. 253–257. DOI: 10.1038/nature09165.
- Mehta, A.; Dobersch, S.; Romero-Olmedo, A. J.; Barreto, G. (2015): Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy. In: *Cancer Metastasis Rev* 34 (2), S. 229–241. DOI: 10.1007/s10555-015-9563-3.
- Mironchik, Y.; Winnard, P. T.; Vesuna, F.; Kato, Y.; Wildes, F.; Pathak, A. P.; Kominsky, S.; Artemov, D.; Bhujwala, Z.; van Diest, P.; Burger, H.; Glackin, C.; Raman, V. (2005): Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. In: *Cancer Res* 65 (23), S. 10801–10809. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0712.
- Mok, T. S.; Wu, Y.-L.; Thongprasert, S.; Yang, C.-H.; Chu, D.-T.; Saijo, N.; Sunpaweravong, P.; Han, B.; Margono, B.; Ichinose, Y.; Nishiwaki, Y.; Ohe, Y.; Yang, J.-J.; Chewaskulyong, B.; Jiang, H.; Duffield, E. L.; Watkins, C. L.; Armour, A. A.; Fukuoka, M. (2009): Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. In: *N Engl J Med* 361 (10), S. 947–957. DOI: 10.1056/NEJMoa0810699.
- Molina, J. R.; Adjei, A. A.; Jett, J. R. (2006): Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer. In: *Chest* 130 (4), S. 1211–1219. DOI: 10.1378/chest.130.4.1211.
- Nan, X.; Ng, H. H.; Johnson, C. A.; Laherty, C. D.; Turner, B. M.; Eisenman, R. N.; Bird, A. (1998): Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. In: *Nature* 393 (6683), S. 386–389. DOI: 10.1038/30764.
- Nanavaty, P.; Alvarez, M. S.; Alberts, W. Michael (2014): Lung cancer screening: advantages, controversies, and applications. In: *Cancer Control* 21 (1), S. 9–14.
- Nelson, H. H.; Marsit, C. J.; Christensen, B. C.; Houseman, E. Andres; Kontic, M.; Wiemels, J. L.; Karagas, M. R.; Wrensch, M. R.; Zheng, S.; Wiencke, J. K.; Kelsey, K. T. (2012): Key epigenetic changes associated with lung cancer development. Results from dense methylation array profiling. In: *Epigenetics* 7 (6), S. 559–566. DOI: 10.4161/epi.20219.

- Nicholson, A. G.; Gonzalez, D.; Shah, P.; Pynegar, M. J.; Deshmukh, M.; Rice, A.; Popat, S. (2010): Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. In: *J Thorac Oncol* 5 (4), S. 436–441. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181c6ed9b.
- Okada, T.; Suehiro, Y.; Ueno, K.; Mitomori, S.; Kaneko, S.; Nishioka, M.; Okayama, N.; Sakai, K.; Higaki, S.; Hazama, S.; Hirata, H.; Sakaida, I.; Oka, M.; Hinoda, Y. (2010): TWIST1 hypermethylation is observed frequently in colorectal tumors and its overexpression is associated with unfavorable outcomes in patients with colorectal cancer. In: *Genes Chromosomes Cancer* 49 (5), S. 452–462. DOI: 10.1002/gcc.20755.
- Ou, S.-H. Ignatius; Zell, J. A. (2009): Carcinoma NOS is a common histologic diagnosis and is increasing in proportion among non-small cell lung cancer histologies. In: *J Thorac Oncol* 4 (10), S. 1202–1211. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181b28fb9.
- Patz, E. F.; Goodman, P. C.; Bepler, G. (2000): Screening for lung cancer. In: *N Engl J Med* 343 (22), S. 1627–1633. DOI: 10.1056/NEJM200011303432208.
- Pulling, L. C.; Divine, K. K.; Klinge, D. M.; Gilliland, F. D.; Kang, T.; Schwartz, A. G.; Bocklage, T. J.; Belinsky, S. A. (2003): Promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. More common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression. In: *Cancer Res* 63 (16), S. 4842–4848.
- Quinlan, A. R.; Stewart, D. A.; Strömberg, M. P.; Marth, G. T. (2008): Pyrobayes. An improved base caller for SNP discovery in pyrosequences. In: *Nat Methods* 5 (2), S. 179–181. DOI: 10.1038/nmeth.1172.
- Rauch, T. A.; Wang, Z.; Wu, X.; Kernstine, K. H.; Riggs, A. D.; Pfeifer, G. P. (2012): DNA methylation biomarkers for lung cancer. In: *Tumour Biol* 33 (2), S. 287–296. DOI: 10.1007/s13277-011-0282-2.
- Rauch, T. A.; Zhong, X.; Wu, X.; Wang, M.; Kernstine, K. H.; Wang, Z.; Riggs, A. D.; Pfeifer, G. P. (2008): High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (1), S. 252–257. DOI: 10.1073/pnas.0710735105.
- Roessler, J.; Ammerpohl, O.; Gutwein, J.; Hasemeier, B.; Anwar, S. Lukman; Kreipe, H.; Lehmann, U. (2012): Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc. In: *BMC Res Notes* 5, S. 210. DOI: 10.1186/1756-0500-5-210.
- Sakamoto, A.; Akiyama, Y.; Shimada, S.; Zhu, W.-G.; Yuasa, Y.; Tanaka, S. (2015): DNA Methylation in the Exon 1 Region and Complex Regulation of Twist1 Expression in Gastric Cancer Cells. In: *PLoS ONE* 10 (12), e0145630. DOI: 10.1371/journal.pone.0145630.
- Sandoval, J.; Heyn, H.; Moran, S.; Serra-Musach, J.; Pujana, M. A.; Bibikova, M.; Esteller, M. (2014): Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. In: *Epigenetics* 6 (6), S. 692–702. DOI: 10.4161/epi.6.6.16196.
- Saxonov, S.; Berg, P.; Brutlag, D. L. (2006): A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (5), S. 1412–1417. DOI: 10.1073/pnas.0510310103.
- Scagliotti, G.; Hanna, N.; Fossella, F.; Sugarman, K.; Blatter, J.; Peterson, P.; Simms, L.; Shepherd, F. A. (2009): The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two Phase III studies. In: *Oncologist* 14 (3), S. 253–263. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0232.
- Scagliotti, G. Vittorio; Parikh, P.; Pawel, J. von; Biesma, B.; Vansteenkiste, J.; Manegold, C.; Serwatowski, P.; Gatzemeier, U.; Digumarti, R.; Zukin, M.; Lee, J. S.; Mellempgaard, A.; Park, K.; Patil, S.; Rolski, J.; Goksel, T.; Marinis, F. de; Simms, L.; Sugarman, K. P.; Gandara, D. (2008): Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. In: *J Clin Oncol* 26 (21), S. 3543–3551. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.0375.

- Salamat, S. A.; Galler, J. S.; Joshi, A. D.; Fyfe, M. Nicky; Campan, M.; Siegmund, K. D.; Kerr, K. M.; Laird-Offringa, I. A. (2011): DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. In: *PLoS ONE* 6 (6), e21443. DOI: 10.1371/journal.pone.0021443.
- Sen-Yo, M.; Suehiro, Y.; Kaino, S.; Sakaida, I. (2013): TWIST1 hypermethylation is observed in pancreatic cancer. In: *Biomed Rep* 1 (1), S. 31–33. DOI: 10.3892/br.2012.25.
- Shapiro, R.; DiFate, V.; Welcher, M. (1974): Deamination of cytosine derivatives by bisulfite. Mechanism of the reaction. In: *J Am Chem Soc* 96 (3), S. 906–912.
- Sharma, S.; Kelly, T. K.; Jones, P. A. (2010): Epigenetics in cancer. In: *Carcinogenesis* 31 (1), S. 27–36. DOI: 10.1093/carcin/bgp220.
- Spira, A.; Beane, J.; Shah, V.; Liu, G.; Schembri, F.; Yang, X.; Palma, J.; Brody, J. S. (2004): Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (27), S. 10143–10148. DOI: 10.1073/pnas.0401422101.
- Spira, A.; Beane, J. E.; Shah, V.; Steiling, K.; Liu, G.; Schembri, F.; Gilman, S.; Dumas, Y.-M.; Calner, P.; Sebastiani, P.; Sridhar, S.; Beamis, J.; Lamb, C.; Anderson, T.; Gerry, N.; Keane, J.; Lenburg, M. E.; Brody, J. S. (2007): Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. In: *Nat Med* 13 (3), S. 361–366. DOI: 10.1038/nm1556.
- Stewart, Bernard W.; Wild, Christopher P.100 (2014): World Cancer Report 2014. Online-Ausg. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization (EBL-Schweitzer).
- Struhl, K. (1998): Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. In: *Genes Dev* 12 (5), S. 599–606.
- Takeuchi, T.; Tomida, S.; Yatabe, Y.; Kosaka, T.; Osada, H.; Yanagisawa, K.; Mitsudomi, T.; Takahashi, T. (2006): Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. In: *J Clin Oncol* 24 (11), S. 1679–1688. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.8224.
- Tanoue, L. T.; Tanner, N. T.; Gould, M. K.; Silvestri, G. A. (2015): Lung cancer screening. In: *Am J Respir Crit Care Med* 191 (1), S. 19–33. DOI: 10.1164/rccm.201410-1777CI.
- Thiery, J. Paul; Acloque, H.; Huang, R. Y. J.; Nieto, M. Angela (2009): Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. In: *Cell* 139 (5), S. 871–890. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Tian, W.; Li, Y.-S.; Zhang, J.-H.; Li, J.-J.; Gao, J.-H. (2018): Comprehensive Analysis of DNA Methylation and Gene Expression Datasets Identified MMP9 and TWIST1 as Important Pathogenic Genes of Lung Adenocarcinoma. In: *DNA Cell Biol* 37 (4), S. 336–346. DOI: 10.1089/dna.2017.4085.
- Tong, L.; Spitz, M. R.; Fueger, J. J.; Amos, C. A. (1996): Lung carcinoma in former smokers. In: *Cancer* 78 (5), S. 1004–1010. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960901)78:5<1004::AID-CNCR10>3.0.CO;2-6.
- Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. (2015): Global cancer statistics, 2012. In: *CA Cancer J Clin* 65 (2), S. 87–108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- Tost, J.; Gut, I. G. (2007): DNA methylation analysis by pyrosequencing. In: *Nat Protoc* 2 (9), S. 2265–2275. DOI: 10.1038/nprot.2007.314.
- Travis, W. D.; Brambilla, E.; Nicholson, A. G.; Yatabe, Y.; Austin, J. H. M.; Beasley, M. Beth; Chirieac, L. R.; Dacic, S.; Duhig, E.; Flieder, D. B.; Geisinger, K.; Hirsch, F. R.; Ishikawa, Y.; Kerr, K. M.; Noguchi, M.; Pelosi, G.; Powell, C. A.; Tsao, M. Sound; Wistuba, I. (2015): The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. In: *J Thorac Oncol* 10 (9), S. 1243–1260. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630.
- Travis, W. D.; Rekhtman, N.; Riley, G. J.; Geisinger, K. R.; Asamura, H.; Brambilla, E.; Garg, K.; Hirsch, F. R.; Noguchi, M.; Powell, C. A.; Rusch, V. W.; Scagliotti, G.; Yatabe, Y. (2010): Pathologic diagnosis of advanced lung cancer

- based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. In: *J Thorac Oncol* 5 (4), S. 411–414. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181d57f6e.
- Tsou, J. A.; Galler, J. S.; Siegmund, K. D.; Laird, P. W.; Turla, S.; Cozen, W.; Hagen, J. A.; Koss, M. N.; Laird-Offringa, I. A. (2007): Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. In: *Mol Cancer* 6, S. 70. DOI: 10.1186/1476-4598-6-70.
- Tusnády, G. E.; Simon, I.; Váradi, A.; Arányi, T. (2005): BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. In: *Nucleic Acids Res* 33 (1), S. e9. DOI: 10.1093/nar/gni012.
- van der Auwera, I.; Bovie, C.; Svensson, C.; Limame, R.; Trinh, X. B.; van Dam, P.; van Laere, S. J.; van Marck, E.; Vermeulen, P. B.; Dirix, L. Y. (2009): Quantitative assessment of DNA hypermethylation in the inflammatory and non-inflammatory breast cancer phenotypes. In: *Cancer Biol Ther* 8 (23), S. 2252–2259.
- Waddington, C. H. (1942): The epigenotype. In: *Endeavour*, S. 18–20.
- Weber, M.; Schübeler, D. (2007): Genomic patterns of DNA methylation. Targets and function of an epigenetic mark. In: *Curr Opin Cell Biol* 19 (3), S. 273–280. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.04.011.
- Wielscher, M.; Vierlinger, K.; Kegler, U.; Ziesche, R.; Gsur, A.; Weinhäusel, A. (2015): Diagnostic Performance of Plasma DNA Methylation Profiles in Lung Cancer, Pulmonary Fibrosis and COPD. In: *EBioMedicine* 2 (8), S. 929–936. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.06.025.
- Yanagawa, N.; Tamura, G.; Oizumi, H.; Takahashi, N.; Shimazaki, Y.; Motoyama, T. (2003): Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. In: *Cancer Sci* 94 (7), S. 589–592.
- Yang, J.; Mani, S. A.; Donaher, J. Liu; Ramaswamy, S.; Itzykson, R. A.; Come, C.; Savagner, P.; Gitelman, I.; Richardson, A.; Weinberg, R. A. (2004): Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. In: *Cell* 117 (7), S. 927–939. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.006.
- Zhao, Z.; Rahman, M. Aminur; Chen, Z. G.; Shin, D. M. (2017): Multiple biological functions of Twist1 in various cancers. In: *Oncotarget* 8 (12), S. 20380–20393. DOI: 10.18632/oncotarget.14608.
- Zhu, D.-Y.; Guo, Q.-S.; Li, Y.-L.; Cui, B.; Guo, J.; Liu, J.-X.; Li, P. (2014): Twist1 correlates with poor differentiation and progression in gastric adenocarcinoma via elevation of FGFR2 expression. In: *World J Gastroenterol* 20 (48), S. 18306–18315. DOI: 10.3748/wjg.v20.i48.18306.

7 Anhang

Ergänzende Tabellen

Tabelle 16: Übersicht über die Ergebnisse der Bisulfitpyrosequenzierung im Bereich des Gens *TWIST1* und statistische Auswertung

		Methylierung [%]		Vergleich ADC und Lunge (paired)		Vergleich SQCC und Lunge (paired)		Vergleich ADC und SQCC
		ADC (n=7) MW (SD)	SQCC (n=8) MW (SD)	Wilcoxon (p)	Mittlere Differenz	Wilcoxon (p)	Mittlere Differenz	Mann-Whitney-U-Test (p)
Seq. 1	Pos. 1	35,7 (11,9)	5,0 (3,6)	0,012	29,39	0,260	-2,34	1,645 E-4
	Pos. 2	33,4 (11,5)	3,9 (2,6)	0,012	27,78	0,214	-1,86	3,291 E-4
	Mean	34,5 (11,2)	4,5 (2,6)	0,012	28,59	0,214	-2,02	1,645 E-4
Seq. 2	Pos. 1	58,1 (17,2)	9,0 (14,9)	0,017	47,25	0,028	-7,75	3,291 E-4
	Pos. 2	57,4 (19,5)	8,6 (15,2)	0,017	45,81	0,066	-6,60	3,291 E-4
	Pos. 3	57,9 (18,4)	9,4 (14,7)	0,012	45,46	0,110	-5,93	3,291 E-4
	Pos. 4	47,3 (21,9)	5,1 (12,8)	0,025	38,97	0,036	-7,23	3,291 E-4
	Pos. 5	47,2 (19,5)	9,3 (13,1)	0,017	39,67	0,594	-1,57	3,291 E-4
	Mean	53,6 (18,7)	8,3 (13,9)	0,017	43,43	0,086	-6,11	3,291 E-4
Seq. 3	Pos. 1	63,5 (15,1)	1,4 (1,2)	0,012	59,50	0,012	-3,26	8,277 E-5
	Pos. 2	65,1 (18,1)	2,4 (1,4)	0,012	60,63	0,008	-3,05	8,277 E-5
	Pos. 3	61,4 (19,5)	4,2 (2,0)	0,012	56,17	0,173	-1,73	8,277 E-5
	Pos. 4	57,7 (18,8)	3,6 (1,7)	0,012	51,40	0,008	-3,22	8,277 E-5
	Mean	61,9 (17,1)	2,9 (1,0)	0,012	56,92	0,008	-2,82	8,277 E-5
Seq. 4.1	Pos. 1	74,6 (20,2)	4,1 (2,8)	0,012	71,19	0,953	0,66	8,277 E-5
	Pos. 2	61,7 (24,9)	2,5 (1,3)	0,012	58,42	0,110	-0,93	8,277 E-5
	Pos. 3	60,2 (14,5)	3,7 (2,3)	0,012	56,39	0,767	-0,75	8,277 E-5
	Mean	65,5 (18,8)	3,4 (1,2)	0,012	62,00	0,314	-0,34	8,277 E-5
Seq. 4.2	Pos. 1	69,7 (22,0)	3,3 (3,4)	0,012	65,29	0,398	-3,17	8,277 E-5
	Pos. 2	54,7 (24,9)	10,1 (21,0)	0,012	51,13	0,553	6,93	0,002
	Mean	62,2 (21,1)	6,7 (11,1)	0,012	58,21	0,767	1,88	1,645 E-4
Seq. 5	Pos. 1	70,8 (13,3)	6,2 (3,5)	0,012	60,03	0,038	-2,72	8,277 E-5
	Pos. 2	53,8 (11,9)	1,5 (2,5)	0,012	50,23	0,237	-1,40	8,277 E-5
	Pos. 3	62,2 (14,9)	2,9 (2,4)	0,012	54,67	0,015	-4,23	8,277 E-5
	Mean	62,3 (13,2)	3,6 (2,0)	0,012	54,98	0,011	-3,36	8,277 E-5

ADC = Adenokarzinom ; SQCC = Plattenepithelkarzinom ; Seq. = Sequenz ; Pos. = CpG-Position des BSPS-Assays, MW = Mittelwert ; SD = Standardabweichung.

Tabelle 17: Übersicht über die Ergebnisse der Bisulfitypyrosequenzierung in den Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe und statistische Auswertung

		Methylierung [%]		Vergleich Tumor und Lunge		Vergleich von ADC und SQCC
		Tumor (n=12) MW (SD)	Lunge (n=12) MW (SD)	Wilcoxon (p)	Mittlere Differenz	Mann-Whitney-U-Test (p)
Assay 1 PAX9	Pos. 1	54,6 (25,2)	8,4 (1,6)	0,002	46,2	0,432
	Pos. 2	54,9 (23,0)	12,5 (1,7)	0,003	42,4	0,343
	Pos. 3	57,6 (23,9)	14,6 (1,6)	0,003	42,9	0,432
	Pos. 4	56,0 (23,7)	14,8 (2,0)	0,003	41,2	0,343
	Pos. 5	52,0 (24,0)	10,5 (1,3)	0,003	41,5	0,343
	Pos. 6	51,1 (21,5)	10,8 (1,3)	0,002	40,3	0,639
	Mean	54,4 (23,4)	11,9 (1,2)	0,003	42,4	0,530
Assay 2 cg2332	Pos. 1	72,5 (12,4)	19,2 (3,2)	0,002	53,3	0,268
	Pos. 2	76,0 (10,8)	22,7 (3,1)	0,002	53,3	0,268
	Pos. 3	75,5 (11,7)	22,8 (2,2)	0,002	52,7	0,202
	Mean	74,6 (11,6)	21,6 (2,5)	0,002	53,1	0,202
Assay 3 cg1810	Pos. 1	54,4 (22,8)	6,0 (1,6)	0,002	48,4	0,639
	Pos. 2	50,9 (23,0)	3,8 (1,2)	0,002	47,1	0,639
	Mean	52,6 (22,9)	4,9 (1,3)	0,002	47,8	0,639
Assay 4 MEI31	Pos. 1	48,0 (16,3)	9,4 (3,4)	0,002	38,6	1,000
	Pos. 2	54,9 (13,3)	12,2 (3,1)	0,002	42,7	0,530
	Pos. 3	57,5 (14,3)	14,9 (3,6)	0,002	42,8	1,000
	Mean	53,5 (14,3)	12,2 (3,3)	0,002	41,37	0,755
Assay 5 cg0239	Pos. 1	51,6 (18,8)	17,7 (1,6)	0,002	33,9	0,030
	Pos. 2	45,9 (19,9)	17,0 (1,7)	0,002	28,9	0,106
	Pos. 3	45,2 (22,0)	20,8 (3,1)	0,005	24,4	0,343
	Pos. 4	50,1 (17,9)	15,2 (2,5)	0,002	35,0	0,030
	Pos. 5	55,4 (18,6)	22,1 (2,3)	0,002	33,3	0,073
	Mean	49,7 (18,7)	18,6 (1,6)	0,002	31,1	0,073
Assay 6 cg2262	Pos. 1	50,0 (16,8)	17,9 (1,6)	0,002	32,2	0,202
	Pos. 2	47,0 (19,1)	18,7 (1,9)	0,002	28,2	0,343
	Pos. 3	43,7 (19,4)	21,5 (1,9)	0,004	22,2	0,268
	Pos. 4	51,0 (16,2)	16,0 (2,1)	0,002	35,0	0,106
	Pos. 5	53,6 (15,8)	22,4 (2,6)	0,002	31,2	0,073
	Pos. 6	48,9 (14,9)	16,7 (2,4)	0,002	30,2	0,149
	Mean	48,7 (16,4)	18,9 (1,8)	0,002	29,8	0,106
Assay 7 ALX3	Pos. 1	67,7 (13,9)	33,1 (3,3)	0,002	34,5	0,343
	Pos. 2	60,0 (21,9)	14,1 (1,7)	0,002	45,9	1,000
	Pos. 3	59,0 (20,7)	14,9 (1,8)	0,002	44,1	0,639
	Mean	62,2 (17,8)	20,7 (1,9)	0,002	41,5	0,755

ADC = Adenokarzinom ; SQCC = Plattenepithelkarzinom ; Seq. = Sequenz ; Pos. = CpG-Position des BSPS-Assays, MW = Mittelwert ; SD = Standardabweichung.

Tabelle 18: Korrelation der Methylierungsdaten mit klinischen Parametern

Signifikante Korrelationen sind durch * markiert.

	Gewebe	Alter [Spearman-rho (p)]	Geschlecht [Spearman-rho (p)]	Eindringtiefe (pT-Stadium) [Spearman-rho (p)]	Nodalstatus (pN-Stadium) [Spearman-rho (p)]
<i>TWIST1</i>	Tumor	-0,431 (0,6E-5)*	0,057 (0,567)	0,239 (0,015)*	0,337 (0,001)*
alle Sequenzen	Lunge	0,118 (0,237)	-0,151 (0,131)	-	-
Assay 1 <i>PAX9</i>	Tumor	-0,077 (0,811)	0,0000 (1,0)	-0,069 (0,832)	-0,063 (0,846)
	Lunge	-0,650 (0,022)*	0,386 (0,215)		
Assay 2 cg2332	Tumor	-0,292 (0,358)	0,097 (0,765)	0,008 (0,981)	-0,063 (0,846)
	Lunge	-0,039 (0,905)	0,048 (0,882)	-	-
Assay 3 cg1810	Tumor	-0,014 (0,965)	0,000 (1,000)	0,569 (0,183)	-0,138 (0,669)
	Lunge	-0,257 (0,421)	0,386 (0,215)		
Assay 4 <i>MEIS1</i>	Tumor	0,123 (0,703)	-0,290 (0,361)	0,023 (0,944)	-0,158 (0,625)
	Lunge	-0,232 (0,468)	0,241 (0,450)		
Assay 5 cg0239	Tumor	-0,070 (0,828)	-0,097 (0,765)	0,176 (0,585)	-0,118 (0,714)
	Lunge	0,018 (0,957)	-0,048 (0,882)		
Assay 6 cg2262	Tumor	-0,032 (0,922)	-0,145 (0,653)	0,092 (0,777)	0,142 (0,660)
	Lunge	0,102 (0,753)	-0,145 (0,653)		
Assay 7 <i>ALX3</i>	Tumor	-0,158 (0,623)	-0,145 (0,653)	-0,336 (0,286)	-0,185 (0,564)
	Lunge	-0,028 (0,931)	0,097 (0,765)		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gegenüberstellung von Inzidenz und Mortalität des Bronchialkarzinoms im Vergleich mit Kolon-/ Rektum-, Mamma- und Prostatakarzinom aus dem Jahr 2012. Daten nach Schätzungen von GLOBOCAN 2012 beruhend auf Daten aus 184 Ländern	1
Abbildung 2: Klassifikation des Bronchialkarzinoms.....	3
Abbildung 3 Chemischer Ablauf der Bisulfitkonversion von Cytosin zu Uracil	23
Abbildung 4: Bisulfitkonversion von genomischer DNA	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Bisulfit-Pyrosequenzierung.....	26
Abbildung 6: Pyrogramm der methylierten Kontrolle (MK) der Sequenz 3 aus dem <i>TWIST1</i> -Gen	31
Abbildung 7: Optimierung der PCR-Bedingungen für Sequenz 1 (A) und Sequenz 5 (B) aus <i>TWIST1</i> an Kontrollen	35
Abbildung 8: Ablauf der Assayoptimierung für die Sequenzen aus <i>TWIST1</i>	36
Abbildung 9: Vergleich der Messwerte aus HumanMethylation450K Bead Chip (HM450K BC) und Bisulfitpyrosequenzierung (BSPS).....	37
Abbildung 10: Darstellung des Methylierungsgrades im <i>TWIST1</i> -Gen als Lollipop-Diagramm	38
Abbildung 11: A Darstellung der Methylierung im Gen <i>TWIST1</i> als Box Plot: Vergleich von Lungengewebe, Adeno- und Plattenepithelkarzinom	39
Abbildung 12: Individuelle Auswertung der Proben im Hinblick auf Hypermethylierung im Gen <i>TWIST1</i>	41
Abbildung 13: Darstellung der Methylierung als Box Plot: Vergleich von Lungen- und Tumorgewebe	43
Abbildung 14: Individuelle Auswertung der Proben im Hinblick auf Hypermethylierung	45
Abbildung 15: Vergleich der Messwerte aus HumanMethylation450K Bead Chip (HM450K BC) und Bisulfitpyrosequenzierung (BSPS).....	47
Abbildung 16: Differenz zwischen den Messwerten aus HM450K BC und BSPS	48
Abbildung 17: Individuelle Auswertung der Paired Biopsies im Hinblick auf Hypermethylierung	50
Abbildung 18: Darstellung der Methylierung als Box Plot: Vergleich der Methylierungsdaten aus Paired Biopsies	52
Abbildung 19: Darstellung der Methylierung als Box Plot: Vergleich der Methylierungsdaten aus Paired Biopsies im Gen <i>TWIST1</i>)	53
Abbildung 20: Methylierungsspezifische PCR. Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte für cg18103859 (A) und cg05877497 (B).....	56
Abbildung 21: Methylierungsspezifische PCR. Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte für cg20052718 (A) und cg17839237 (B) aus <i>TWIST1</i>	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: DNA-Proben aus OP-Präparaten von Patienten mit Bronchialkarzinom.....	13
Tabelle 2: DNA-Proben aus Paired Biopsies von Patienten mit Raumforderung(en) in der Lunge	14
Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller	14
Tabelle 4: Verwendete Gerätschaften mit Modellnummern und deren Hersteller	16
Tabelle 5: Verwendete Kits mit deren Komponenten und Hersteller.....	16
Tabelle 6: Software, Versionen und deren Vertreiber bzw. Internetdomäne	17
Tabelle 7: Primersequenzen und ihre Bezeichnung für die Bisulfit-Pyrosequenzierung (BSPS) sowie deren Schmelztemperaturen und Modifikationen	18
Tabelle 8: Primersequenzen und ihre Bezeichnung für die methylierungsspezifische PCR mit Angabe der Schmelztemperatur	20
Tabelle 9: Übersicht über die Lage der untersuchten CpG-Loci	21
Tabelle 10: Optimierte PCR-Bedingungen der Assays für die Pyrosequenzierung	28
Tabelle 11: Optimierte PCR-Bedingungen der Primer für methylierte bzw. unmethylierte DNA in der MS-PCR. 33	
Tabelle 12: Methylierungsgrad der verschiedenen Gewebearten im Gen <i>TWIST1</i> und der berechnete Normalbereich	40
Tabelle 13: Methylierungsgrad von Tumor und Lungengewebe in den Assays 1-7 mit den berechneten Normalbereichen	44
Tabelle 14 A + B: Methylierungsgrad des Lungengewebes in den verschiedenen Assays sowie die neu errechneten Grenzen des Normalbereichs.....	49
Tabelle 15: Übersicht über die Ergebnisse von Methylierungs- und Expressionsstudien zu <i>TWIST1</i>	63
Tabelle 16: Übersicht über die Ergebnisse der Bisulfitpyrosequenzierung im Bereich des Gens <i>TWIST1</i> und statistische Auswertung.....	78
Tabelle 17: Übersicht über die Ergebnisse der Bisulfitpyrosequenzierung in den Assays zur Differenzierung von Tumor- und Lungengewebe und statistische Auswertung	79
Tabelle 18: Korrelation der Methylierungsdaten mit klinischen Parametern	80

Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau
PD Dr. Gaede
Forschungszentrum Borstel
Parkallee 1-40

23845 Borstel

nachrichtlich:
Herr Prof. Zabel
Direktor FZB Borstel

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 12-220

Datum: 18. Dezember 2012

Sitzung der Ethik-Kommission am 13. Dezember 2012**Antragsteller: Frau Dr. Gaede / Herr Prof. Zabel**

Titel: Verwendung historischer Biomaterialproben aus sog. Überschussmaterial inkl. zugehöriger "Klinischer Basisdatensätze" für die medizinische Wissenschaft der Zukunft

Sehr geehrte Frau Dr. Gaede,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden.
Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Stellv. Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
 Prof. Dr. Schweiger
(Psychiatrie)
 Prof. Dr. Handels
(Medizinische Informatik)
Frau Prof. E. Stubbe
(Theologin)
 Prof. Dr. Borck
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller
(Pflege)
Dr. Kaiser
(Kinderchirurgie) Herr Dr. Fieber
(Richter am Amtsgericht Ahrensburg)
 Prof. Schwinger
(Humangenetik)
 Dr. R. Vonthelin
(Zentrum für Klin. Studien)

Herr Prof. Dr. Gieseler
(Med. Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
 Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
 Herr PD Lauten
(Kinder- und Jugendmedizin)
 Frau A. Farries
(Richterin am Amtsgericht Lübeck)
Herr Prof. Dr. Schwaninger
(Pharmakologie)
 Prof. Barkhausen
(Strahlentherapie)

8 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Beteiligten, die mir während der Erstellung dieser Doktorarbeit auf unterschiedlichste Weise zur Seite standen.

Zuerst gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ammerpohl für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die vielen hilfreichen Ratschläge und die stets freundliche und unkomplizierte Betreuung.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Andrea Haake, die mich in die Technik der Pyrosequenzierung (und ihre Tücken) eingearbeitet hat, mich besonders bei der Niederschrift dieser Arbeit durch schnelles und konstruktives Korrekturlesen unterstützt hat und mir auch aus der Ferne mit einem offenen Ohr und ermutigenden Worten zur Seite stand.

Auch ohne die Hilfe von Dr. rer. nat. Swetlana Scheufele wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Ute Jacobsen, Lorena Valles, Gabi Riesen, Claudia Becher und Dorit Schuster, für jegliche Hilfe bei der technischen Durchführung und die freundliche Stimmung im Labor.

Dank gilt auch bei meinem ehemaligen Chemie- und Seminarfachlehrer Herrn Martin Ratermann, der mit seiner Begeisterung für die Naturwissenschaften so ansteckend sein kann, mich das erste Mal mit dem Gebiet der Epigenetik in Kontakt brachte und so die Grundlage für die Motivation zu dieser Arbeit schuf.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir stets den Rücken frei halten und mir in vielerlei Hinsicht ein Vorbild sind.

9 Publikationsliste

Postervorträge

Scheufele S., Marwitz S., Reinmuth N., **Kröger M.**, Kugler C., Zabel P., Vollmer E., Goldmann T., Reck M., Siebert R., Ammerpohl O.: Aberrant patterns of DNA methylation in lung cancer, 26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Humangenetik und der Schweizerischen Gesellschaft für Medizinische Genetik, April 2015, Graz, Österreich, in Medizinische Genetik, Heft 1, März 2015, S. 79-196, DOI 10.1007/s11825-015-0041-7

S. Scheufele, **M. Kröger**, S. Marwitz, N. Reinmuth, C. Kugler, P. Zabel, E. Vollmer, T. Goldmann, M. Reck, R. Siebert, O. Ammerpohl: DNA methylation in lung cancer, Annual Conference 2015 of the German Society of Genetics, September 2015, Kiel Deutschland

Scheufele S., **Kröger M.**, Marwitz S., Reinmuth N., Kugler C., Zabel P., Vollmer E., Goldmann T., Reck M., Siebert R., Ammerpohl O.: Aberrant DNA methylation in the diagnostics of lung cancer, 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Humangenetik und der Schweizerischen Gesellschaft für Medizinische Genetik, März 2016, Lübeck, Deutschland, in Medizinische Genetik, Heft 1, März 2016, S. 84–232, DOI 10.1007/s11825-016-0083-5

Swetlana Scheufele, Helene Kretzmer, **Maren Kröger**, Sebastian Marwitz, Iris Watermann, Niels Reinmuth, Christian Kugler, Peter Zabel, Ekkehard Vollmer, Sven Perner, Torsten Goldmann, Martin Reck, Reiner Siebert, Ole Ammerpohl: Aberrant DNA methylation in the diagnostics of non-small cell lung cancer, DZL Annual Meeting, Januar 2017, München, Deutschland

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln bzw. mit der wissenschaftlichen Beratung meiner akademischen Betreuer angefertigt habe. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Weiterhin bestätige ich, dass ich zuvor noch keine Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, 15.06.2019

Maren Kröger