

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

DNA-Methylierung als potentieller Biomarker in der
Differentialdiagnose von Peritonitis und Peritonealkarzinose im
Aszites

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Katrin Bose

aus Halle/Saale

Magdeburg 2022

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Bose, Katrin:

DNA-Methylierung als potentieller Biomarker in der Differentialdiagnose von Peritonitis und Peritonealkarzinose im Aszites; 2022; 79 Blatt, 21 Abbildungen, 9 Tabellen, 3 Anlagen.

Kurzreferat

Die Genese von Aszites zu erkennen ist grundlegend zur Initiierung der adäquaten Therapie und Abschätzung der Prognose. Während der unkomplizierte Aszites im Rahmen einer portalen Hypertension nur gering limitierend ist, stellen die Peritonealkarzinose und Peritonitis gravierende, prognosebestimmende Krankheitsbilder dar, wobei die Unterscheidung teilweise problematisch sein kann. Der Goldstandard für die Detektion einer Peritonealkarzinose ist eine positive Zytologie mit einer Spezifität von 97 %, aber einer Sensitivität von nur 58 %.

Um die Peritonitis zu diagnostizieren, gibt es mehrere Möglichkeiten. Ein positiver Keimnachweis zeigt eine Infektion an, eine erhöhte Zellzahl von über 250 neutrophilen Granulozyten/ μ l Aszites eine spontan bakterielle Peritonitis (SBP). Jedoch kann auch bei einer Peritonealkarzinose die Zellzahl erhöht sein. Mitunter aus diesen Gründen, aber auch weil die Gewinnung des Aszites komplikationsarm, leicht durchführbar und wenig invasiv ist, wurde diese Studie zur Evaluation potentieller Biomarker durchgeführt.

Die Untersuchung der DNA-Methylierung war und ist Bestandteil zahlreicher Studien. Die Methylierung von *long interspersed nuclear elements* (LINE-1) beispielsweise hat sich als der Marker für den globalen Methylierungsstatus etabliert und eine Deregulation wird mit globaler Genomhypomethylierung und Karzinogenese in Zusammenhang gebracht. Ebenso interessant ist die Methylierung von *microRNA-137* (miR-137), dessen Hypermethylierung häufig bei Malignomkrankungen beschrieben wird.

Im Rahmen dieser prospektiven *proof of principle* Studie untersuchten wir, inwieweit eine Analyse der DNA-Methylierung dieser beiden Marker im Aszites möglich ist und ob bestimmte epigenetische Veränderungen mit der Genese von Aszites assoziiert sind.

Schlüsselwörter: DNA-Methylierung, LINE-1, miR-137, Aszites, Peritonealkarzinose, Peritonitis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einführung	1
1.1 Aszites	1
1.1.1 Diagnostik, Diagnose und Differentialdiagnosen	1
1.1.2 Peritonealkarzinose	3
1.1.3 Spontan Bakterielle Peritonitis (SBP)	7
1.2 SBP versus Peritonealkarzinose - diagnostische Grenzen	12
1.3 DNA-Methylierung als Biomarker	12
1.3.1 Methylierung von LINE-1 und miR-137 und ihre Bedeutung in der Karzinogenese ..	13
1.4 Ziel der Arbeit	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	17
2.2 Chemikalien, Reagenzien, Zelllinien, Kits und Primer.....	18
2.3 Software.....	19
2.4 Studiendesign	19
2.4.1 Präanalytik.....	19
2.4.2 Analyse der LINE-1 und miR-137 Methylierung im Aszites	20
2.5 Patientenkollektiv und Aszitesproben	20
2.5.1 Definition der Patientengruppen.....	21
2.5.2 Laborchemische, mikrobiologische und zytologische Datenerfassung der Aszitesproben.....	21
2.5.3 Gewinnung der Proben, Lagerung und Verarbeitung	21
2.6 DNA-Isolierung.....	22
2.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	23
2.8 Quantitative Messung der DNA-Methylierung.....	23
2.9 Statistische Methoden	24
2.10 Eigenanteil	25
3 Ergebnisse	26
3.1 Charakterisierung der Patienten.....	26
3.2 Durchführbarkeit der Methylierungsanalyse von LINE-1 und miR-137 im Aszites.....	28
3.3 Stabilität der DNA-Methylierung	29
3.4 Reproduzierbarkeit.....	30
3.5 Einfluss der Aliquotierungsvolumina auf den Methylierungsstatus.....	31
3.6 DNA-Methylierung - Vergleich ausgewählter Gruppen und Subgruppen	31
3.6.1 Vergleich des gesamten Patientenkollektivs	32

3.6.2 Peritonealkarzinose – detaillierter Vergleich mit anderen Gruppen und innerhalb der Gruppe	33
3.6.3 Peritonitis – Einfluss laborchemischer und klinischer Parameter	35
3.6.4 Leberzirrhose – Einfluss auf den Methylierungsstatus.....	39
3.6.5 Korrelationsanalysen	40
4 Diskussion	43
4.1 Präanalytische Test.....	43
4.2 DNA-Methylierung im Aszites als diagnostischer Biomarker.....	44
4.3 Korrelation und Rolle laborchemischer Parameter	49
4.4 Aktuelle Datenlage zur Methylierung von LINE-1 und miR-137 - mögliche Einsatzgebiete als Biomarker	50
4.5 Limitationen der Studie und Ausblick.....	53
5 Zusammenfassung.....	55
6 Literaturverzeichnis	56
Danksagung	64
Ehrenerklärung.....	65
Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung.....	66
Anlagen	67
Anl. 1: RNA/miRNA- und DNA-Isolierung mit dem RNeasy Plus Universal Mini Kit.....	67
Anl. 2: Bisulfitmodifikation mit dem Cell-to-CpG Bisulfite Conversion Kit 50	69
Anl. 3: Quantitative Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACLF	<i>Acute-on-chronic liver failure</i> , akut auf chronisches Leberversagen
AEG	Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AGS	Zelllinie eines schlecht differenzierten, diffusen Adenokarzinom des Magens
Anl.	Anlage
ANV/AKI	Akutes Nierenversagen, <i>acute kidney injury</i>
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
BCS	Budd-Chiari-Syndrom
bp	Basenpaar
BSC	<i>Best supportive care</i> , bestmöglich unterstützende Behandlung
°C	Grad Celsius
CA	<i>Cancer</i> , Karzinom
CA 19-9	<i>Carbohydrate</i> -Antigen 19-9
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
ccfDNA	<i>Circulating cell-free DNA</i> , zirkulierende zellfreie DNA
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i>
Cdk6	<i>Cell division protein kinase 6</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CML	<i>Chronic myeloid leukemia</i> , chronisch myeloische Leukämie
CP	<i>Child-Pugh-Score</i>
CpG-Dinukleotid	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CRP	C-reaktives Protein
CRS	<i>Cytoreductive surgery</i> , zytoreduktive Chirurgie
CT	<i>Computer tomography</i> , Computertomografie
CUP	<i>Cancer of unknown primary</i> , Tumor unbekannter Herkunft
dATP α S	<i>Deoxyadenosin alpha-thio Triphosphat</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
dl	<i>Decilitre</i> , Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPAM	<i>Disseminated peritoneal adenomucinosi</i> s
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i>
FOLFOX	Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin
g	<i>Gram</i> , Gramm

GCA	<i>Gastric cancer</i> , Magenkarzinom
GIST	Gastrointestinale Stromatumor
Gpt	Gigapartikel
h	<i>Hour</i> , Stunde
HCA	<i>Health care associated</i>
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> , hepatozelluläres Karzinom
HE	<i>Hepatic encephalopathy</i> , hepatische Enzephalopathie
hep.	Hepatisch
HIPEC	<i>Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy</i> , hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
HIV	<i>Humane Immundefizienz-Virus</i>
HWI	Harnwegsinfekt
IPEC	<i>Intraperitoneal chemotherapy</i> , intraperitoneale Chemotherapie
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LINE-1	<i>Long interspersed nuclear element-1</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LZ	Leberzirrhose
M	Molar
MELD	<i>Model for end-stage liver disease</i>
mg	<i>Milligram(s)</i> , Milligramm
Mibi	Mikrobiologie
min	Minute(n)
miR-137	MicroRNA miR-137
miRNA	MicroRNA
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Mpt	Megapartikel
MRT	Magnetresonanztomografie
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten RNA
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NaOH	Natriumhydroxid
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NCC	Nierenzellkarzinom
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
non-LTR	<i>Non-long terminal repeat transposable elements</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> , Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PACA	Pankreaskarzinom
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PCA	<i>Peritoneal carcinomatosis</i> , Peritonealkarzinose
PCI	<i>Peritoneal cancer index</i> , Peritonealkarzinose-Index

PET-CT	<i>Positronen emissions tomographie-Computer tomography</i> , Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomografie
PHT	Portale Hypertonie
PMCA	<i>Peritoneal mucinous carcinomatosis</i>
PMCA-I	<i>Peritoneal mucinous carcinomatosis-intermediate category</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear neutrophils</i> , polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMP	Pseudomyxoma peritonei
PTT	<i>Partial thromboplastin time</i> , partielle Thromboplastinzeit
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RES	Retikuloendotheliales System
RISC	<i>RNA-induced silencing Complex</i> , RNA-induzierter Silencing Komplex
RHS	Retikulohistiozytäres System
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SAAG	Serum-Aszites-Albumin Gradient
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
sek	Sekunde(n)
SEPT9	Septin 9
SHOX2	<i>Short Stature Homeobox 2</i>
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS-EDTA Puffer
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

1 Einführung

1.1 Aszites

Aszites, abgeleitet aus dem Griechischen *askites* (Wassersucht), ist eine pathologische Ansammlung von Flüssigkeit in der Peritonealhöhle. Eine geringe Menge freier Flüssigkeit, 50-75 ml, können im Rahmen eines Normalbefundes vorhanden sein [1]. In der Regel steht Aszites jedoch mit einer schwerwiegenden Erkrankung im Zusammenhang, so dass die Diagnostik ausschlaggebend für Diagnose, Therapie und Prognose ist. Zur Primärdiagnostik zählen neben Routineuntersuchungen wie Anamnese und Erhebung des körperlichen Status, Standardlaboruntersuchungen, welche Leberwerte, Nierenfunktion, Serumelektrolyte, Gerinnungsparameter sowie eine Urinanalyse beinhalten. Des Weiteren ist eine Bildgebung, z. B. eine Sonografie des Abdomens durchzuführen. Unabdingbar für die Differentialdiagnostik des Aszites ist die diagnostische Parazentese, welche bei jedem neu aufgetretenen Aszites, aber auch bei Patienten mit bekannter Leberzirrhose und begleitenden Komplikationen oder ungeplanter stationärer Aufnahme durchgeführt werden sollte [2].

1.1.1 Diagnostik, Diagnose und Differentialdiagnosen

Die Aszitespunktion bedarf als invasiver Eingriff im Normalfall einer Aufklärung und Einwilligung des Patienten. Vor Punktion ist, auch wenn nur mit geringen Komplikationen vergesellschaftet, auf entsprechende Vorbereitung zu achten. Sie ist unter sterilen Bedingungen durchzuführen. Obwohl das Risiko von lebensbedrohlichen Blutungsereignissen sehr gering ist, beschrieben als Einzelfälle bei Patienten mit einer Lebererkrankung mit unter 0,02 % [3], ist die Bestimmung der Gerinnungsparameter und Thrombozyten empfehlenswert. Blutungen stellen eine seltene, dennoch die häufigste Komplikation dar. In Studien hat sich gezeigt, dass bei einer Parazentese mit Thrombozyten von mindestens 50.000/ μ l und einer PTT, die bis zum doppelten des Normbereiches verlängert ist, mit keinem erhöhten Blutungsrisiko zu rechnen ist [4]. Soweit vorhanden, erfolgen Parazentesen nach vorheriger Festlegung des Punktionsortes mittels Sonografie gewöhnlich im linken oder rechten unteren Quadranten. Bei großvolumigen Parazentesen (≥ 5 l) sollte zur Vermeidung von mitunter schwerwiegenden Kreislaufstörungen die Gabe von Albumin (4-8 g/l Aszites) erfolgen [5].

Die Differentialdiagnosen des Aszites sind vielfältig mit unterschiedlich zu Grunde liegender Pathophysiologie. Einen Überblick über die Differentialdiagnosen gibt **Tab. 1**. Mit Abstand die häufigste Ursache ist eine portale Genese bei portaler Hypertension. Die Leberzirrhose ist bei 75% der Betroffenen in den westlichen Ländern der Grund für das Auftreten von Aszites. Aber auch andere Krankheitsbilder können eine portale Hypertension hervorrufen, z. B. akute Hepatitis, Budd-Chiari-Syndrom (BCS)/sinusoidale Obstruktionssyndrom, Pankreatitis und kardiale Ursachen (3%) wie z. B. eine Rechts- und Globalherzinsuffizienz sowie die

1 Einführung

Pericarditis constrictiva [6-10]. Mit einem deutlich geringeren Anteil (ca. 10%) finden sich maligne Ursachen [11]. Noch seltener liegt eine infektiöse Genese vor. Hier sind vor allem die spontan bakterielle Peritonitis, der Bakteraszites als Unterform sowie die sekundäre Peritonitis zu erwähnen.

Tab. 1: Differentialdiagnosen des Aszites

Portale Hypertension
Leberzirrhose verschiedener Genese, akute Hepatitis, Pfortaderthrombose, Budd-Chiari-Syndrom (BCS)/sinusoidale Obstruktionssyndrom, Rechtsherzinsuffizienz, Pericarditis constrictiva, Globalherzinsuffizienz
Malignome
Peritonealkarzinose (PCA), Hepatozelluläres Karzinom (HCC), Mesotheliom, hepatische Metastasen, andere intraabdominelle Malignome
Entzündungen
Spontan bakterielle Peritonitis/Bakteraszites, sekundäre Peritonitis, tuberkulöse Peritonitis, Infektion mit Chlamydien, Pankreatitis
Seltene bzw. iatrogene Ursachen
Fisteln/Leckagen (Pankreasfistel, Lymphfistel, Leckage im Harntrakt), Myxödem, biliäre Genese (z. B. Gallefisteln nach Gallenblasen- bzw. Gallengangsoperationen, Gallenblasenruptur bzw. -perforation), nephrotische Syndrom

Abgesehen von dem makroskopischen Aspekt, können verschiedene laborchemische Parameter, mikrobiologische und zytologische Untersuchungen mit unterschiedlicher Spezifität und Sensitivität Hinweise auf die Genese des Aszites geben. Als obligat zu ermittelnde Werte bei einer initialen Aszitespunktion zählen Zellzahl, Zelldifferenzierung, Gesamteiweiß und die mikrobiologische Untersuchung mittels Beimpfung von Kulturflaschen. Die Ergebnisse dienen besonders der Detektion einer infektiösen Genese, aber auch zur weiteren Differenzierung.

Zudem kann der Serum-Aszites-Albumin Gradient (SAAG) hinzugezogen werden. Hat dieser einen Wert von größer oder gleich 1,1 g/dl, so liegt dem Aszites mit einer Treffsicherheit von 97 % eine portale Genese zu Grunde [12]. Der SAAG trägt somit zur Unterscheidung zwischen portaler und nicht portaler Genese bei. Sowohl hepatische als auch zu einem geringeren Anteil kardiale Ursachen können zu einer portalen Hypertension führen. Hier kann u. a. das Gesamteiweiß im Aszites einen Hinweis geben. Bei einem kardialen Aszites beträgt dies meist mehr als 2,5 g/dl, bei Vorliegen einer Leberzirrhose meist unter 2,5 g/dl. Zudem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen einem niedrigen Gesamteiweiß (< 1,5 g/dl) und einer geringeren Opsonierungsfähigkeit und damit einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) [13].

Eine mikrobiologische Untersuchung sollte immer bei neu aufgetretenem Aszites, Verschlechterung der bestehenden stabilen Erkrankung oder Hospitalisation aufgrund von Progredienz und dem Verdacht einer infektiösen Genese durchgeführt werden. Trotz

1 Einführung

Optimierung der Abnahmebedingungen (Beimpfung der Kulturflaschen direkt am Patientenbett mit mind. 10 ml Punktat) kann bei nachgewiesener SBP in nur ca. 36-59 % ein positives Kulturergebnis gewonnen werden [2].

Einen weiteren Hinweis auf die Genese des Aszites können zytologische Untersuchungen geben. Diese dienen vor allem der Klärung der Frage nach Malignität. Aber auch hier gelangt man bei der konventionellen Ergusszytologie mit einer Sensitivität von nur 58% und Spezifität von 97% schnell an diagnostische Grenzen, so dass alternative, möglichst für den Patienten wenig belastende Untersuchungen, wünschenswert sind.

Nicht ganz nebensächlich ist der makroskopische Aspekt. So findet man hämorrhagischen Aszites häufig bei Malignität (50% der Patienten mit HCC, 20% der Patienten mit Karzinom assoziiertem Aszites, 10% der Patienten mit Peritonealkarzinose) [14], chylösen Aszites (wegen der hohen Konzentration an Chylomikronen und Triglyceriden) sowohl bei Malignität als auch bei der portalen Hypertension. Klar und leicht gelblich zeigt sich hingegen Aszites meist bei Leberzirrhose [11].

Obwohl die portale Genese den größten Anteil an den Differentialdiagnosen einnimmt, wird in dieser Arbeit der Fokus auf den malignen Aszites, Aszites infektiöser Genese und potentielle Alternativen zu den eben erwähnten diagnostischen Tools gesetzt. Die richtige Diagnose sowie Einleitung einer adäquaten Therapie haben weitreichende Folgen hinsichtlich Mortalität und Lebensqualität.

1.1.2 Peritonealkarzinose

2018 sind weltweit ca. 18,1 Millionen Menschen neu an einem Karzinom erkrankt (2014 ca. 476.000 in Deutschland), wobei Karzinome des Gastrointestinaltraktes eine hohe Inzidenz aufweisen (**Tab. 2**) [15-17].

Ca. 90 % der durch Malignome verursachten Sterbefälle sind durch Metastasen bedingt [18]. Prinzipiell können alle malignen Tumore eine Peritonealkarzinose verursachen, am häufigsten findet sich eine solche bei Karzinomen der Bauchhöhle.

Die häufigste Inzidenz bei Erstdiagnose einer malignen Erkrankung bereits eine Peritonealkarzinose aufzuweisen, findet sich in 60-80 % der Fälle bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom. Malignome des Gastrointestinaltraktes hingegen zeigen eine geringere Inzidenz. Beispielsweise findet sich bei Patienten mit Diagnose eines kolorektalen Karzinoms (KRK) in 15-20 % eine isolierte Peritonealkarzinose, in 20-30 % zusammen mit Metastasen in anderen Lokalisationen. Patienten mit einem Magenkarzinom haben in 10-20 % bei Erstdiagnose, in 30-40 % bei lokal fortgeschrittenen, lymphonodal positiven Stadien und in 40-50 % der Fälle bei einem Rezidiv eine Peritonealkarzinose vorliegen. Bei den Pankreaskarzinomen und CCC liegt die Inzidenz mit 5-10 % deutlich niedriger [19].

Tab. 2: Inzidenz verschiedener Tumorentitäten weltweit entsprechend der Weltgesundheitsorganisation für 2018

Krebsentität	Neuerkrankungen
Lungenkarzinom	2.093.876
Mammakarzinom	2.088.849
Kolorektales Karzinom	1.849.518
Prostatakarzinom	1.276.106
Magenkarzinom	1.033.701
HCC/CCC	841.080
Ösophaguskarzinom	572.034
Cervixkarzinom	569.847
Schilddrüsenkarzinom	567.233
Harnblasenkarzinom	549.393
Non-Hodgkin Lymphom	509.590
Pankreaskarzinom	458.918
Leukämie	437.033
Nierenzellkarzinom	403.262
Uteruskarzinom	382.069
Karzinom der Lippe, Mundhöhle	354.864
Karzinom des Gehirns, der Meningen und des Nervensystems	296.851
Ovarialkarzinom	295.414

1.1.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der Peritonealkarzinose sind multifaktoriell. 1931 wurde von Sampson die Peritonealkarzinose als lokaler Tumorprogress in die Peritonealhöhle und nicht als Systemerkrankung beschrieben [20]. Heute unterscheidet man häufig zwischen den selteneren primären Karzinomen des Peritoneums (seröses papilläres Adenokarzinom des Peritoneums, peritoneales Mesotheliom) und der weitaus häufiger auftretenden Peritonealkarzinose als Ausdruck eines metastasierten Tumorleidens. Allgemein kommen verschiedene Ansätze der Möglichkeit der Metastasierung in Betracht. So kann es durch expansives, kapselüberschreitendes Wachstum, spontane oder iatrogene Perforation des Primarius, lymphogene, hämatogene und iatrogene Streuung zur Ausbreitung maligner Zellen kommen [21, 22]. Das peritoneale Stroma bietet durch das reichliche Vorkommen an Wachstumsfaktoren und Chemokinen ein gutes Umfeld zur Proliferation [23].

Ein besonderes klinisches Erscheinungsbild ist das *Pseudomyxoma peritonei* (PMP). Es beschreibt eine lokalisierte oder generalisierte Ansammlung von reichlich gallertartigen und muzinproduzierenden Material in der Peritonealhöhle. In den meisten Fällen ist es ausgehend von einer muzinösen Neoplasie der Appendix, kann aber auch in seltenen Fällen den Ursprung in anderen Organen haben. Bei kontroversen Diskussionen gestaltet es sich schwierig eine einheitliche Klassifikation zu finden. Am häufigsten wird es nach Ronnett et al. in 3 prognostisch relevante Kategorien, *disseminated peritoneal adenomucinosis* (DPAM),

1 Einführung

peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA) und *peritoneal mucinous carcinomatosis-intermediate category* (PMCA-I) unterteilt [24, 25]. Eine weitere, kürzlich vorgeschlagene Klassifikation ist die *Peritoneal Surface Oncology Group International* (PSOGI) Klassifikation. Entsprechend dieser wird das PMP in folgende 3 Gruppen eingeteilt: *Low grade mucinous carcinoma peritonei*, *High grade mucinous carcinoma peritonei* und *High grade mucinous carcinoma peritonei with signet ring cells* [26].

1.1.2.2 Klinik und Diagnostik

Patienten mit einer Peritonealkarzinose sind im Anfangsstadium klinisch meist inapparent oder präsentieren sich mit unspezifischen abdominellen Beschwerden. Bei Krankheitsprogress kann es zum Auftreten von Aszites, abdominellen Schmerzen und Obstipation bis hin zum Ileus kommen. In der französischen multizentrischen EVOCAPE-1-Studie, bei der 370 Patienten mit Peritonealkarzinose ausgehend von nicht gynäkologischen Neoplasien eingeschlossen wurden, präsentierten sich 34,9 % mit Aszites und 24,3 % mit einem Ileus [23, 27].

Bei erstmaligem Auftreten von Aszites ist die diagnostische und häufig auch therapeutische Aszitespunktion durchzuführen. Hier kann bei Nachweis maligner Zellen und Immuntypisierung ein Hinweis auf den Primarius gelingen. Die Sensitivität hinsichtlich einer positiven Zytologie wird in der Literatur bei der konventionellen Ergusszytologie mit 58% beschrieben, kann bei mehrfachen Untersuchungen und Einsatz spezifischer Zusatzuntersuchungen deutlich erhöht werden und gilt bei positivem Nachweis nahezu als gesichert [28-30].

Die Bestimmung von Tumormarkern (wie z. B. Carcinoembryonales Antigen (CEA), *Carbohydrate*-Antigen 19-9 (CA 19-9), alpha-1-Fetoprotein (AFP)) sowie anderen Parametern (z. B. Laktatdehydrogenase, Cholesteroll, Fibronectin) kann hilfreich sein, hat aber keinen festen Stellenwert in der Diagnostik des malignen Aszites [31]. Ergänzend und gegebenenfalls im präoperativen Setting stehen mit MRT, CT und PET-CT bildgebende Verfahren zur Verfügung, die jedoch eine eingeschränkte Aussagekraft besitzen [32].

Eine weitere Möglichkeit, die zur Diagnosestellung beitragen kann, ist die diagnostische Laparoskopie bzw. Laparotomie. Hier können Biopsien genommen, eine Einschätzung zum Ausmaß der Peritonealkarzinose gegeben und die Indikation zur OP evaluiert werden [33, 34]. Zur Beurteilung der Ausdehnung, Therapieplanung und Abschätzung der Prognose hat sich der 1995 von Sugarbaker et al. beschriebene Peritonealkarzinose-Index etabliert (**Abb. 1**). Danach wird das Abdomen in 13 Quadranten unterteilt, von denen jeder einen Wert von 0-3 je nach Tumorausdehnung erhält [35].

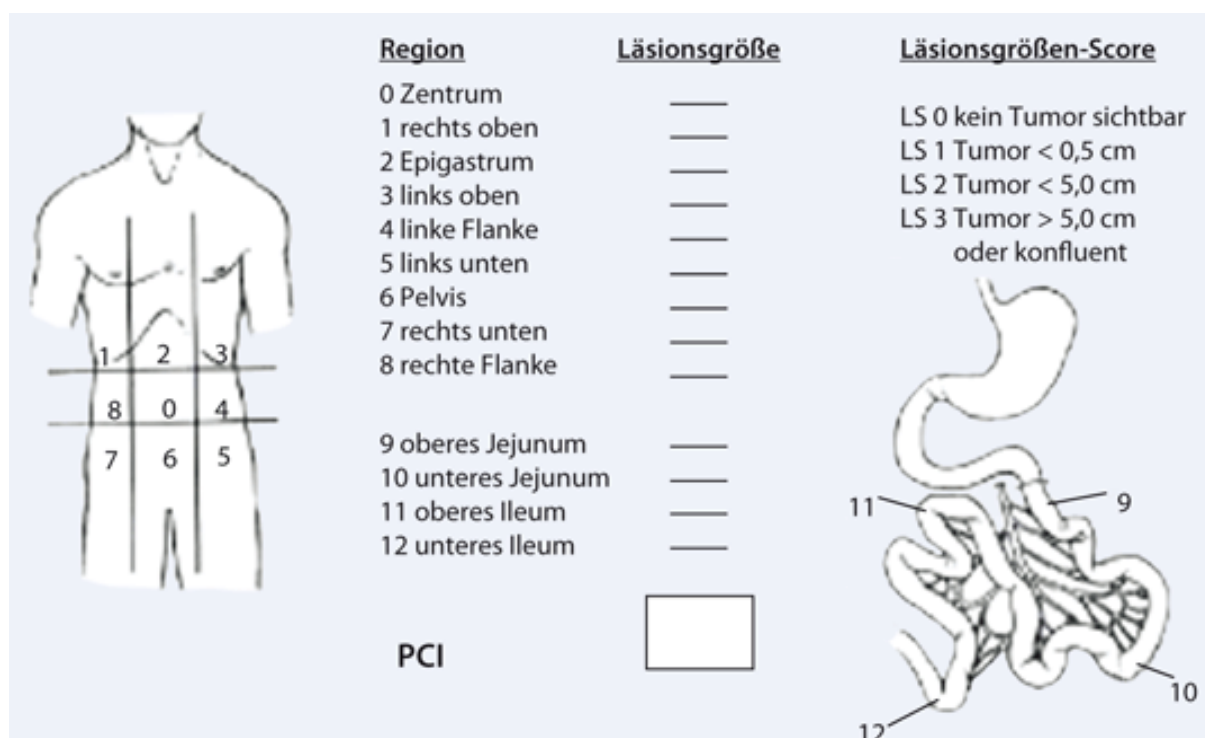


Abb. 1: Peritonealkarzinose-Index (PCI). Eingeteilt wird das Abdomen in 9, der Dünndarm in weitere 4 Regionen. Für jede Region werden je nach Größe der Läsion 0-3 Punkte vergeben. (nach Sugarbaker et al., Abbildung aus [36])

1.1.2.3 Therapie und Prognose

In den letzten Jahrzehnten hat ein Umdenken bezüglich der Therapieansätze stattgefunden. Die Peritonealkarzinose, welche in früheren Zeiten als terminal angesehen wurde, wird heute eher als eine lokalisierte Tumormetastasierung verstanden und kann, abhängig von verschiedenen Faktoren (Performance Status (z. B. Karnofsky-Index, *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)), Tumordissemination und -entität, Behandlungsalternativen, Komorbiditäten und Patientenwunsch), innerhalb eines kurativen Therapieregimes behandelt werden. Dieses besteht aus einem seit den 1980er Jahren entwickelten multimodalen Therapiekonzept aus zytoreduktiver Chirurgie (CRS) und intraperitonealer Chemotherapie (IPEC), welches besonders von Sugarbaker et al. geprägt wurde. Erstmals beschrieben wurde das Verfahren der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) 1980 von Spratt et al. [37, 38]. Ziel der CRS ist die Entfernung makroskopisch sichtbarer Tumormassen, Ziel der HIPEC die mikroskopischen Tumorresiduen zu eliminieren.

Aktuell ist dies für das *low-grade* muzinöse Appendixkarzinom und peritoneale Mesotheliom ein anerkanntes Standardverfahren und im Fokus des Interesses verschiedener Studien mit anderen Tumorentitäten [39-42]. In einer von Verwaal et al. veröffentlichten Studie bei Patienten mit KRK zeigte sich ein signifikanter Vorteil im medianen Gesamtüberleben in dem experimentellen Arm, der eine (R0) CRS und HIPEC sowie adjuvante Chemotherapie erhielt im Vergleich mit Chemotherapie und palliativer Chirurgie allein (22,4 vs. 12,6 Monate). In der

1 Einführung

Prodige 7 Studie wurde der Zugewinn evaluiert, wenn bei einer kompletten CRS und systemischen Chemotherapie eine HIPEC durchgeführt wird. Ein ausgewähltes Patientenkollektiv mit einem moderaten Peritonealkarzinose-Index (PCI) (**Abb. 1**) scheint bei Anwendung eines multimodalen Therapiekonzeptes einen Überlebensvorteil aufzuweisen [38]. Yang et al. konnten einen Vorteil im medianen Gesamtüberleben bei Patienten mit einem peritoneal metastasierten Magenkarzinom detektieren, wenn diese eine CRS in Kombination mit HIPEC im Vergleich zur alleinigen CRS (11 vs. 6,5 Monate) erhielten[42].

Als wichtigster Prognosefaktor hat sich in verschiedenen Studien die Vollständigkeit der Zytoreduktion herausgestellt. Es zeigte sich, dass bei inkompletter Zytoreduktion der Einsatz von HIPEC keinen Überlebensvorteil zur alleinigen systemischen Chemotherapie bringt. Weitere, Prognose beeinflussende Faktoren sind, wie eben erwähnt, die Tumorentität und -histologie [43]. Häufig ist die Erkrankung so fortgeschritten oder die Patienten befinden sich in einem stark reduzierten Performance Status, so dass eine tumorspezifische Therapie nicht möglich und den Patienten eine symptomatische Therapie oder *Best Supportive Care* (BSC) anzubieten ist. Die Rolle der Chirurgie im palliativen Setting z. B. zur Behebung von Ileussympomatik ist eher kritisch zu hinterfragen. In einer kürzlich erschienen Studie hat sich eine hohe Rate an postoperativen Komplikationen und erneutem Auftreten einer Ileussympomatik gezeigt, so dass eine symptomatische Therapie hier den Vorrang hat (hiervon ausgenommen sind Patienten mit einem Neuroendokrinen Tumor) [44]. Patienten ohne tumorspezifische Therapie haben eine schlechte Prognose. In der EVOCAPE-1-Studie hat sich ein medianes Überleben bei Patienten mit nicht gynäkologischen Tumoren und peritonealen Metastasen von 3,1 Monaten gezeigt [27].

1.1.3 Spontan Bakterielle Peritonitis (SBP)

Die häufigste Ursache für Infektionen bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose ist neben Harnwegsinfektionen (HWI) die SBP [45]. Zuerst wurde die SBP 1907 von Krencker beschrieben und der Terminus SBP von Conn 1964 geprägt um ein Syndrom aus Peritonitis und Bakteriämie ohne andere intraabdominelle Ursache einer Infektion zu beschreiben [46, 47]. Bakterielle Infektionen erhöhen bei Leberzirrhosepatienten die Mortalität um ein vierfaches [48].

Die Inzidenz einer SBP ist im ambulanten Sektor mit bis zu 3,5 % geringer als bei hospitalisierten Patienten (7-30 %) [49, 50]. Eine schlechte Leberfunktion, Aszites, gastrointestinale Blutung, Ösophagusvarizenblutung, geringer Proteingehalt der Aszitesflüssigkeit, eine bereits stattgehabte SBP, erhöhte Bilirubinwerte (> 3,2 mg/dl) sowie Thrombopenie (< 98.000/mm³) gelten als Risikofaktoren eine SBP zu entwickeln. Der Effekt von Protonenpumpenhemmern (PPI) wird kontrovers diskutiert [51-54]. Außerdem hat sich gezeigt, dass ein erhöhter *model for end-stage liver disease* (MELD) Score mit einem erhöhten

1 Einführung

Risiko der Entwicklung einer SBP korreliert [55]. Auch scheinen bestimmte genetische Faktoren (z. B. NOD 2-, TLR Polymorphismus) das Auftreten einer SBP zu begünstigen [56, 57].

1.1.3.1 Ätiologie und Pathogenese

Obwohl nicht abschließend geklärt, ist das Grundprinzip der Entwicklung einer SBP, bestehend aus verändertem Mikrobiom, veränderter intestinaler Permeabilität, bakterieller Translokation und Dysfunktion der Immunabwehr, bekannt. Eine entscheidende Rolle spielen eine Dysbiose sowie eine bakterielle Überbesiedlung des Darms, welche u. a. durch eine Änderung in der Zusammensetzung der Gallensäuren [58], eine verringerte Darmmotilität vermutlich durch autonome Dysfunktion, erhöhte Stickstoffmonoxyd-Synthese und vermehrten oxidativen Stress der Mukosa hervorgerufen und begünstigt werden. Oxidativer Stress führt neben ultrastrukturellen Veränderungen der intestinalen Mukosa, lokaler Inflammation, einem hyperaktiven autonomen Nervensystem sowie einem Darmwandödem zu einer gesteigerten intestinalen Permeabilität [59, 60]. Zudem zeigte sich bei Patienten mit Leberzirrhose eine Dysfunktion der systemischen und lokalen Immunabwehr, so dass eine Dissemination mit Bakterien und Bakterienbestandteilen sowie eine geringere Fähigkeit zur Opsonierung im Aszites zur Ausbildung einer SBP beitragen. In **Abb. 2** findet sich eine schematische Darstellung zur Pathogenese der SBP.

1 Einführung

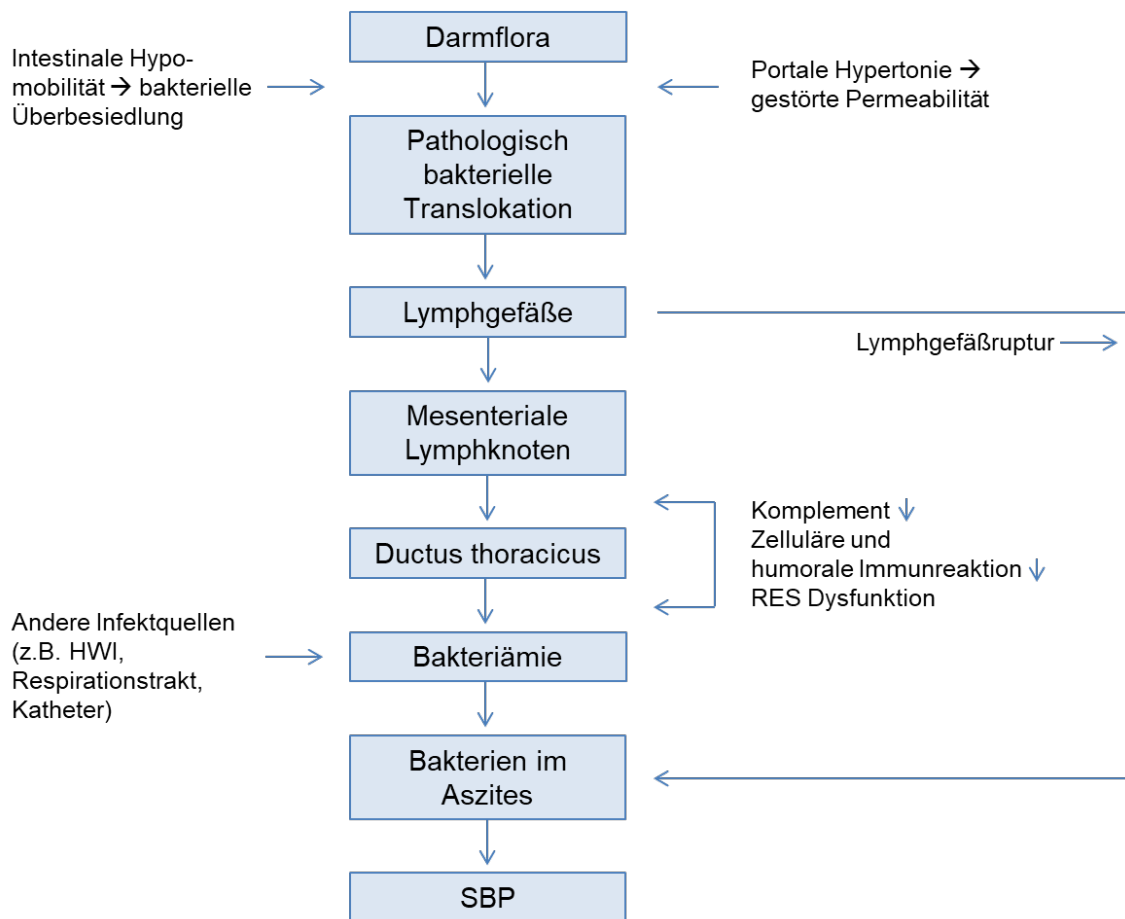


Abb. 2: Pathogenese der SBP (modifiziert von dem Schema von Schmid et al. [61]). Harnwegsinfekt (HWI), Retikuloendotheliales System/Retikulohistiozytäres System (RES/RHS).

1.1.3.2 Klinik und Diagnostik

Klinisch zeigen sich betroffene Patienten teils asymptomatisch, teils aber auch mit unspezifischen Beschwerden, einer Verschlechterung des mentalen Status, lokalen Symptomen einer Peritonitis, abdominellen Schmerzen, Zeichen einer systemischen Infektion wie Fieber und Schüttelfrost oder auch Schocksymptomen. Die klinischen Symptome werden mit unterschiedlicher Häufigkeit dokumentiert, so dass auf deren Grundlage allenfalls eine Verdachtsdiagnose gestellt werden kann [62, 63]. Laborchemisch kann es begleitend zu einer progredienten Verschlechterung der Leber- und Nierenfunktion kommen [64].

Definiert wird die SBP durch das Vorliegen von ≥ 250 polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) je μl im gewonnenen Aszitespunktat. Liegt zudem ein mikrobiologisch positiver Keimnachweis vor, spricht man von einer kulturpositiven SBP, bei einem (wie in ca. 40 % der Fälle) nicht gelungenem Keimnachweis von einer kulturnegativen SBP, bei einem Keimnachweis ohne erhöhte Zahl an PMN von einem Bakteriaszites [64]. Während im ambulanten Rahmen vor allem gram-negative Keime verantwortlich für eine SBP zu sein scheinen, finden sich nosokomial vor allem gram-positive und multiresistente Erreger [2].

1 Einführung

Zu unterscheiden ist eine SBP von einer sekundären Peritonitis, bei der eine bakterielle Peritonitis durch eine intraabdominelle Infektquelle verursacht wird. Bei der sekundären Peritonitis finden sich im Durchschnitt eine höhere Anzahl an PMN, ein breiteres Keimspektrum, ein höherer Gehalt an Protein und Laktatdehydrogenase (LDH) sowie eine geringere Glucosekonzentration [58]. In **Tab. 3** werden die Varianten einer Peritonitis tabellarisch dargestellt.

Einteilung	Aszitesdiagnostik	
	PMN	Mikrobiologie/Zusatzinformation
Spontan bakterielle Peritonitis (SBP)		
Kulturpositive SBP	≥ 250/μl	+
Kulturnegative SBP	≥ 250/μl	-
Bakteraszites	< 250/μl	+
Sekundäre Peritonitis	≥ 250/μl	+/Infektionsquelle intraperitoneal (z. B. Perforation, Abszess, u. a.)

1.1.3.3 Therapie und Prognose

Nach Diagnosestellung sollte umgehend eine empirische antibiotische Therapie eingeleitet werden. Hierbei ist zu unterscheiden, ob es sich um eine ambulant erworbene, *health care associated* (HCA) oder nosokomial erworbene Infektion handelt. Im ambulanten Sektor wird eine antibiotische Therapie mittels Cephalosporine der 3. Generation empfohlen. Handelt es sich um nosokomial erworbene oder HCA Infektionen, sollte die zunehmende Resistenzentwicklung und Ineffektivität gegenüber Cephalosporinen bedacht werden. In einer von Friedrich et al. 2016 veröffentlichten Studie zeigte sich ein Ansprechen von ca. 56 % auf Cephalosporine der 3. Generation bei nosokomialen bzw. HCA Infektionen und 70 % bei nicht-nosokomialen. Das empirische Therapieregime sollte entsprechend regionaler Unterschiede hinsichtlich der Resistenzen und Keimbesiedlung gewählt werden. In neueren Studien werden vor allem Tazobactam/Piperacillin sowie Carbapeneme als wirkungsvolle Alternativen empfohlen. Bei Therapieversagen oder erfolgreichem Keimnachweis ist ein Wechsel der antibiotischen Therapie, wenn möglich resistogrammgerichtet, durchzuführen. Eine Kontrolle des Therapieerfolges anhand der PMN im Aszites wird 48 Stunden nach Beginn der antibiotischen Therapie empfohlen [2, 66, 67].

Da es bei ca. 70 % der Patienten nach stattgehabter SBP zu einem Rezidiv innerhalb des ersten Jahres kommt, sollte eine Sekundärprophylaxe durchgeführt werden. Es hat sich gezeigt, dass unter Therapie mit Norfloxacin (400 mg/d) eine Reduktion der Rezidivrate auf ca. 20 % innerhalb des ersten Jahres erreicht werden kann [68]. Problematisch ist jedoch die Entwicklung von Resistenzen bei dieser Patientengruppe. Eine Primärprophylaxe sollte einem

1 Einführung

speziellen Patientenkollektiv vorbehalten bleiben. Bei Patienten mit Leberzirrhose mit einer oberen gastrointestinalen Blutung hat der Einsatz von Chinolonen oder Cephalosporinen der 3. Generation (bei Patienten mit Chinolonresistenz in der Vorgeschichte oder unter Chinolontherapie) das Risiko eine SBP oder Rezidivblutung zu entwickeln ebenso wie die Mortalität signifikant gesenkt [69, 70]. Weiterhin wird eine Primärprophylaxe bei Patienten mit einem hohen Risikoprofil (Aszites, hepatische Enzephalopathie (HE), Protein im Aszites unter 1,5 g/dl, einer schweren Leberinsuffizienz (Child-Pugh > 9 mit Bilirubin > 3 mg/dl) und oder Nierenfunktionseinschränkung) empfohlen. Zu bedenken ist allerdings auch hier die Gefahr der Resistenzentwicklung [71].

Zur Reduktion der Gefahr der Resistenzentwicklung wurden Studien durchgeführt, die die Wirksamkeit von Rifaximin, einem Antibiotikum, dessen systemische Resorption zu vernachlässigen ist, mit systemischer antibiotischer Therapie und Placebo hinsichtlich der Primär- und Sekundärprophylaxe vergleichen [72]. Vorhandene Studien sind jedoch wenig und teilweise von suboptimaler Qualität, so dass eine fundierte Aussage zuletzt nicht möglich ist. Möglicherweise kann Rifaximin effektiv neben der Therapie der HE sowohl zur Primär- als auch Sekundärprophylaxe einer SBP mit einer Risikoreduktion der Resistenzentwicklung eingesetzt werden. Weitere Studien sind jedoch erforderlich.

Ca. 50 % der Patienten mit SBP entwickeln eine akute Nierenschädigung (*Acute kidney injury*, AKI) und 60 % ein akutes auf chronisches Leberversagen (*Acute-on-chronic liver failure*, ACLF). Es hat sich gezeigt, dass eine zusätzliche Albumingabe die Mortalität sowie das Auftreten eines AKI signifikant senkt [73, 74].

In verschiedenen kürzlich erschienen Studien ist der Einfluss eines PPI auf die Entwicklung und den Verlauf einer SBP analysiert worden. So besteht laut der 2016 erschienenen Metaanalyse von Yu et al., im Gegensatz zu vorherigen Metaanalysen, kein Einfluss von PPI auf die Inzidenz und Mortalität einer SBP [75]. In der von Tergast et al. 2018 veröffentlichten Studie zeigte sich bei Patienten mit einer täglichen Dosis PPI von > 40 mg eine erhöhte Inzidenz eines AKI, eine Zunahme der Schwere der HE sowie eine erhöhte Mortalität [76].

Neben PPI werden häufig nicht selektive Beta-Blocker zur Primär- oder Sekundärprophylaxe bei Ösophagusvarizen als Komplikation der Leberzirrhose eingesetzt. In einer Metaanalyse von Senzolo et al. hat sich der Einsatz von Beta-Blockern, insbesondere Propranolol (besonders bei Leberzirrhose im Stadium Child-Pugh (CP) A und B), als protektiv hinsichtlich der Entwicklung einer SBP gezeigt [77].

Die SBP bleibt dennoch eine schwere Erkrankung mit hoher initialer Mortalitätsrate (ca. 30 % bei hospitalisierten Patienten) und einer schlechten Prognose. Nach der Erstdiagnose einer SBP liegt die Mortalitätsrate nach einem Monat bei ca. 30 %, nach einem Jahr bei ca. 60 % [78].

1.2 SBP versus Peritonealkarzinose - diagnostische Grenzen

Das Wissen um die Genese des Aszites ist bezüglich Therapie und Prognose unabdingbar. Als Goldstandard zur Diagnostik einer SBP zählt die Bestimmung der Zellzahl und Zelldifferenzierung mit einer Erhöhung der PMN auf $> 250/\mu\text{l}$. Aber auch bei einem malignen Aszites können Zellzahl und Anteil an PMN erhöht sein. Des Weiteren ist die Beimpfung von Kulturflaschen eine weitere diagnostische Möglichkeit und in 36-59 % der Fälle sind bei Patienten mit einer SBP positive Kulturergebnisse zu finden.

Goldstandard zur Detektion eines malignen Aszites ist die Zytologie. Hier ist eine Sensitivität von 58 % mit einer Spezifität von nahezu 100 % beschrieben. Weitere Marker, die zur Differenzierung beitragen können, sind Cholesterin (Sensitivität bis 91 %, Spezifität bis 95 %), CEA (Sensitivität bis 51 %, Spezifität bis 99,8 %). Andere Tumormarker werden zur Differenzierung zwischen malignem und nicht malignem Aszites nicht empfohlen. Auch die Bestimmung der Eiweiß-, LDH- und Fibronektinkonzentration im Aszites sowie des SAAG sollte nicht in den diagnostischen Algorithmus einbezogen werden [2, 11, 79]. Andere differentialdiagnostische Parameter wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder lösliches humanes Leukozyten Antigen-G wurden untersucht, haben aber noch keinen Einzug in die Standarddiagnostik gefunden [80, 81].

Die Relevanz einer optimierten Diagnostik mit möglichst minimal invasiven bzw. nicht invasiven Methoden ist unbestritten, weshalb in dieser Arbeit mögliche diagnostische Marker im Aszites, der via komplikationsarmer Aszitespunktion/-drainage gewonnen wurde, evaluiert werden.

1.3 DNA-Methylierung als Biomarker

Die in 2001 gegründete *Biomarkers Definition Working Group 2001* definiert einen Biomarker als ein Merkmal, welches objektiv gemessen und ausgewertet werden kann und als Indikator für physiologische und pathogene Prozesse oder pharmakologisches Ansprechen auf eine therapeutische Intervention dient [82]. Die Evaluation neuer Biomarker war und ist ein großer Schritt auf dem Weg der personalisierten Medizin. Idealerweise sollte die Gewinnung von Probenmaterial einfach und nicht invasiv erfolgen.

Bereits 1983 wurde durch Feinberg und Vogelstein sowie von der Arbeitsgruppe Gama-Sosa et al. ein verändertes Methylierungsmuster in Malignomen aufgezeigt [83, 84]. DNA-Methylierung zählt zu den epigenetischen Modifikationen, die seit den vergangenen Jahren zunehmende Bedeutung in der Forschung, eben auch im Hinblick auf Malignome inklusive Karzinogenese, Therapieoptionen und Prognose, erlangen. Epigenetische Modifikationen sind chemische Veränderungen der DNA oder des Chromatins ohne die DNA-Sequenz zu verändern, sie sind vererbbar und Änderungen reversibel.

1 Einführung

Bei der DNA-Methylierung wird postreplikativ fast immer an das 5. Kohlenstoffatom der Base Cytosin, innerhalb eines CpG-Dinukleotides gelegen, eine Methylgruppe (-CH₃) durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) übertragen. Häufig erfolgt die DNA-Methylierung in einer Promoter- oder Enhancer-Regionen, in denen besonders viele solcher CpG-Dinucleotide (CpG-Inseln) vorhanden sind, mit der Konsequenz die Transkription des auf die Promoterregion folgenden Genes zu reduzieren bzw. zu verhindern. Der physiologische Methylierungsstatus in den unterschiedlichen Geweben ist verschieden. Es hat sich gezeigt, dass eine globale DNA-Hypomethylierung zu genetischer Instabilität führt, somit einen Risikofaktor für die Karzinogenese darstellt, aber auch ein potentieller Biomarker in Diagnostik, Therapie und Prognose bei Karzinomen sein kann.

1.3.1 Methylierung von LINE-1 und miR-137 und ihre Bedeutung in der Karzinogenese

Die DNA-Methylierung als meist untersuchte epigenetische Modifikation einer Vielzahl von Erkrankungen spielt, wie eben erwähnt, u. a. eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese. Typische Veränderungen der Methylierung in Malignomen sind eine globale Hypomethylierung sowie eine lokale Hypo- oder Hypermethylierung von Promoterregionen. Als Surrogatmarker für den globalen Methylierungsstatus hat sich *Long interspersed nuclear element-1* (LINE-1) etabliert.

LINE-1 gehört zu den *non-long terminal repeat* transposablen Elementen (non-LTR), eine Untergruppe der repetitiven Elemente der DNA, welche ca. 50 % des menschlichen Genoms ausmachen. LINE-1 hat mit ca. 17 % einen erheblichen Anteil daran [85, 86].

1993 veröffentlichten Thayer et al. erstmals eine Studie zum Methylierungsstatus von LINE-1 im Tumorgewebe [87]. Seitdem sind zahlreiche Arbeiten erschienen, in denen eine Hypomethylierung von LINE-1 in verschiedenen Tumorgeweben im Vergleich zu Nicht-Tumorgewebe detektiert werden konnte [88]. Zudem erschienen zunehmend Studien, bei denen DNA-Hypomethylierung sowohl in malignem Gewebe als auch deren Vorstufe nachgewiesen wurde. Park et al. beispielsweise zeigten eine Zunahme der globalen Hypomethylierung in der schrittweisen Genese des Magenkarzinoms (chronische Gastritis → intestinale Metaplasie → Magenadenom → Magenkarzinom) [89]. Ähnliches konnte von Bae et al. dargestellt werden [90]. Hier wurde gezeigt, dass die Hypomethylierung vom Magenadenom zum Magenkarzinom zunehmend ist. In anderen Studien zeigte sich eine vermehrte Hypomethylierung von *high grade* Dysplasien und Magenkarzinom im Vergleich zu *low grade* Dysplasien (Wien Klassifikation). Dysplasien und Magenkarzinom wiederum wiesen eine vermehrte Hypomethylierung im Vergleich zu normalem Gewebe auf [91, 92]. Eine erhöhte Hypomethylierungsrate an Gewebeproben von Magenkarzinomen konnte auch in der kürzlich erschienen Studie an einer europäischen Population gezeigt werden. Signifikante

1 Einführung

Unterschiede im Vergleich von präkanzerogenen Läsionen und normaler Magenmukosa waren hier, im Gegensatz zu den eben erwähnten asiatischen Studien, jedoch nicht erkennbar [88].

Viele veröffentlichte Studien sowohl über Karzinome des Gastrointestinaltrakts als auch verschiedene andere Malignome zeigen ein ähnliches Bild, das der globalen Hypomethylierung im Karzinomgewebe im Vergleich zu dem nicht tumorösen Gewebe.

Studien, bei denen Körperflüssigkeiten auf ihren Methylierungsstatus untersucht wurden sind weniger zahlreich zu finden, wobei die Untersuchung dieser viele potentielle Vorteile mit sich bringt. Zum einen ist die Gewinnung solcher nicht oder weniger invasiv möglich als die von z. B. Gewebe, zum anderen können repräsentativere Analysen bei Tumorerogenität durchgeführt werden [93]. Studien zur Analyse des globalen Methylierungsstatus via LINE-1 in *Liquid biopsies* sind begrenzt. Zwei Studien untersuchten beispielsweise den Methylierungsstatus verschiedener Gene der Peritoneallavage von Patienten mit Magenkarzinom und sprachen der Methylierungsanalyse einen möglichen Nutzen in der Diagnose einer Peritonealkarzinose zu [94, 95]. **Abb. 3** zeigt mögliche pathogene Funktionen von LINE-1 in Karzinomen.

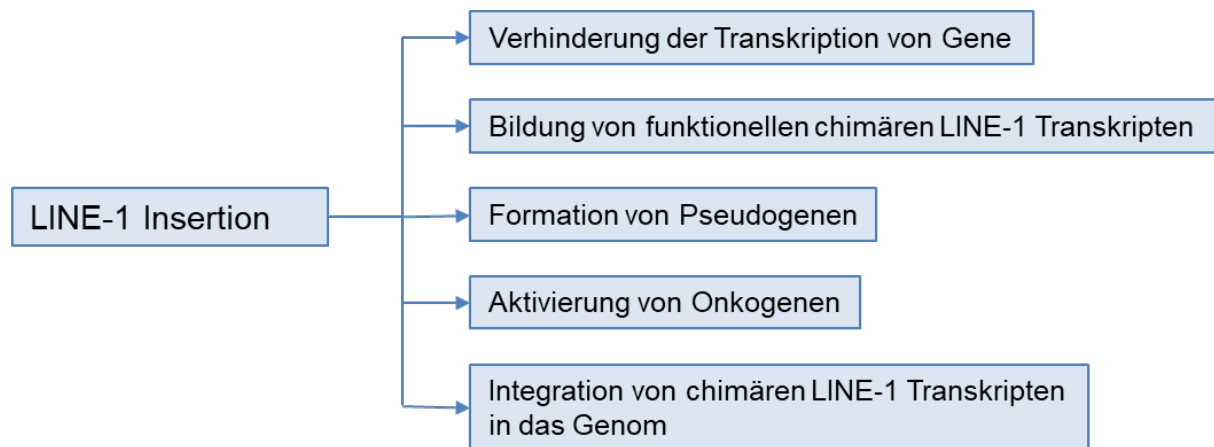


Abb. 3: Mögliche pathogene Funktionen von LINE-1 in Karzinomen (modifiziert von dem Schema von Kerachian et al. [96])

In der hiesigen Arbeit wurde neben dem Methylierungsstatus von LINE-1 auch der des Genes für microRNA-137 (miR-137) in Aszitesproben untersucht. MicroRNA (miRNA), initial 1993 von Lee et al. entdeckt [97], sind kleine (18-24 Basenpaare (bp)), nicht kodierende RNA Sequenzen, die über Vorläuferstufen (pri-miRNA, pre-miRNA, reife miRNA) als reife miRNA posttranskriptional die Ziel-messenger RNA (mRNA) beeinflussen. So können sie z. B. zur Stilllegung von Genen führen, indem sie als Teil des *RNA-induced silencing Complex* (RISC) die Translation verhindern oder reduzieren oder die mRNA Degradation fördern. So kommt es, dass physiologische Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Zell-Zyklus-Kontrolle, Hämatopoese, Alterung durch miRNA beeinflusst werden [98, 99]. Abgesehen von

1 Einführung

der intrazellulären Funktion üben miRNA auch extrazellulär Einfluss aus. So wurde miRNA sowohl in Exosomen, frei zirkulierend oder an Proteine gebunden detektiert. Sie können als Onkogene oder Tumorsuppressorgene fungieren, sind stabil gegen RNA Degradation und bleiben lange Zeit im Gewebe nachweisbar [100]. Zudem zeigte sich, dass die Inaktivierung von miRNA Genen durch Methylierung regulatorischer CpG Inseln vielfach höher ist als die von z. B. Protein-kodierenden Genen [101]. Es verwundert nicht, dass sowohl die Expression als auch der Methylierungsstatus der zugehörigen Gene im Blickpunkt der Forschung stehen. Veränderungen der DNA-Methylierung führen zu einem veränderten Expressionsverhalten. Häufig untersucht ist der DNA-Methylierungsstatus bei Patienten mit Malignomen. Ca. 20 % aller miRNA liegen innerhalb von CpG Inseln und sind damit von besonderem Interesse hinsichtlich Methylierung und Expression. MiR-137 ist eine solche miRNA, auf Chromosom 1p22 liegend, eingebettet in CpG Inseln und gerade deshalb häufig in den Fokus der Forschung geraten. Mehrere Studien haben eine Hypermethylierung von miR-137 in Tumorgewebe nachgewiesen, z. B. bei Blasenkarzinomen [102], Glioblastomen, Karzinomen der Mundhöhle [103], Mamma- [104] und Lungenkarzinomen [105]. Ebenso war dies für Patienten mit Malignomen des Gastrointestinaltraktes zu detektieren. In einer Studie von Bandres et al. zeigte sich im Gewebe von Kolonkarzinomen eine vermehrte Hypermethylierung u. a. auch für miR-137 und eine umgekehrte Korrelation zu dessen Expression [106]. Huang et al. konnte ähnlich wie Balaguer et al. darstellen, dass bereits in präkanzerösen Läsionen eine Hypermethylierung von miR-137 vorliegt [100, 107]. In Bezug auf das Magenkarzinom zeigte sich in einer Studie von Steponaitiene et al. ein ähnliches Ergebnis. Hier konnte eine zunehmende Hypermethylierung von miR-137 in der schrittweisen Genese des Magenkarzinoms (Correa-Kaskade) und eine umgekehrte Expression sowie negative Korrelation des Methylierungsstatus von LINE-1 detektiert werden [108]. Das unterstützt die Annahme, dass miR-137 als Tumorsuppressor agiert.

Der Methylierungsstatus und die Expression von miRNA wurde ebenfalls in verschiedenen Körperflüssigkeiten (Sputum, Urin, Pleuraerguss, Blut) untersucht [109-112]. Zum aktuellen Zeitpunkt finden sich jedoch nur begrenzt Studien mit Methylierungsanalysen im Aszites. In einer 2016 veröffentlichten Arbeit von Jung et al. wurde die DNA-Methylierung von SHOX2 und SEPT9 im Aszites analysiert im Hinblick auf Unterschiede bei Vorliegen eines malignen (Nachweis maligner Zellen im Aszites), paramalignen (Nachweis eines Karzinoms ohne Nachweis maligner Zellen) und benignen (nicht maligne Erkrankung) Aszites [113]. Die Arbeitsgruppe von Hiraki et al. hat beispielsweise unterschiedliche Methylierungsstatus in Peritoneallavagen von Patienten mit einem Magenkarzinom in verschiedenen TNM Stadien detektiert [95]. Zum aktuellen Zeitpunkt ist keine Studie zum Methylierungsstatus von miR-137 und LINE-1 im Aszites veröffentlicht.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit können in 3 Hauptpunkte untergliedert werden:

- 1) **Feasibilität/proof of principle:** Es soll untersucht werden, ob DNA sowie ihr Methylierungsstatus im Aszites mittels kommerziell erhältlicher Extraktions- und Analysemethoden gemessen werden kann.
- 2) **Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Analyse:** Es wurden verschiedene präanalytische Parameter wie z. B. Zeit bis zur Materialaufarbeitung, verschiedene Alliquotierungsvolumina und deren Einfluss auf das Ergebnis analysiert.
- 3) **Evaluation von LINE-1 und miR-137 DNA-Methylierung** als potentielle Biomarker zur besseren Differenzierung der Genese des Aszites, insbesondere zwischen Peritonealkarzinose und SBP. Hierfür wurden die verschiedenen Methylierungsanalysen in unterschiedlichen Gruppen und Subgruppen miteinander verglichen und im Hinblick auf signifikante Ergebnisse und möglichen potentiellen Einsatz als klinischer Biomarker kritisch hinterfragt.

2 Material und Methoden

Die hier vorliegende Dissertation wurde an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg entsprechend der „*World Medical Association Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*“ durchgeführt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg hat dem Studienprotokoll (85/10) zugestimmt und jeder Proband hat vor Studieneinschluss die schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet.

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 4: Übersicht von Geräten und Verbrauchsmaterialien	
Geräte	
Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, Ger)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, Ger)
CFX96-Cycler	Bio-Rad (München, Ger)
E.A.S.Y RH System	Herolab (Wiesloch, Ger)
Eismaschine AF-10	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, USA)
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Ger)
Eppendorf® Reference® series adjustable-volume Pipettes 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Ger)
Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Kühlschrank 2-8 °C	Liebherr (Bulle, Ger)
Mini Electrophoresis Power Supply E143	Consort (Turnhout, Bel)
Multifuge 3 S-R	Heraeus (Hanau, Ger)
Multipipette Plus	Eppendorf (Hamburg, Ger)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Ger)
PyroMark Q96 ID	Qiagen (Hilden, Ger)
PyroMark Q96 Plate Low	Qiagen (Hilden, Ger)
PyroMark Q96 Vacuum Workstation	Qiagen (Hilden, Ger)
RCT basic (Magnetrührer)	IKA Labortechnik (Staufen, Ger)
Real-Time PCR	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Ger)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Ger)
Tiefkühlschrank -30°	Liebherr (Bulle, Ger)
Tiefkühlschrank -80° (Hera freeze)	Heraeus (Hanau, Ger)
Tissue Ruptor	Qiagen (Hilden, Ger)
Tissue Ruptor Disposable Probes	Qiagen (Hilden, Ger)
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Brea, USA)
Vortexer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen, Ger)

Tab. 4 (Fortsetzung): Übersicht von Geräten und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	
BD Vacutainer Urin Röhrchen (10 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, Ger)
Beckmann-Röhrchen	Nalgene (Hereford, UK)
Combitips	Eppendorf (Hamburg, Ger)
Collection Tubes	Qiagen (Hilden, Ger)
Eppendorf 1,5 ml safe-lock Tubes	Eppendorf (Hamburg, Ger)
Eppendorf Uvette, 8,5 mm	Eppendorf (Hamburg, Ger)
Falcon Conical Centrifuge Tubes	Becton Dickinson (Heidelberg, Ger)
Kryoröhrchen 2 ml	Roth (Karlsruhe, Ger)
Muliplate PCR Plates 96-well, clear	Bio-Rad (München, Ger)
PCR 8er-SoftStrips 0,2 ml	Biozym (Hessisch Oldendorf, Ger)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Ger)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Ger)
SafeSeal-Tips professional	Biozym (Hessisch Oldendorf, Ger)
SafeSeal Reagiergefäße 2 ml PP	Sarstedt (Nümbrecht, Ger)

2.2 Chemikalien, Reagenzien, Zelllinien, Kits und Primer

Tab. 5: Übersicht von Chemikalien, Reagenzien, Zelllinien, Kits und Primern

Chemikalien und Reagenzien	
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth (Karlsruhe, Ger)
Aqua dest	Uniklinik Magdeburg
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, Ger)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, Ger)
dNTP's	Promega (Walldorf, Ger)
EDTA 0,1 M	Bio-Rad (München, Ger)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, Ger)
Ethanol 96 %	Merck (Darmstadt, Ger)
Ethanol 100 %, 75 %, 70 %, 10 %	Uniklinik Magdeburg
Ethidiumbromid 1 %	Roth (Karlsruhe, Ger)
HEPES 0,1 M	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HyperLadder	Bioline (Luckenwalde, Ger)
Loading Buffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Natriumcitrat 0,1 M	Merck (Darmstadt, Ger)
Natriumhydroxid 8 mM	Merck (Darmstadt, Ger)
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen (Hilden, Ger)
PyroMark Binding Buffer	Qiagen (Hilden, Ger)
PyroMark Denaturation Solution	Qiagen (Hilden, Ger)
PyroMark Gold Q96 reagents	Qiagen (Hilden, Ger)
RNase-freies Wasser	Qiagen (Hilden, Ger)
Streptavidin Sepharose® HP	Merck (Darmstadt, Ger)
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	Uniklinik Magdeburg
TRIS-EDTA Puffer (TE-Puffer)	Uniklinik Magdeburg

Tab. 5 (Fortsetzung): Übersicht von Chemikalien, Reagenzien, Zelllinien, Kits und Primern	
Zelllinien	
AGS (CRL-1739)	American Type Culture Collection ATCC (Manassas, USA)
Jurkat-Zellen	Biomol GmbH (Hamburg, Ger)
Kits und Primer (in den Kits enthaltene Puffer und Verbrauchsmaterialien werden nicht extra aufgeführt)	
Cell-to-CpG Bisulfite Conversion Kit 50	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HotStarTaq Plus Master Mix	Qiagen (Hilden, Ger)
Primer LINE-1 (146 bp) - Vorwärtsprimer - Rückwärtsprimer (biotinyliert)	5'-TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA-3' 5'-AAAATCAAAAATTCCTTTC-3'
Primer miR-137 (104 bp) - Vorwärtsprimer - Rückwärtsprimer (biotinyliert)	5'-TGGATTTTTTTTTAGGGAAAT-3' 5'-CCACCAAACTCTTACTACTC-3'
RNeasy Plus Universal Mini Kit	Qiagen (Hilden, Ger)
TaqMan Universal Master Mix II, no UNG	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.3 Software

Tab. 6: Verwendete Software	
Easy-to-use PyroMark Q96 ID Software 2.5	Qiagen (Hilden, Ger)
EndNote X9	Bilaney Consultants GmbH (Düsseldorf, Ger)
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software (San Diego, USA)
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation (Washington, USA)

2.4 Studiendesign

Die Arbeit lässt sich prinzipiell in 2 Abschnitte gliedern. In einem ersten präanalytischen Schritt wurde nach erfolgreicher DNA-Extraktion aus dem Aszites der Einfluss unterschiedlicher Lagerungszeiten und Lagerungsbedingungen bis zur Weiterverarbeitung, verschiedene Alliquotierungsvolumina und die Reproduzierbarkeit evaluiert. In einem weiteren Schritt ist der Methylierungsstatus der DNA mit Hilfe der LINE-1 und miR-137 Methylierung im Aszites detektiert und im Hinblick auf Unterschiede in der Methylierung, in von uns zusammengefassten Gruppen und Subgruppen (s.u.), analysiert worden. Dieser zweite Abschnitt beinhaltet zudem Korrelationsanalysen zwischen Methylierungsstatus und verschiedenen laborchemischen Parametern bzw. klinisch angewandten Scores.

2.4.1 Präanalytik

In diesem Abschnitt wurde die Stabilität der DNA-Methylierung, Reproduzierbarkeit sowie der Einfluss unterschiedlicher Alliquotierungsvolumina untersucht. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Hilden). Zur Prüfung der Stabilität wurde die DNA von 5 Proben nach 0-, 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation bei Raumluft extrahiert. Von

2 Material und Methoden

7 Patienten wurden jeweils 2 Proben zum selben Zeitpunkt oder mit geringer zeitlicher Differenz gewonnen und analysiert. Zudem wurde der Methylierungsstatus verschiedener Aliquotierungsvolumina (1 ml und 8 ml) miteinander verglichen. **Abb. 4** zeigt einen Überblick.

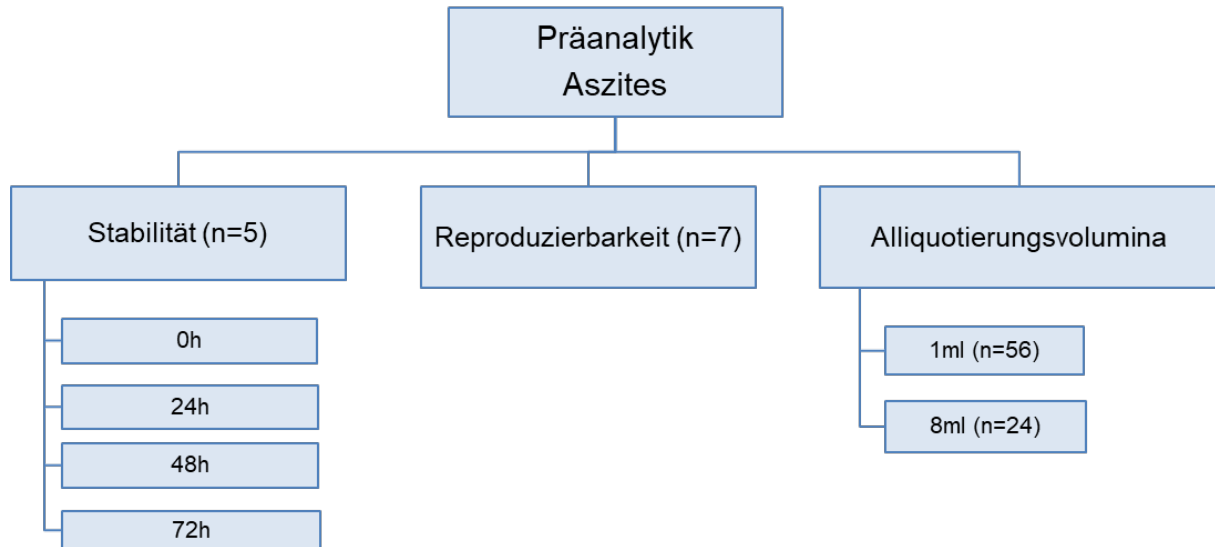


Abb. 4: Schematische Darstellung des präanalytischen Abschnitts. Anzahl der Proben (n) für die Analyse. Zeit für die Stabilitätsanalysen (h).

2.4.2 Analyse der LINE-1 und miR-137 Methylierung im Aszites

Die insgesamt 79 eingeschlossenen Patienten konnten anhand ihrer vorliegenden Daten in insgesamt 4 Gruppen bezogen auf die Genese des Aszites eingeteilt werden. Die Gruppen portale Hypertension (PHT), Peritonitis, Karzinom ohne zytologischen Beweis einer Peritonealkarzinose (CA) und Peritonealkarzinose (PCA) wurden nach Gewinnung der präanalytischen Ergebnisse auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht und eventuelle Korrelation zu anderen, bisher wegweisenden Laborparametern evaluiert.

2.5 Patientenkollektiv und Aszitesproben

Die hier analysierten Proben wurden zwischen 07/2010 und 06/2013 mittels indizierter diagnostischer oder therapeutischer Aszitespunktion/-drainage gewonnen. Patienten, bei denen Material zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurde, wurden als separates Ergebnis gewertet.

2.5.1 Definition der Patientengruppen

Die Unterteilung der im vorherigen Abschnitt erwähnten 4 Hauptgruppen der 79 Patienten fand anhand folgender Kriterien statt (**Abb. 5**).

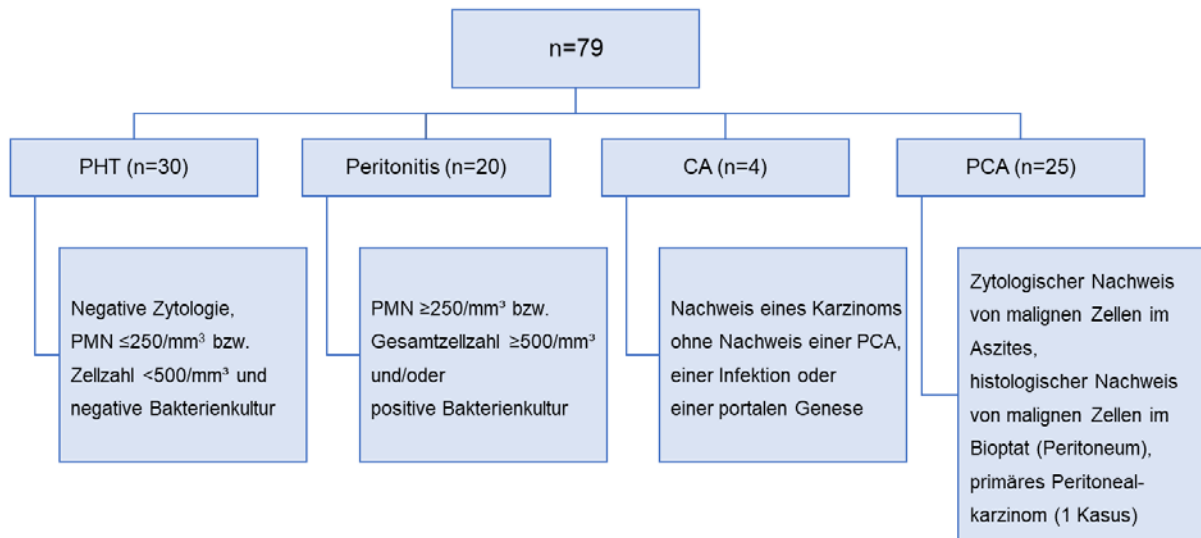


Abb. 5: Schematische Darstellung der Einteilung der Gruppen mit der jeweiligen Charakteristik. Anzahl der Patienten (n). Portale Hypertonie (PHT). Karzinom (CA). Peritonealkarzinose (PCA). Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). Zellzahl (ZZ).

Für eine detaillierte Zusammenschau der klinischen Parameter des Patientenkollektivs wird auf **Tab. 8** im Abschnitt 3.1 verwiesen.

2.5.2 Laborchemische, mikrobiologische und zytologische Datenerfassung der Aszitesproben

Die hier analysierten Aszitesproben wurden im Rahmen der Routinediagnostik durch die Institute für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Medizinische Mikrobiologie und Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg untersucht. Die klinische Chemie und Pathobiochemie lieferte Laborparameter wie Zellzahl, PMN, Protein/Albumin im Aszites und Blut, CRP, Leukozyten im Blut, die Mikrobiologie Informationen bezüglich einer Keimbeseidlung im Aszites und das Institut für Pathologie Ergebnisse hinsichtlich der Art der Zellen, welche im Aszites bzw. Gewebe zu finden waren.

2.5.3 Gewinnung der Proben, Lagerung und Verarbeitung

Die Gewinnung der Proben erfolgte bei klinisch indizierten Parazentesen direkt in 2 Vacutainerröhrchen ohne Zusatz. Der Transport der ungekühlten Proben ins Labor erfolgte innerhalb einer Stunde. 1,5 ml der Proben wurden entweder direkt in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt und bei -20 °C asserviert oder es wurden 1 ml und 8 ml zentrifugiert (10 Minuten bei

2 Material und Methoden

3600 rpm), das gewonnen Zellpellet in 100 µl Aszites aufgenommen und in 1,5 ml *safe-lock tubes* bzw. ab dem 15.04.2013 in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Falls es zu keiner sofortigen Weiterverarbeitung kam, wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die initial nicht zentrifugierten Proben wurden vor der Weiterverarbeitung schonend aufgetaut und 1 ml davon zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Aszites vor Einleitung der folgenden Analyseschritte aufgenommen.

2.6 DNA-Isolierung

Die DNA- sowie RNA-Isolierung, von denen Letztere kein Gegenstand dieser Arbeit darstellt, erfolgte mit dem RNeasy Plus Universal Mini Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll mit geringfügigen Modifikationen. Das ausführliche Protokoll kann **Anlage 1** entnommen werden. Kurz zusammengefasst wurden die Proben, bestehend aus 100 µl Aszites und Zellpellet, mit 900 µl QIAzol Lysis Reagent versetzt und mittels *Tissue Ruptor* homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 180 µl Chloroform erfolgte das erneute Vermischen mittels Vortexmischgerät und die anschließende Trennung verschiedener Phasen mittels Zentrifugation. Die obere wässrige Phase enthält die RNA. 500 µl dieser Phase wurden mit Hilfe einer Pipette entnommen, mit 100 %igem Ethanol resuspendiert und auf eine *RNeasy mini spin column* gegeben. Zur Gewinnung gereinigter RNA kamen unterschiedliche, im Kit enthaltene Puffer zum Einsatz. Die gereinigte RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die DNA-Isolierung erfolgte anschließend aus der Interphase der bereits mit QIAzol Lysis Reagent und Chloroform versetzten Proben, nachdem die Reste der flüssigen Phase, aus der die RNA gewonnen wurde, komplett durch Abpipettieren entfernt wurden. Nach Zugabe von 100 %igem Ethanol, Homogenisieren mittels Vortexmischers, Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation wurde der entstandene Überstand entfernt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 0,1 M Natriumcitratlösung, nachfolgend die Behandlung mit dem Vortexmischer und Inkubation bei Raumtemperatur im Thermomixer. Nach zweimaliger Wiederholung wurde 75 %iger Ethanol hinzugefügt, die gewonnene Probe erneut homogenisiert und bei Raumtemperatur im Thermomixer inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C wurde der Überstand vollständig entfernt, der verbliebene Rest nach Zugabe von 8 mM Natriumhydroxidlösung erneut mit dem Vortexmischer behandelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der so gewonnene Überstand in 1,5 ml *safe-lock tubes* überführt und mit 0,1 M HEPES- und 0,1 M EDTA-Lösung versetzt und, falls nicht sofort weiter verarbeitet, bei -20 °C gelagert.

2.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der Extinktion mit dem Spektrophotometer BioPhotometer. Die gelösten Nukleinsäuren absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm. Mehr Licht wird absorbiert, je höher die Nukleinsäurekonzentration in der Lösung ist. Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren werden diese in einem Verhältnis von 5:65 zu Beginn der Probenanalysen mit einem TE-Puffer, im Verlauf mit RNase-freiem Wasser verdünnt, in eine Küvette gegeben und, nach Kalibrierung des Spektrophotometers mit den jeweiligen verwendeten Zusätzen, gemessen. Spektrometrisch kann die Reinheit der Nukleinsäuren über das Verhältnis Nukleinsäure-Absorption zur Protein-Absorption bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste. Wie stark eine DNA- oder RNA-Lösung noch durch z. B. Alkohol oder Proteinreste verunreinigt ist, zeigt das Verhältnis der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm zu 280 nm an. Ein Verhältnis von $\sim 1,8$ für DNA und $\sim 2,0$ für RNA gilt als nicht verunreinigt.

2.8 Quantitative Messung der DNA-Methylierung

Im ersten Schritt erfolgte zur späteren Detektion der methylierten DNA-Sequenzen die Bisulfitmodifikation der gereinigten DNA mit dem Cells-to-CpG Bisulfite Conversion Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll mit geringer Modifikation. Eine detaillierte Beschreibung kann **Anlage 2** entnommen werden. In Kürze zusammengefasst wurden 500 ng der gereinigten DNA mit RNase-freiem Wasser gemischt und mit den verschiedenen, in dem Kit enthaltenen, Reagenzien und Pufferlösungen behandelt. Das am Ende gewonnene Eluat enthält die bisulfitmodifizierte DNA. Durch die Bisulfit-Behandlung von einzelsträngiger DNA wird Cytosin zu Uracil deaminiert und als Thymidin in der anschließenden PCR amplifiziert, während methyliertes 5'Methylcytosin nicht beeinflusst wird. Die PCR erfolgte mit biotinierten Primern für miR-137 und LINE-1. Diesen wurde H₂O und HotStarTaq Plus Master Mix zugefügt. 27 μ l dieses Mixes sowie 3 μ l der gewonnenen DNA wurden in ein PCR Tube überführt.

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im CFX96-Cycler für 15 min bei 95 °C inkubiert, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus jeweils 30 sek bei 95 °C, 30 sek bei 53 °C und 60 sek bei 72 °C. Anschließend erfolgte eine nochmalige Inkubation bei 72 °C für 10 min. Bis zur weiteren Verwendung wurde die modifizierte DNA bei 4 °C gelagert.

Zur Erfolgskontrolle wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein 1,2 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 1,2 g Agarosepulver mit 100 ml 1-fachen TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer vermischt und kurz aufgeköcht bis zur vollständigen Lösung. Anschließend wurden 0,5 μ l des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid

2 Material und Methoden

zugegeben. Das Gemisch wurde in eine Form gegossen mit einem 1,5 mm Kamm und durch Abkühlen bildete sich das feste Agarosegel. Das Gel wurde in die Gelkammer mit 1-fachen TBE-Puffer gelegt. 5µl des PCR-Produkts wurden mit 3 µl Loading Buffer vermischt und das Gel damit beladen. Als DNA-Marker wurde HyperLadder (Bioline) verwendet. Eine Spannung von 100 V wurde für 90 min angelegt. Anschließend wurden die Banden über ein Geldokumentationssystem mit Transluminator sichtbar gemacht.

Die quantitative Bestimmung der Methylierung von LINE-1 und miR-137 CpG Inseln erfolgte mittels Pyrosequenzierung der bisulfitbehandelten DNA mit dem PyroMark Q96 ID und dem Einsatz von PyroMark Gold Q96 reagents entsprechend dem Herstellerprotokoll. Detaillierte Angaben können **Anlage 3** entnommen werden. Kurz zusammengefasst binden mit Streptavidin beschichtete Kügelchen an das Biotin des Rückwärtsprimers (verwendet während der DNA-Amplifikation mittels PCR). Die PCR Produkte werden vor der Pyrosequenzierung denaturiert. Der gebundene DNA Strang dient als Templatestrang, an den sich der Sequenzierprimer anlagert. Anschließend wird ein Mix aus Enzymen (DNA Polymerase, Adenosin-5-Phosphorsulfat, Luziferase, Apyrase) und Substraten (Adenosin-5-Phosphorsulfat, Luziferin) zugefügt. Nun werden einzeln die zur Verlängerung des Sequenzierprimers benötigten Nucleotide hinzu pipettiert. Wurde das Nucleotid eingebaut, aktiviert das hierbei freigesetzte Pyrophosphat eine enzymatische Reaktion, die zur Generierung eines Lichtblitzes führt. Die Menge des Pyrophosphates ist äquimolar zur Menge des eingebauten dNTP, die Stärke des Lichtblitzes ist proportional zur Menge des entstandenen ATPs und der eingebauten Menge an Nucleotiden. Jedes nicht eingebaute Nucleotid wird vor Zugabe des Nächsten abgebaut. Die Mittelwerte des Methylierungsstatus der zu bestimmenden DNA-Regionen wurden durch integrierte Software anhand des Pyrogramms errechnet und fanden Eingang in die weiteren Analysen. Die Prozentangaben der DNA-Methylierung sind errechnet aus der gemessenen Differenz von T und C (denn methyliertes C wird in der Natriumbisulfitbehandlung nicht umgewandelt). Proben mit nicht ausreichend guter DNA-Qualität und/oder bei denen die Bestimmung des Methylierungsstatus nicht oder nicht sicher gelang, wurden von den Analysen ausgeschlossen.

2.9 Statistische Methoden

Mit Hilfe der PyroMark Q96 ID integrierten Easy-to-use PyroMark Q96 ID Software 2.5 wurden Methylierungsergebnisse gewonnen und gemeinsam mit anderen ermittelten Daten in eine Excel-Tabelle überführt. Die weiteren statistischen Analysen aller Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 6.0.

Der Shapiro-Wilk-Test wurde zur Testung auf Normalverteilung verwendet (**Tab. 7**). Die quantitative Auswertung nicht parametrischer Analysen erfolgte für 2 gepaarte Stichproben mit

2 Material und Methoden

dem Wilcoxon-Test bzw. für 2 ungepaarte mit dem Mann-Whitney-Test. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden für diese Tests als statistisch signifikant gewertet. Für 3 und mehr Stichproben wurde der Friedman-Test für gepaarte bzw. der Kruskal-Wallis-Test für ungepaarte benutzt. Das Signifikanzlevel wurde hierbei aufgrund multiplen Testens entsprechend der Formel: $\alpha/((n+1)/2)$ (n = Anzahl der Tests, $\alpha = 0,05$) angepasst [114]. Es wurden außerdem Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet, um die Zusammenhänge zwischen LINE-1 und miR-137 und klinischen Parametern zu beschreiben. Koeffizienten von weniger als 0,4 wurden als Hinweis auf eine geringe, von 0,4 bis 0,7 auf eine mittlere und von mehr als 0,7 auf eine starke Korrelation betrachtet [115].

Tab. 7: Test auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test.		
	Parameter	p-Wert
Aszites	Zellzahl	< 0,001
	PMN	< 0,001
	Albumin	< 0,001
	Protein	< 0,001
Blut	Albumin	0,950
	Protein	0,835
	CRP	< 0,001
	Leukozyten	< 0,001
	SAAG	0,409
% Methylierung	LINE-1	< 0,001
	miR-137	< 0,001

Legende: Signifikante Ergebnisse bedeuten keine Normalverteilung. $P \leq 0,05$ signifikant. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), C-reaktives Protein (CRP), Serum-Aszites-Albumin-Gradient (SAAG).

2.10 Eigenanteil

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden folgende Aspekte nach Einweisung in die experimentellen Anteile von mir eigenständig durchgeführt:

- Selbstständige Organisation, Verarbeitung und Lagerung der Aszitesproben
- Extraktion von RNA und DNA aus Aszitesproben (unterstützend mit Frau U. Stolz, Fr. M.Sc. C. Thon, RNA Extraktion sowie Herstellen und Messen der cDNA mittels quantitativer Real-Time PCR sind nicht Bestandteil dieser Arbeit)
- Pyrosequenzierung zur Erfassung des Methylierungsstatus (unterstützend mit Frau M.Sc. C. Thon)
- Erhebung von laborchemischen und klinischen Daten der Patienten
- Statistische Auswertung der Ergebnisse (unterstützend mit Prof. Dr. med. A. Link)

3 Ergebnisse

Die Evaluation der DNA-Methylierung als potentiellen Biomarker für die Veränderungen im Aszites ist bisher nicht ausreichend untersucht. Für diese *proof of principle* Studie haben wir LINE-1 und miR-137 ausgewählt, weil bei ihnen Veränderungen im Methylierungsstatus bei unterschiedlichen Erkrankungen, mitunter bei Malignomen, bereits in Geweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden konnten. LINE-1 hat sich als Surrogatmarker für den genomweiten Methylierungsstatus etabliert. Für miR-137 liegen ebenfalls Daten vor, dass die Methylierung bei malignen Erkrankungen verändert ist.

Zur Beurteilung der Machbarkeit und potentieller Einflüsse wurden in einem ersten präanalytischen Schritt der Einfluss der Probenbehandlung bzw. -lagerung, die Reproduzierbarkeit sowie der Einfluss unterschiedlicher Aliquotierungsvolumina untersucht. Anschließend wurde in einem zweiten Schritt der Methylierungsstatus in bestimmten Gruppen bzw. Subgruppen verglichen und der Einfluss verschiedener klinischer und laborchemischer Parameter in Korrelation zu diesen evaluiert.

3.1 Charakterisierung der Patienten

Insgesamt fanden die Ergebnisse der Aszitesproben von 79 Patienten, die in dem Zeitraum zwischen 07/2010 und 06/2013 in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie sowie der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Otto-von-Guericke-Universitätsklinik Magdeburg via Aszitespunktion bzw. Aszitesdrainage gewonnen werden konnten, Eingang in die Arbeit. Eine detaillierte Charakterisierung des Patientenkollektives zeigt **Tab. 8**.

Tab. 8: Charakteristika des Patientenkollektivs.					
	Total	PHT	Peritonitis	CA	PCA
Anzahl der Patienten - n (%)	79 (100,0)	30 (38,0)	20 (25,3)	4 (5,1)	25 (31,6)
Alter (y)	62,8 ± 11,1	59,2 ± 10,3	61,9 ± 12,5	66,8 ± 15,3	67,0 ± 8,8
Geschlecht - n (%)					
männlich	58 (73,4)	27 (46,6)	16 (27,6)	1 (1,7)	14 (24,1)
weiblich	21 (26,6)	3 (14,3)	4 (19,0)	3 (14,3)	11 (52,4)
Leberzirrhose - n (%)	51 (64,6)	30 (58,8)	13 (25,5)	1 (2,0)	7 (13,7)
ASH/NASH	2	2	0	0	0
Hämochromatose	2	2	0	0	0
kardiogen	2	2	0	0	0
kryptogen	9	1	4	1	3
toxisch	34	21	9	0	4
viral	2	2	0	0	0
Karzinom - n (%)	48 (60,8)	10 (20,8)	9 (18,8)	4 (8,3)	25 (52,1)
Bronchialkarzinom	2	0	1	0	1
B-Zell-Lymphom	1	1	0	0	0
CCC/Klatskin Tumor	9	2	2	3	1
CUP	3	0	0	0	3
Gallenblasenkarzinom	2	0	1	1	0
HCC	12	6	4	0	2
Hypopharynxkarzinom	1	1	0	0	0
Kolorektales Karzinom	2	0	0	0	2
GC/AEG	6	0	0	0	6
Nierenzellkarzinom	1	0	1	0	0
Ovarialkarzinom	1	0	0	0	1
Pankreaskarzinom	7	0	0	0	7
Peritonealkarzinom	1	0	0	0	1
Andere - n (%)	2 (2,5)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)
HIV	1	0	1	0	0
Pankreatitis	1	0	1	0	0
Albumin (g/dl)					
Aszites	12,3 ± 9,2	9,6 ± 8,2	9,1 ± 4,2	6,1 ± 3,8	22,9 ± 9,2
Blut	28,8 ± 6,3	29,5 ± 6,1	25,0 ± 6,1	25,6*	31,4 ± 5,4
CRP (mg/l)	75,4 ± 62,2	37,1 ± 38,6	100,1 ± 60,9	124,9 ± 132,1	98,1 ± 53,8
Leukozyten im Blut (Gpt/l)	10,4 ± 6,3	8,2 ± 4,1	13,0 ± 8,6	14,6 ± 4,6	10,2 ± 5,4
Zellzahl (Mpt/l)	3.674,4 ± 1.4496,4	150,0 ± 101,5	13.084,8 ± 27.118,5	102,0 ± 54,4	929,7 ± 1.492,7
PMN					
in Mpt/l	3.506,2 ± 14.221,6	42,0 ± 50,0	12.760,4 ± 25.966,2	15,4 ± 11,5	448,1 ± 757,1
in % der Zellzahl	38,3 ± 31,4	25,2 ± 24,2	67,7 ± 30,1	19,5 ± 7,8	29,4 ± 24,2
Methylierung (%)					
LINE-1	71,3 ± 3,6	70,1 ± 3,7	72,3 ± 3,0	72,3 ± 3,4	71,6 ± 3,8
miR-137	18,5 ± 14,7	19,0 ± 14,2	10,5 ± 8,1	20,8 ± 23,0	23,1 ± 16,0

3 Ergebnisse

Legende zu Tab. 8 (vorherige Seite): Mittelwert \pm Standardabweichung (Mean \pm SD). Portale Hypertonie (PHT). Karzinom (CA). Peritonealkarzinose (PCA). Alkoholische Steatohepatitis/nichtalkoholische Steatohepatitis (ASH/NASH), Cholangiozelluläres Karzinom (CCC), *Cancer of unknown primary* (CUP), Hepatozelluläres Karzinom (HCC), Magenkarzinom/Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs (GC/AEG), Humane Immundefizienz-Virus (HIV). Gramm/Deziliter (g/dl), C-reaktives Protein (CRP), Milligramm/Liter (mg/l), Gigapartikel/Liter (Gpt/l), Megapartikel/Liter (Mpt/l), polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), *long interspersed nuclear element-1* (LINE-1), microRNA miR-137 (miR-137). * \pm SD nicht bestimmbar, da nur 1 Wert vorhanden.

3.2 Durchführbarkeit der Methylierungsanalyse von LINE-1 und miR-137 im Aszites

Körperflüssigkeiten sind mitunter aufgrund der meist relativ einfachen und wenig invasiven Methoden für deren Gewinnung hinsichtlich der Evaluation potenter Biomarker von besonderem Interesse, sei es für maligne Erkrankungen, Erbkrankheiten, Entzündungen u. a.. Die epigenetische Analyse von Aszites oder Peritonealdialysat ist bereits Gegenstand einiger Studien. Eine DNA-Methylierung im Aszites ist bisher nicht untersucht worden, so dass wir in diesem Kapitel die grundsätzliche Machbarkeit einer solchen Analyse evaluierten. Die uns zur Verfügung stehenden Kits zur DNA- und RNA-Isolierung waren das RNeasy Plus Universal Mini Kit und das AllPrep DNA/RNA Mini Kit. Wie in **Tab. 9** ersichtlich, konnten mit dem RNeasy Plus Universal Mini Kit höherer DNA-Konzentrationen gewonnen werden, weshalb dieses zur DNA-Isolierung verwendet wurde.

Tab. 9: Vergleich der DNA-Konzentration gewonnen mit dem RNeasy Plus Universal Mini Kit und AllPrep DNA/RNA Mini Kit.

Kit	Probe	DNA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)
RNeasy Plus Universal Mini Kit	1	132,3
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	1	19,0
RNeasy Plus Universal Mini Kit	2	102,3
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	2	18,4
RNeasy Plus Universal Mini Kit	3	294,9
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	3	8,9
RNeasy Plus Universal Mini Kit	4 (AGS)	808,8
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	4 (AGS)	249,8

Legende: Magenkarzinomzellen (AGS).

Mit der so gewonnenen DNA konnten nun die Methylierungsanalysen durchgeführt werden. In **Abb. 6** sind alle Werte von unserem Patientenkollektiv dargestellt.

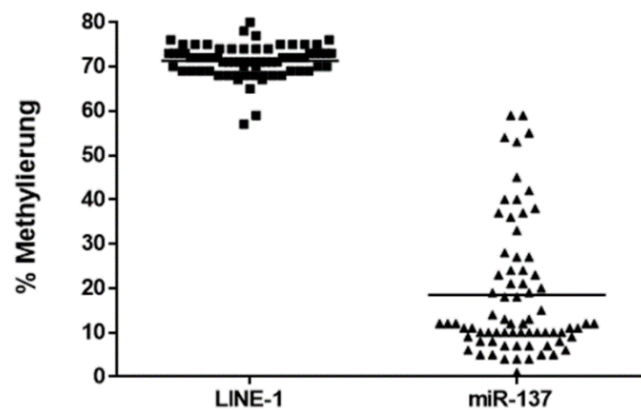


Abb. 6: Machbarkeit und Übersicht der Methylierungsanalyse für LINE-1 und miR-137. (79 Proben, 6 Ergebnisse für LINE-1 und miR-137 wurden aufgrund einer zu großen Abweichung vom Mittelwert von der gesamten Analyse ausgeschlossen).

3.3 Stabilität der DNA-Methylierung

Zunächst untersuchten wir, ob eine Probenlagerung bzw. der Transport der Proben bis zur Aufarbeitung des Aszites einen Einfluss auf die DNA-Methylierungsanalyse haben könnte. Für diesen Zweck testeten wir systematisch Proben von 5 Patienten. Auch wenn die Probenaufarbeitung im Arbeitsalltag meistens innerhalb von 24 Stunden erfolgt, ist eine Verzögerung bis zur Bearbeitung des Materials unter bestimmten Umständen möglich. Unsere Untersuchungen zeigen Ergebnisse bis 72 Stunden nach Probenentnahme. Es wurde der entnommene Aszites zum Zeitpunkt 0 und nach weiteren 24, 48 und 72 Stunden Inkubation unter Raumtemperatur zentrifugiert. Das gewonnene Pellet ist in 100 µl Aszites aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert worden. Die Analyse der 4 verschiedenen Zeitpunkte eines Patienten erfolgte am selben Tag. Anhand der Analysen ergab sich kein signifikanter Unterschied (**Abb. 7**, LINE-1: $p = 0,6413$; miR-137: $p = 0,3382$), so dass von einer mindestens dreitägigen Stabilität der DNA-Methylierung unter Raumtemperatur ausgegangen werden kann.

3 Ergebnisse

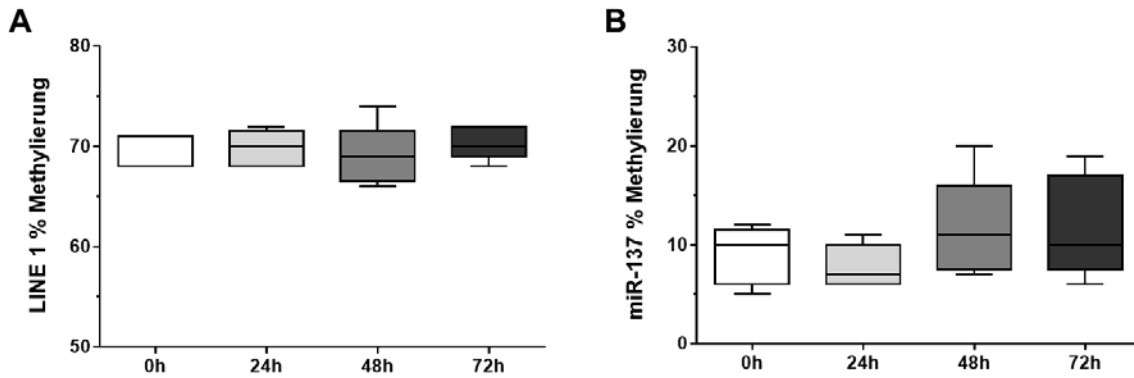


Abb. 7: Stabilität der DNA-Methylierung. DNA-Methylierung von (A) LINE-1 und (B) miR-137 von 5 Proben zu je 4 verschiedenen Inkubationszeitpunkten, Zeitpunkt 0 h, 24 h, 48 h, 72 h. Während der Inkubation wurden die Proben bei Raumtemperatur gelagert. Die Analyse wurde mit dem Friedman-Test durchgeführt. Stunden (h).

3.4 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu validieren, untersuchten wir zunächst 6 prospektiv gesammelte Probenpaare auf den Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 (Abb. 8) in 2 unabhängigen Extraktionen. Im Vergleich von Messung 1 und Messung 2 zeigte sich kein signifikanter Unterschied sowohl für die LINE-1 als auch für die miR-137 Analysen (Abb. 8 A). Zudem bestand eine positive Korrelation zwischen beiden Messungen (Abb. 8 B). Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse eine gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit, was prinzipiell auf die Validität der Analysen sowie Eignung der Methode hindeutet.

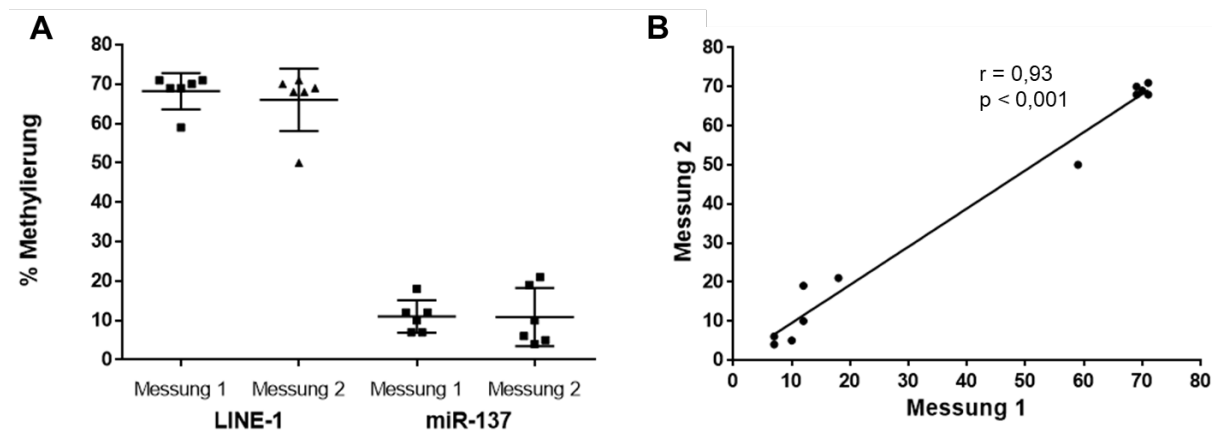


Abb. 8: Nachweis von DNA-Methylierung im Aszites und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anhand von 6 Datenpaaren jeweils für LINE-1 und miR-137. Vergleich der DNA-Methylierung von (A) LINE-1 und miR-137. Messung 1 und Messung 2 zeigen die Werte von 6 Probenpaaren, deren Extraktion unabhängig voneinander durchgeführt wurde. Die Analyse wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. (B) Korrelation der Probenpaare aus Messung 1 und Messung 2 von der Analyse für LINE-1 und miR-137. Die Analyse wurde mit der Spearman-Test durchgeführt.

3.5 Einfluss der Aliquotierungsvolumina auf den Methylierungsstatus

Bei einer Aszitespunktion bzw. -drainage werden in einigen Fällen nur geringe Mengen Material gewonnen, was eine diagnostische Untersuchung erschwert. Mehr Material, insbesondere bei der zytopathologischen Beurteilung hinsichtlich der Frage nach einem malignen Aszites kann aber zu einer verbesserten Sensitivität führen. Wir untersuchten, ob bessere Ergebnisse hinsichtlich der DNA-Methylierung durch größere Aliquotierungsvolumina zu erzielen sind. Von derselben Probe wurden jeweils 1 ml und 8 ml des Materials zentrifugiert und wie oben beschrieben bearbeitet.

Im Vergleich der Proben aller Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied im Methylierungsverhalten sowohl für LINE-1 als auch für miR-137 (**Abb. 9 A**). Um den möglichen Einfluss von z. B. Entzündungszellen und malignen Zellen zu eliminieren, wurde der Methylierungsstatus bei unterschiedlichen Aliquotierungsvolumina der Gruppe PHT miteinander verglichen. Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied dargestellt werden (**Abb. 9 B**).

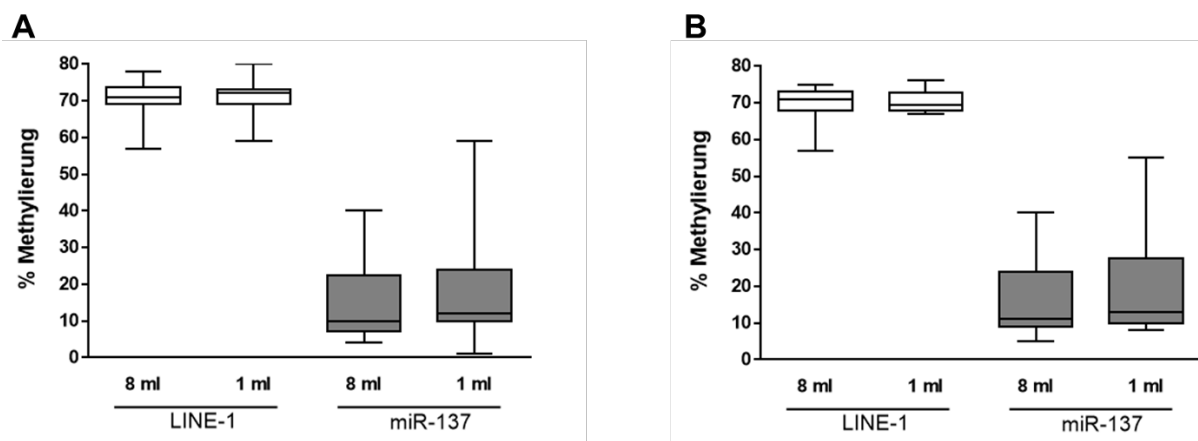


Abb. 9: Einfluss unterschiedlicher Aliquotierungsvolumina (1 ml und 8 ml) auf den Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137. Untersucht wurden (A) Proben aus allen Gruppen (24 Proben für 8 ml, 51 Proben für 1 ml) und (B) Proben der Gruppe PHT (15 Proben für 8 ml, 16 Proben für 1 ml). Die Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Portale Hypertonie (PHT).

3.6 DNA-Methylierung - Vergleich ausgewählter Gruppen und Subgruppen

In den vorangegangenen Abschnitten ist die Machbarkeit der DNA-Methylierung aus Aszitesproben sowie Reproduzierbarkeit, Stabilität der Proben und Einfluss unterschiedlicher Aliquotierungsvolumina zur Darstellung gekommen. In diesem Kapitel wurde das Patientenkollektiv in verschiedene Gruppen und Subgruppen gegliedert und hinsichtlich ihres Methylierungsverhaltens miteinander verglichen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Peritonitis und PCA als Genese des Aszites gelegt. Hier ist die richtige Diagnose ausschlaggebend für die therapeutische Konsequenz und Prognose. Weiterhin wurde die Leberzirrhose als häufigste Ursache eines Aszites detailliert analysiert.

3.6.1 Vergleich des gesamten Patientenkollektivs

Im Hinblick auf die Zielstellung einen potentiellen Biomarker für die Diagnostik der Genese des Aszites, insbesondere bei PCA, zu evaluieren, folgt in diesem Arbeitsabschnitt die Analyse des Methylierungsstatus im Vergleich von verschiedenen Gruppen und Subgruppen.

Zu Beginn wurde eine Übersicht des Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 erarbeitet. Hierbei zeigten sich durchschnittliche Werte für LINE-1 von $71,29 \pm 3,59 \%$ und für miR-137 von $18,47 \pm 14,72 \%$ im gesamten Patientenkollektiv (**Abb. 6**). Im nächsten Schritt wurden die Proben bezüglich der Genese von Aszites eingeteilt und untersucht. Beim Vergleich von Aszitesproben der Gruppe PHT mit denen der 3 anderen Hauptgruppen (Peritonitis, CA und PCA) zusammen zeigte sich für LINE-1 ein signifikanter Unterschied ($70,12 \pm 3,73 \%$ vs. $71,94 \pm 3,37 \%$, $p = 0,0183$), nicht jedoch für miR-137 (**Abb. 10**).

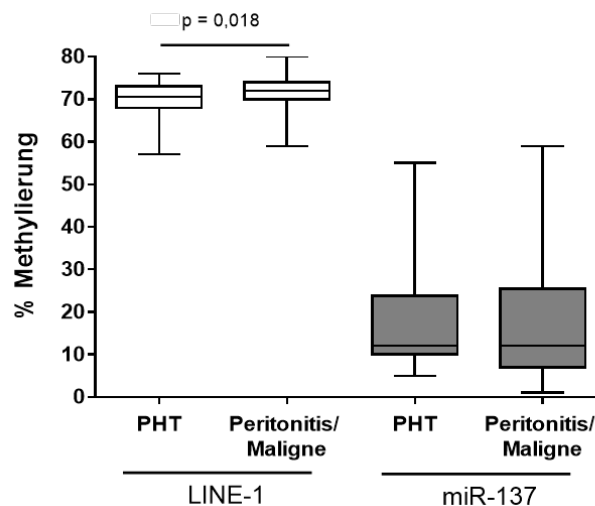


Abb. 10: Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 der Gruppe PHT und der restlichen Gruppen. Methylierungsstatus der Gruppe PHT (30 Proben) vs. alle anderen Gruppen (49 Proben). PHT (30 Proben, LINE-1: 4 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 2 Ergebnisse ausgeschlossen), Peritonitis (20 Proben, miR-137: 3 Ergebnisse ausgeschlossen), CA (4 Proben), PCA (25 Proben, LINE-1: 2 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 1 Ergebnis ausgeschlossen). Die Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Portale Hypertonie (PHT), CA und PCA zusammengefasst (Maligne), Karzinom (CA), Peritonealkarzinose (PCA).

Der Vergleich der Methylierungsstatus der 4 Hauptgruppen (PHT, Peritonitis, CA und PCA) untereinander konnte für LINE-1 keine signifikanten Werte darstellen, jedoch einen Trend zur geringeren Methylierung der Gruppe PHT vs. Peritonitis ($70,12 \pm 3,73$ vs. $72,30 \pm 2,96\%$, $p = 0,0280$; adjustiertes Signifikanzniveau aufgrund multiplen Testens: $\leq 0,0142$). Zwischen PHT vs. Peritonitis bestanden bei miR-137 signifikante Unterschiede im Methylierungsstatus ($19,04 \pm 14,16 \%$ vs. $10,47 \pm 8,08 \%$, $p = 0,0035$) (**Abb. 11 A und B**).

3 Ergebnisse

Im Vergleich zur Peritonitisgruppe zeigten die Proben von Patienten mit Malignomen bzw. Patienten mit nachgewiesener PCA einen höheren miR-137-Wert mit größerer Variation, signifikant war der Unterschied zwischen Peritonitis und PCA ($10,47 \pm 8,08$ % vs. $23,8 \pm 16,05$ %, $p = 0,0008$) (**Abb. 11 A und B**).

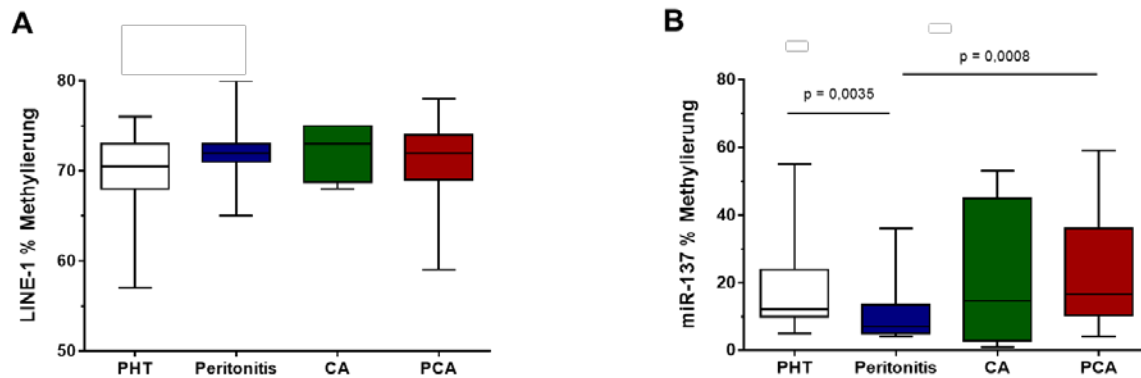


Abb. 11: Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 der verschiedenen Hauptgruppen entsprechend der Genese des Aszites. Methylierungsstatus von LINE-1 (**A**) und von miR-137 (**B**) im Vergleich der 4 Hauptgruppen PHT (30 Proben, LINE-1: 4 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 2 Ergebnisse ausgeschlossen) vs. Peritonitis (20 Proben, miR-137: 3 Ergebnisse ausgeschlossen) vs. CA (4 Proben) vs. PCA (25 Proben, LINE-1: 2 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 1 Ergebnis ausgeschlossen). Es erfolgte eine Vorselektion mit dem Kruskal-Wallis-Test, anschließend die einzelne Testung mittels Mann-Whitney-Test bei adjustiertem Signifikanzniveau ($\alpha_{\text{adjustiert}}: 0,0142$).. Portale Hypertonie (PHT), Karzinom (CA), Peritonealkarzinose (PCA).

3.6.2 Peritonealkarzinose – detaillierter Vergleich mit anderen Gruppen und innerhalb der Gruppe

Bedenkt man mitunter therapeutische und prognostische Folgen der Diagnose der Peritonealkarzinose wird die besondere klinische Bedeutung einer geeigneten Diagnostik deutlich. Die Sensitivität minimalinvasiver diagnostischer Verfahren via Parazentese und Analyse des Punktates durch die klinische Chemie und Pathologie ist bisher nicht zufriedenstellend.

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte beim Vergleich der PCA Gruppe mit den anderen Hauptgruppen nur ein signifikantes Ergebnis im Vergleich mit der Peritonitisgruppe bei der miR-137 Analyse aufgezeigt werden, weshalb wir folgend unsere Analyse weiter vertiefen. Wie in **Abb. 12 A und B** dargestellt unterteilten wir alle Patienten in nicht Maligne (PHT, Peritonitis) und Maligne (PCA, CA). Hierbei zeigte sich wiederum nur bei der Methylierung von miR-137 ein signifikanter Unterschied. Die Gruppe nicht Maligne wies eine geringere Methylierung auf ($15,80 \pm 12,82$ % vs. $22,75 \pm 16,70$ %, $p = 0,0398$). Eine weitere Unterteilung der Gruppe Maligne in CA und PCA und Vergleich von allen 3 Gruppen miteinander lieferte keine signifikanten Ergebnisse, sowohl für LINE-1 als auch für miR-137 (**Abb. 12 C und D**).

3 Ergebnisse

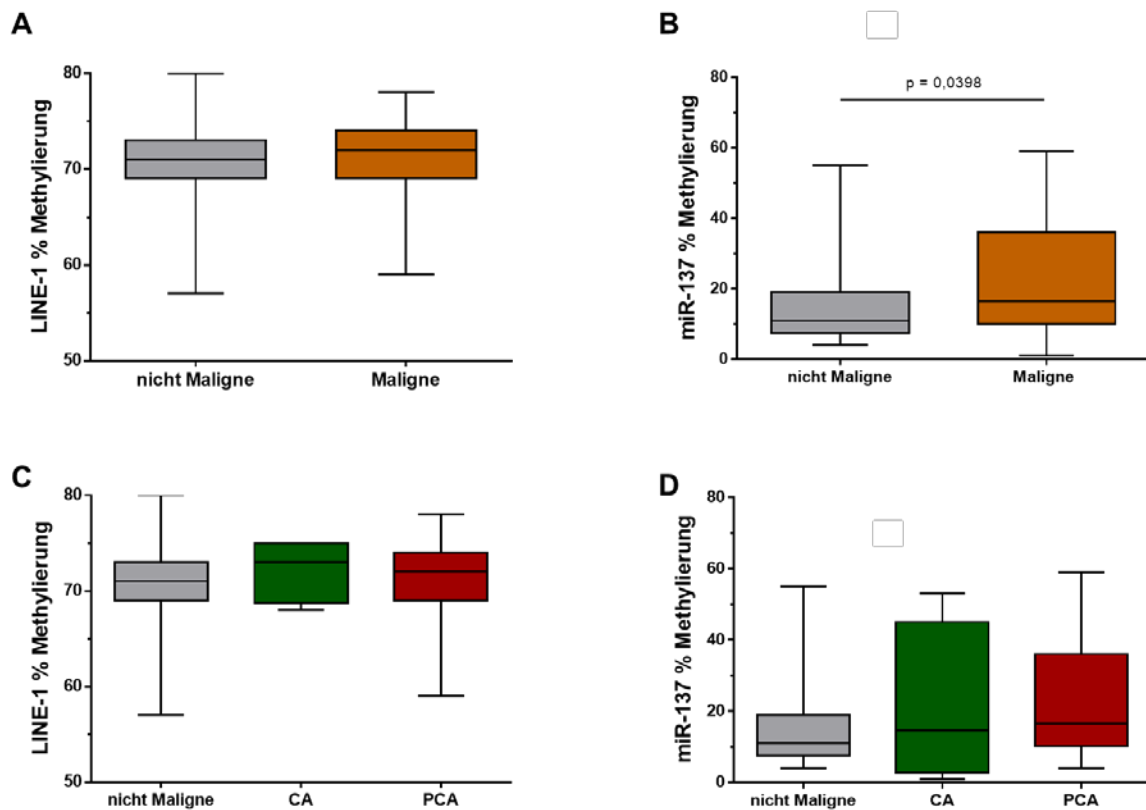


Abb. 12: Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 der Gruppen nicht Maligne und Maligne. Methylierungsstatus von LINE-1 (A) und von miR-137 (B) im Vergleich nicht Maligne vs. Maligne (nicht Maligne: 50 Proben, LINE-1: 4 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 5 Ergebnisse ausgeschlossen; Maligne: 29 Proben, LINE-1: 2 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 1 Ergebnis ausgeschlossen). Die Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Vergleich des Methylierungsstatus von LINE-1 (C) und von miR-137 (D) zwischen nicht Maligne vs. CA (4 Proben) vs. PCA (25 Proben, LINE-1: 2 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 1 Ergebnis ausgeschlossen). Es erfolgte eine Vorselektion mit dem Kruskal-Wallis-Test, anschließend die einzelne Testung mittels Mann-Whitney-Test bei adjustiertem Signifikanzniveau ($\alpha_{\text{adjustiert}}$: 0,025). Nicht Maligne (PHT, Peritonitis), Maligne (CA, PCA). Portale Hypertonie (PHT), Karzinom (CA), Peritonealkarzinose (PCA).

Da verschiedene Krebsentitäten auch ein unterschiedliches Methylierungsverhalten aufweisen können, erfolgte zur detaillierteren Analyse eine weitere Aufteilung der Gruppe PCA in GCA/AEG, Pankreaskarzinom und einem Mix aus selteneren Krebsentitäten (Tab. 8).

Sowohl die LINE-1 als auch die miR-137 Methylierungsanalyse ergab relativ ähnliche Werte. Trotz interindividueller Unterschiede konnten keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden (Abb. 13 A und B).

3 Ergebnisse

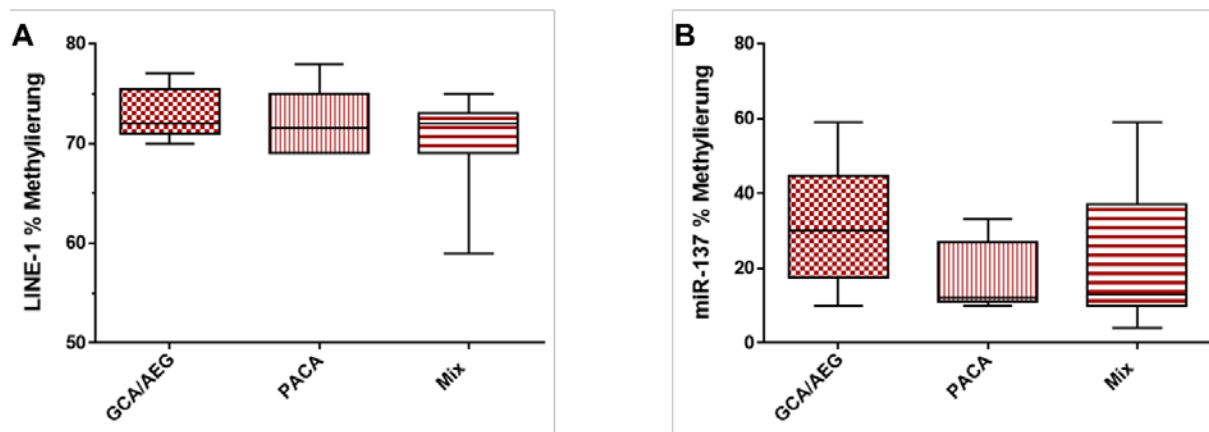


Abb. 13: Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 in verschiedenen Krebsentitäten der Gruppe Peritonealkarzinose. Vergleich des Methylierungsstatus von LINE-1 (A) und von miR-137 (B) zwischen GCA/AEG (6 Proben, LINE-1: 1 Ergebnis ausgeschlossen) vs. Pankreaskarzinom (7 Proben, LINE-1: 1 Ergebnis ausgeschlossen) vs. Mix (12 Proben, miR-137: 1 Ergebnis ausgeschlossen). Es erfolgte eine Vorselektion mit dem Kruskal-Wallis-Test, anschließend die einzelne Testung mittels Mann-Whitney-Test bei adjustiertem Signifikanzniveau ($\alpha_{\text{adjustiert}}: 0,025$). Magenkarzinom/Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs (GCA/AEG), Pankreaskarzinom (PACA), Zusammenschluss verschiedener seltener auftretender Krebsentitäten (Mix).

3.6.3 Peritonitis – Einfluss laborchemischer und klinischer Parameter

Sowohl bei der Peritonealkarzinose als auch bei einer Peritonitis sind die Zellzahl häufig erhöht, so dass eine eindeutige Zuordnung zu einem der beiden Krankheitsbilder bei nur vorliegenden laborchemischen Ergebnissen des Aszites allenfalls eine Verdachtsdiagnose zulässt. In diesem Kapitel wurden die DNA-Methylierungsveränderungen bezogen auf Vorliegen oder Abwesenheit einer Peritonitis und eventuelle Unterschiede bei Patienten mit und ohne Leberzirrhose evaluiert.

Zwischen den Proben der Gruppe Peritonitis vs. allen anderen Gruppen zusammen ließen sich keine relevanten Unterschiede bezogen auf die Methylierung von LINE-1 nachweisen, bezogen auf miR-137 konnte ein signifikanter Unterschied gemessen werden ($10,47 \pm 8,08$ % vs. $20,89 \pm 15,46$ %, $p = 0,0007$) (Abb. 14 A und B).

Für eine weitere Differenzierung erfolgte die Einteilung der Peritonitisgruppe anhand der Genese in SBP und sekundäre Peritonitis. Beim Vergleich dieser beiden untereinander waren sowohl für LINE-1 als auch für miR-137 keine signifikanten Differenzen zu messen.

Vergleicht man die SBP vs. Gruppe ohne Peritonitis ergaben sich für LINE-1 ebenfalls keine relevanten Unterschiede, für miR-137 zeigte sich ein Trend zur geringeren Methylierung der Gruppe SBP ($20,89 \pm 15,46$ % vs. $12,25 \pm 9,01$ %, $p = 0,0273$; adjustiertes Signifikanzniveau: $\leq 0,025$) (Abb. 14 C und D).

Bei der sekundären Peritonitis vs. Gruppe ohne Peritonitis zeigten sich für LINE-1 keine signifikanten Werte, für miR-137 konnten wir einen signifikanten Unterschied aufzeigen ($6,20 \pm 2,39$ % vs. $20,89 \pm 15,46$ %, $p = 0,0007$) (Abb. 14 C und D).

3 Ergebnisse

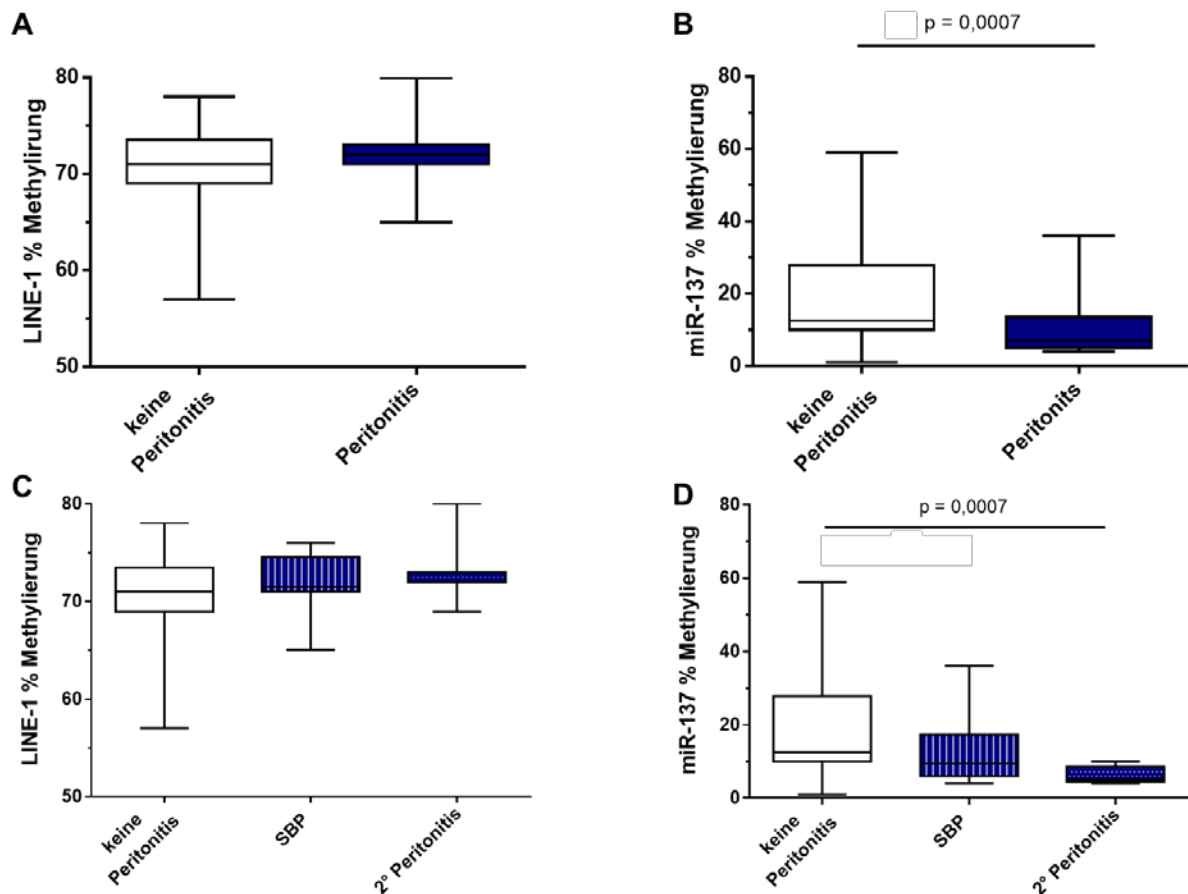


Abb. 14: Vergleich des Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 der Gruppe Peritonitis mit Proben ohne Nachweis einer Entzündung und hinsichtlich der Genese der Peritonitis. Vergleich des Methylierungsstatus von LINE-1 (A) und von miR-137 (B) zwischen keine Peritonitis (59 Proben, LINE-1: 6 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 3 Ergebnisse ausgeschlossen) vs. Peritonitis (20 Proben, miR-137: 3 Ergebnisse ausgeschlossen). Die Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Vergleich des Methylierungsstatus von LINE-1 (C) und von miR-137 (D) zwischen keine Peritonitis (59 Proben, LINE-1: 6 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 3 Ergebnisse ausgeschlossen) vs. SBP (SBP und Bakteraszites) (12 Proben) vs. sekundäre Peritonitis (8 Proben, miR-137: 3 Ergebnisse ausgeschlossen). Es erfolgte eine Vorselektion mit dem Kruskal-Wallis-Test, anschließend die einzelne Testung mittels Mann-Whitney-Test bei adjustiertem Signifikanzniveau ($\alpha_{\text{adjustiert}}$: 0,025). Spontan Bakterielle Peritonitis (SBP)

Neben der laborchemischen Diagnostik durch die klinische Chemie spielt die mikrobiologische Untersuchung eine große Rolle in der Diagnostik einer Peritonitis. In diesem Abschnitt wurde evaluiert, ob ein Unterschied im Methylierungsverhalten von LINE-1 und miR-137 bei Vorliegen oder Fehlen eines positiven Keimnachweises besteht. Es zeigten sich untereinander keine relevanten Unterschiede (Abb. 15 A und B).

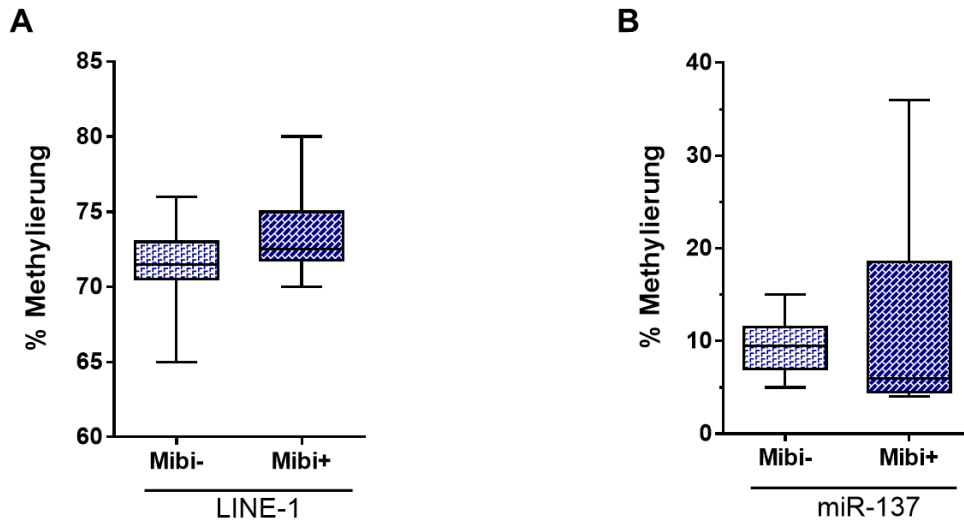


Abb. 15: Vergleich des Methylierungsstatus von (A) LINE-1 und (B) miR-137 der Gruppe Peritonitis ohne und mit positiven Bakteriennachweis (jeweils 10 Proben, miR-137: 2 Ergebnisse für Mibi- und 1 Ergebnis für Mibi+ ausgeschlossen). Die Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt.

In unserem Patientenkollektiv findet sich bei fast der Hälfte der Patienten mit einer Peritonitis eine Leberzirrhose. In einer weiteren Messung wurde evaluiert, ob die Abwesenheit oder das Vorhandensein einer Leberzirrhose bei nachgewiesener Peritonitis Einfluss auf das Methylierungsverhalten haben. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht gefunden werden (**Abb. 16 A und B**).

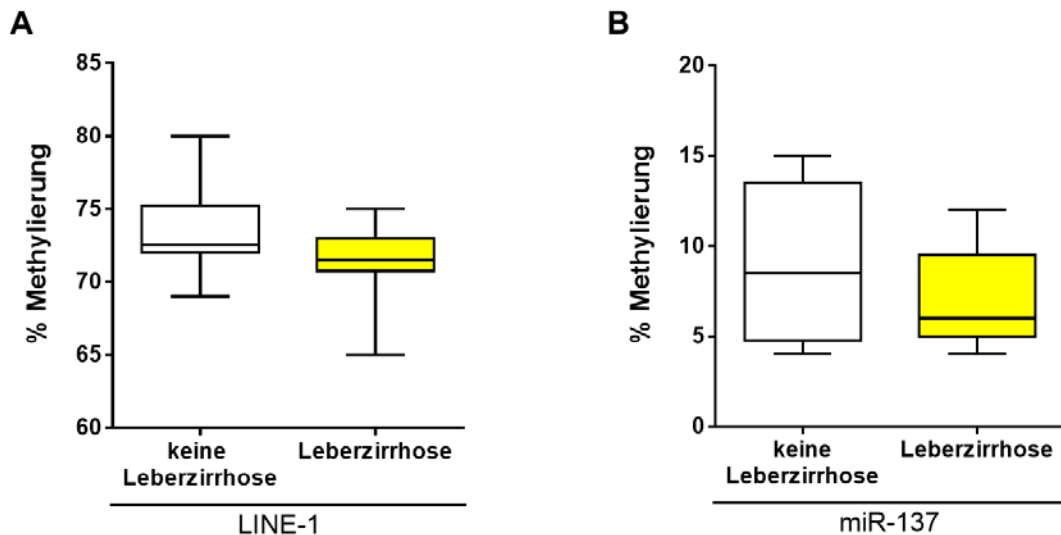


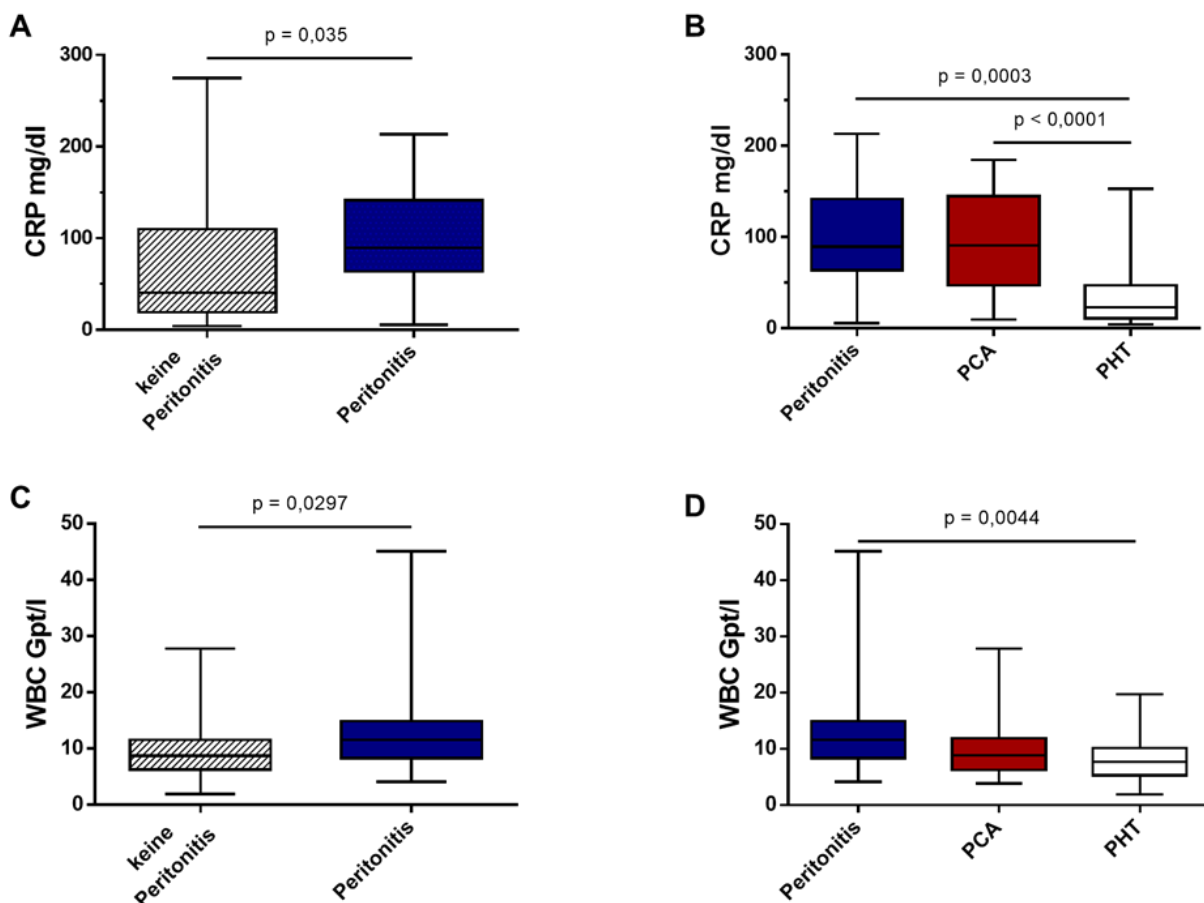
Abb. 16: Vergleich des Methylierungsstatus von LINE-1 (A) und miR-137 (B) der Gruppe Peritonitis ohne Leberzirrhose (8 Proben, miR-137: 1 Ergebnis ausgeschlossen) und **mit Leberzirrhose** (10 Proben, miR-137: 2 Ergebnisse ausgeschlossen). Die Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

Werden die CRP- und Leukozyten-Werte im Blut in den Gruppen Peritonitis, keine Peritonitis, PCA und PHT untereinander verglichen, so zeigen sich folgende signifikante Unterschiede.

Bei den CRP Werten sind zwischen Peritonitis vs. keine Peritonitis ($100,1 \pm 60,9$ mg/l vs. $66,2 \pm 60,8$ mg/l, $p = 0,0352$), Peritonitis vs. PHT ($100,1 \pm 60,9$ mg/l vs. $37,1 \pm 38,6$ mg/l, $p = 0,0003$), PCA vs. PHT ($98,1 \pm 53,8$ mg/l vs. $37,1 \pm 38,6$ mg/l, $p < 0,0001$) signifikante Differenzen aufzuzeigen. Keine signifikanten Unterschiede konnten hingegen zwischen Peritonitis vs. PCA sowohl für CRP als auch Leukozytenzahl im Blut gemessen werden (**Abb. 17 A und B**).

Signifikante Ergebnisse bezüglich Leukozyten ließen sich im Vergleich der Gruppen keine Peritonitis vs. Peritonitis ($9,5 \pm 4,9$ Gpt/l vs. $13,0 \pm 8,6$ Gpt/l, $p = 0,0297$) und Peritonitis vs. PHT ($13,0 \pm 8,6$ Gpt/l vs. $8,2 \pm 4,1$ Gpt/l, $p = 0,0044$) darstellen (**Abb. 17 C und D**). Ein Vergleich mit der Gruppe CA ist aufgrund der geringen Anzahl der Proben und teils fehlender Werte nicht weiter analysiert worden.



3 Ergebnisse

Abb. 17 (vorherige Seite): Vergleich von CRP und Leukozyten-Werte (WBC) im Blut in verschiedenen Gruppen. (A) CRP in den Gruppen keine Peritonitis (59 Proben, 8 Werte waren nicht zu eruieren) vs. Peritonitis (20 Proben, 1 Wert war nicht zu eruieren) und (C) WBC in den Gruppen keine Peritonitis (59 Proben, 2 Werte waren nicht zu eruieren) vs. Peritonitis (20 Proben). Die Analyse wurde mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt. (B) CRP Werte in den Gruppen Peritonitis (20 Proben, 1 Wert war nicht zu eruieren) vs. PCA (25 Proben, 5 Werte waren nicht zu eruieren) vs. PHT (30 Proben, 5 Werte waren nicht zu eruieren) und (D) WBC in den Gruppen Peritonitis (20 Proben) vs. PCA (25 Proben, 2 Werte waren nicht zu eruieren) vs. PHT (30 Proben). Es erfolgte eine Vorselektion mit dem Kruskal-Wallis-Test, anschließend die einzelne Testung mittels Mann-Whitney-Test bei adjustiertem Signifikanzniveau ($\alpha_{\text{adjustiert}}$: 0,025). C-reaktives Protein (CRP), Portale Hypertonie (PHT), Peritonealkarzinose (PCA).

3.6.4 Leberzirrhose – Einfluss auf den Methylierungsstatus

Leberzirrhose ist die häufigste Ursache vom Aszites und war bei 51 Patienten in unserem Kollektiv diagnostiziert. Um Einflüsse durch z. B. Entzündungszellen nicht mit abzubilden, wurden die Proben von Patienten mit und ohne Leberzirrhose ohne Hinweis auf das Vorliegen einer Entzündung hinsichtlich ihres Methylierungsverhaltens miteinander verglichen. Ein signifikantes Ergebnis konnte nicht gezeigt werden, es zeichnete sich allerdings ein Trend zur geringeren Methylierung von LINE-1 in der Gruppe der Patienten mit Leberzirrhose ab (**Abb. 18 A**). Um die DNA-Methylierungsveränderungen bezogen auf das Vorliegen einer Leberzirrhose differenzierter beurteilen zu können, wurden die Proben entsprechend des Status der Leberzirrhose anhand der Child-Pugh-Kriterien eingeteilt. Folgend wurde der Methylierungsstatus zwischen Leberzirrhose Child-Pugh B und Child-Pugh C verglichen. Eine Leberzirrhose im Stadium Child-Pugh A war bei unserem Patientenkollektiv nicht vorliegend. Sowohl für LINE-1 als auch miR-137 war für beide Gruppen ein vergleichbarer Methylierungsstatus zu detektieren (**Abb. 18 B**).

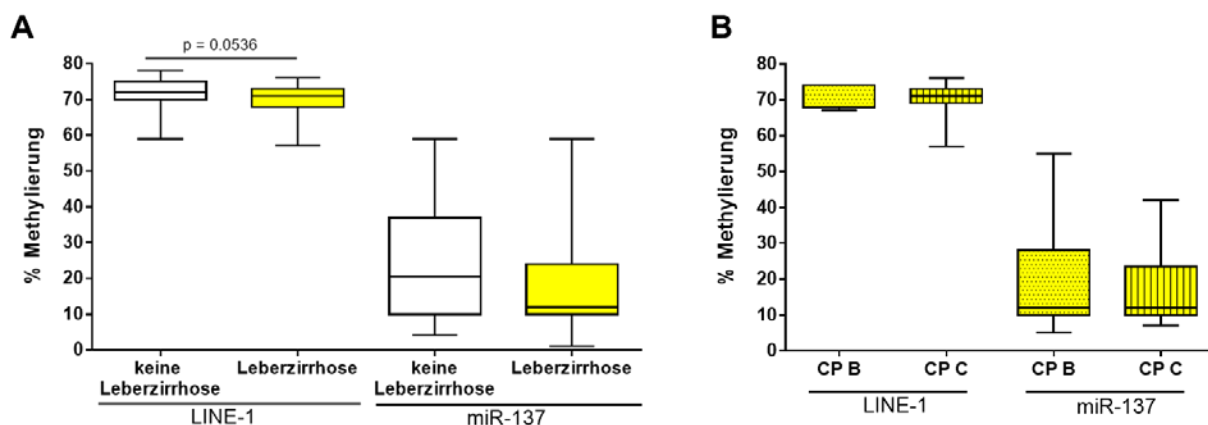


Abb. 18: Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 im Hinblick auf den Einfluss einer Leberzirrhose. Vergleich des Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 in (A) von Patienten mit Leberzirrhose (38 Proben, LINE-1: 5 Ergebnisse ausgeschlossen, miR-137: 3 Ergebnisse ausgeschlossen) vs. ohne Leberzirrhose (20 Proben, LINE-1: 1 Ergebnis ausgeschlossen) ohne Hinweis auf Peritonitis und in (B) bei Patienten mit Leberzirrhose portaler Genese ohne Hinweis für Peritonitis CP B (13 Proben, LINE-1 und miR-137: jeweils 2 Ergebnisse ausgeschlossen) vs. CP C (17 Proben, LINE-1: 2 Ergebnisse ausgeschlossen). Die Analyse wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Child-Pugh B (CP B), Child-Pugh C (CP C).

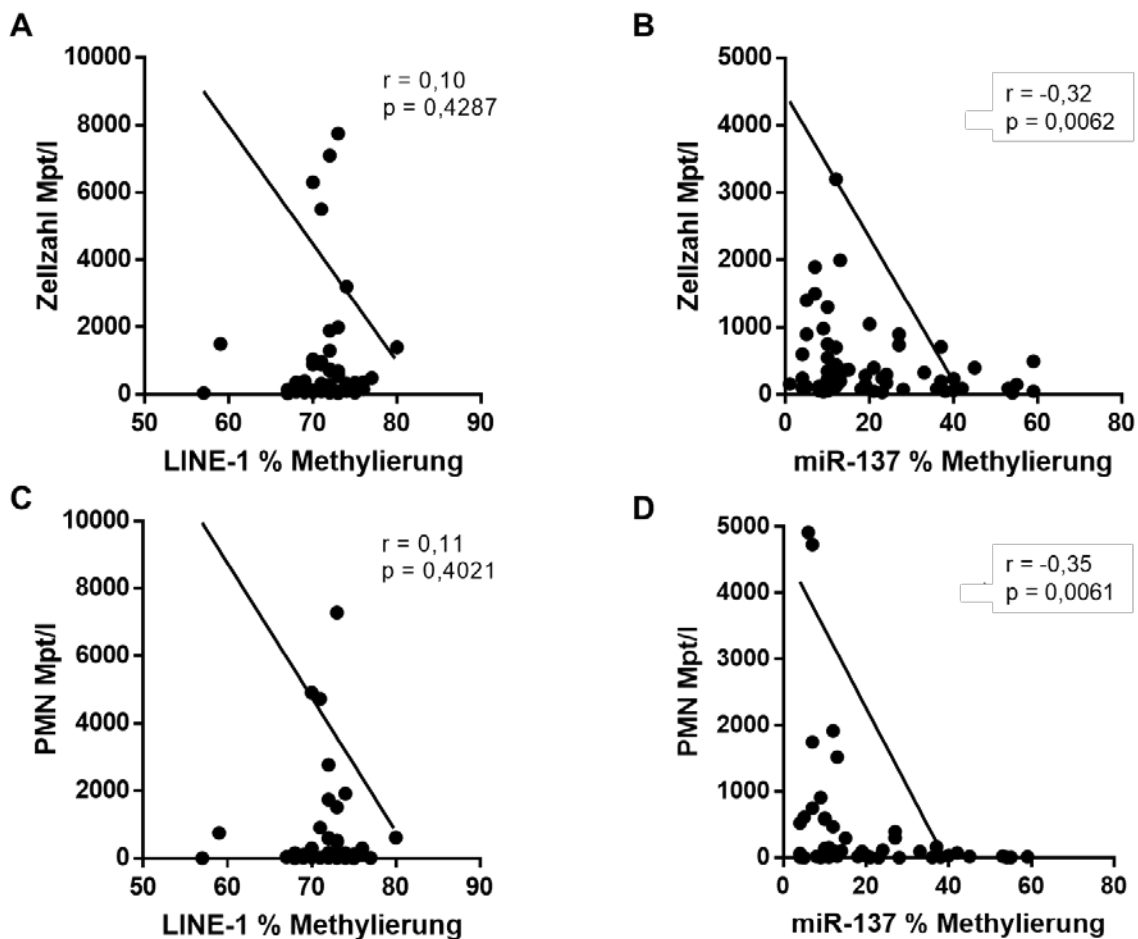
3.6.5 Korrelationsanalysen

In diesem Abschnitt wurde evaluiert, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsverhalten und verschiedenen laborchemischen Parametern gibt.

Betrachtet wurde eingehend das gesamte Patientenkollektiv hinsichtlich einer Korrelation des Methylierungsstatus mit der Zellzahl und PMN im Aszites, d. h. steigt oder fällt der Methylierungsgrad mit steigender oder fallender Zellzahl und PMN. Hierfür wurden jeweils für dieselbe Probe Zellzahl, PMN und Methylierung ermittelt und, wie in **Abb. 19** dargestellt, in Beziehung zueinander gesetzt.

In der Methylierungsanalyse von LINE-1 in Korrelation zur Zellzahl im Aszites und dem Anteil der PMN konnten keine signifikanten Korrelationen ermittelt werden (**Abb. 19 A und C**).

Anders verhält es sich bei dem Methylierungsstatus von miR-137 in Korrelation zur Zellzahl und den PMN im Aszites. In beiden Fällen konnte eine schwache negative Korrelation ($r = -0,32$, $p = 0,0062$) gezeigt werden, d. h. je höher die Zellzahl bzw. Zahl der PMN, desto geringer ist der Grad der Methylierung (**Abb. 19 B und D**).



3 Ergebnisse

Abb. 19 (vorherige Seite): Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 in Korrelation zu Zellzahl und PMN (79 Proben). Korrelation von LINE-1 (A) und miR-137 (B) mit der Zellzahl (LINE-1 und miR-137: jeweils 6 Ergebnisse ausgeschlossen, bei der Bestimmung der Zellzahl waren jeweils 3 Ergebnisse nicht zu eruieren; insgesamt 9 Datenpaare wurden ausgeschlossen). Korrelation von LINE-1 (C) und miR-137 (D) mit PMN (LINE-1 und miR-137: 6 Ergebnisse ausgeschlossen, bei der Bestimmung der PMN waren jeweils 14 Ergebnisse nicht zu eruieren, insgesamt wurden für LINE-1 20 und für miR-137 19 Datenpaare ausgeschlossen). In (A) + (B) + (C) wurden 5 Datenpaare, in (D) wurden 3 Datenpaare nicht abgebildet. Die Analyse wurde mit dem Spearman-Test durchgeführt. Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN).

Häufig werden auch bei einem malignen Aszites bei nachgewiesener Peritonealkarzinose laborchemisch eine erhöhte Zellzahl sowie ein erhöhter Anteil an PMN im Aszites gemessen. Für diese Gruppe wurde ebenfalls die Korrelation der Methylierung zu Zellzahl und PMN untersucht. Ein signifikanter Zusammenhang kam nicht zur Darstellung (**Abb. 20**).

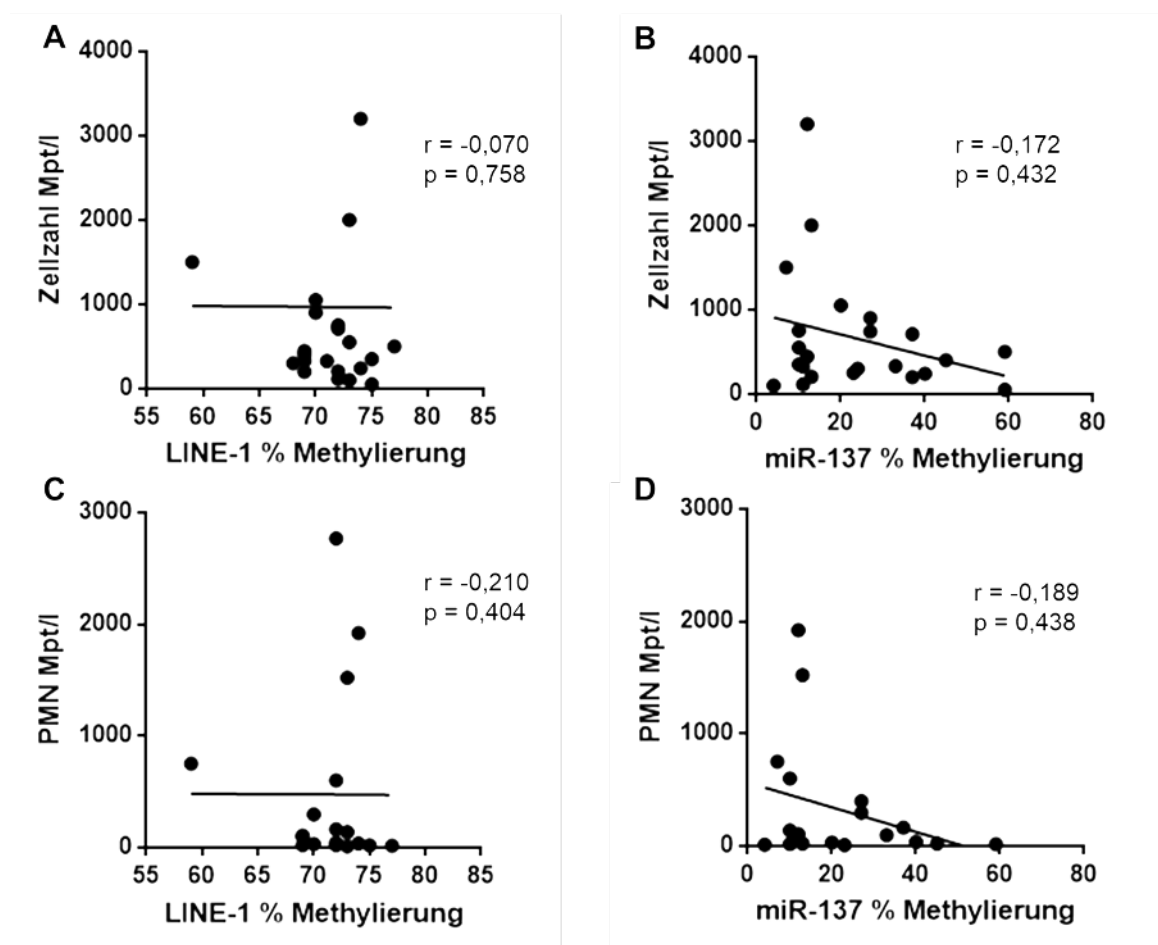


Abb. 20: Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 in Korrelation zu Zellzahl und PMN bei Patienten mit nachgewiesener PCA (25 Proben). Korrelation von LINE-1 (A) (3 Datenpaare ausgeschlossen) und miR-137 (B) (2 Datenpaare ausgeschlossen) mit der Zellzahl (1 Ergebnis nicht eruierbar). Korrelation von LINE-1(C) (7 Datenpaare ausgeschlossen) und miR-137 (D) (6 Datenpaare ausgeschlossen) mit PMN (5 Ergebnisse nicht eruierbar). In (A) wurde 1 Datenpaar nicht mit abgebildet. Die Analyse wurde mit dem Spearman-Test durchgeführt. Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN), Peritonealkarzinose (PCA).

3 Ergebnisse

Zur weiteren Differenzierung unseres Kollektivs wurde die gleiche Analyse für die Gruppe Peritonitis durchgeführt. Signifikante Unterschiede konnten nicht gefunden werden (**Abb. 21 A-D**).

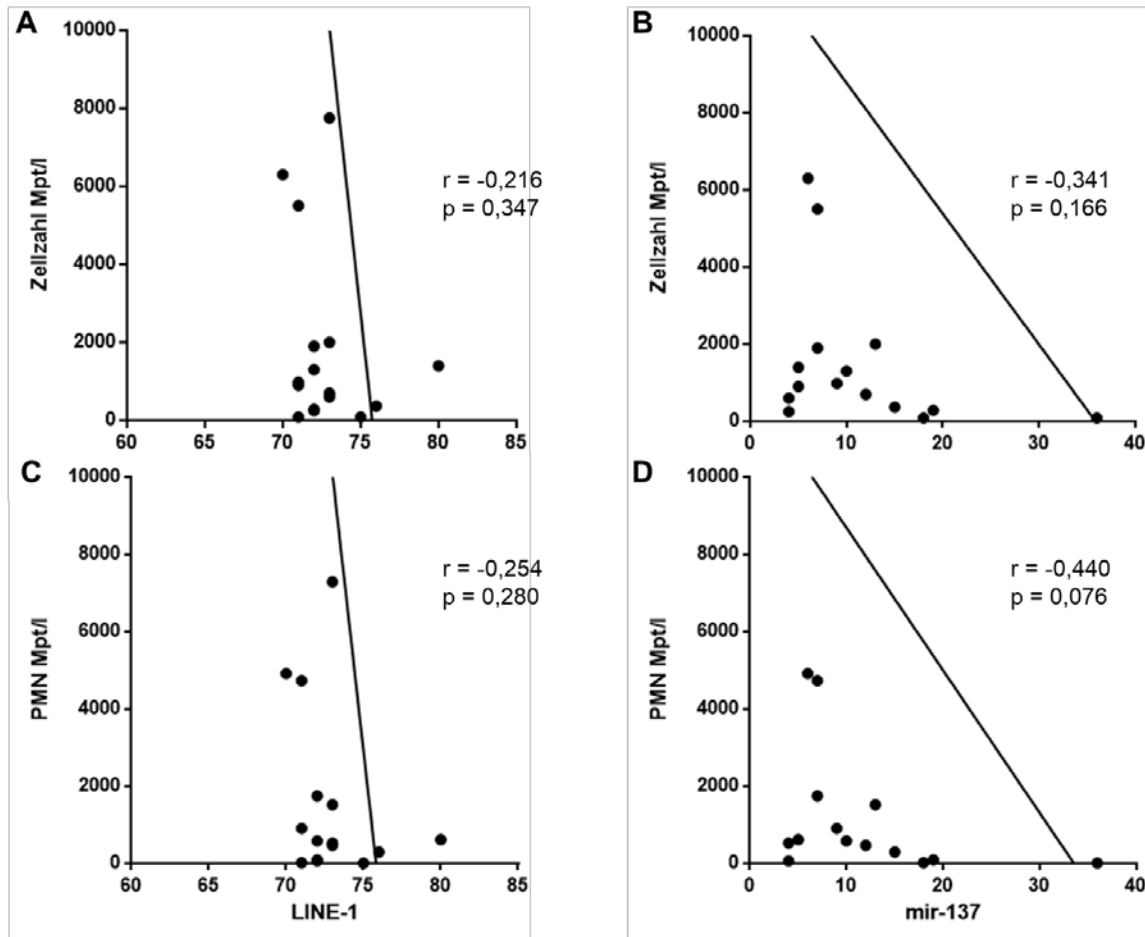


Abb. 21: Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 in Korrelation zu Zellzahl und PMN bei Patienten mit nachgewiesener Peritonitis (21 Proben). Korrelation von LINE-1 (A) und miR-137 (B) (3 Datenpaare ausgeschlossen) mit der Zellzahl. Korrelation von LINE-1 (C) (1 Datenpaar ausgeschlossen) und miR-137 (D) (4 Datenpaare ausgeschlossen) mit PMN (1 Ergebnis war nicht zu eruieren). In (A) + (C) wurden 5 Datenpaare, in (B) + (D) 3 Datenpaare nicht mit abgebildet. Die Analyse wurde mit dem Spearman-Test durchgeführt. Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN).

Es wurden weitere Parameter untersucht, die aktuell ebenfalls zur Differenzierung der Genese des Aszites hilfreich sein können. Der Methylierungsstatus von LINE-1 und miR-137 wurde in Zusammenhang zum CRP im Blut (LINE-1: $r = 0,11$, $p = 0,39$; miR-137: $r = -0,18$, $p = 0,16$), Protein (LINE-1: $r = -0,02$, $p = 0,88$; miR-137: $r = -0,10$, $p = 0,40$) und Albumin (LINE-1: $r = -0,21$, $p = 0,26$; miR-137: $r = 0,00$, $p = 0,98$) im Aszites untersucht. Hier konnte jeweils keine signifikante Korrelation evaluiert werden.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser *proof of principle* Studie untersuchten wir, wie weit eine DNA-Isolierung aus Aszitesproben, eine Analyse der DNA-Methylierung mit kommerziell erhältlichen Kits sowie reproduzierbare Ergebnisse möglich sind. Weitere Ziele waren eine gewisse Stabilität in Bezug auf die Zeit bis zur Probenanalyse sowie die Unabhängigkeit der Ergebnisse vom Probenvolumen nachzuweisen. Zudem evaluierten wir das Potential der Methylierung von LINE-1 und miR-137 hinsichtlich der Nutzung als Biomarker. Bei den Methylierungsanalysen von LINE-1 und miR-137 kamen bei einigen Gruppen bzw. Subgruppen signifikante Ergebnisse zur Darstellung, wobei besonderes Interesse auf der PCA und Peritonitis lag. Zwar lässt unsere Studie als eine der ersten dieser Art keine eindeutigen Schlussfolgerungen hinsichtlich einer verbesserten Diagnostik zu, deutet aber auf das Potential von Methylierungsanalysen im Aszites als Biomarker hin. Gegebenenfalls könnten weitere Studien mit entsprechenden Modifikationen und Erweiterungen die Möglichkeit einer besseren Differenzierung hinsichtlich der Genese des Aszites aufzeigen.

4.1 Präanalytische Test

Ein potentieller Biomarker sollte bestimmte Charakteristika aufweisen um als solcher evaluiert zu werden. In unserer präanalytischen Testung zeigte die DNA-Methylierung von LINE-1 und miR-137 entsprechende Eigenschaften. Wir verwendeten erfolgreich kommerziell erhältliche Kits zur DNA- und RNA-Isolierung, die in unserem Labor für andere Analysen etabliert sind bzw. genutzt werden, wobei mit dem RNeasy Plus Universal Mini Kit eine höhere DNA-Konzentration im Vergleich zu anderen Kits gewonnen werden konnte, so dass dieses für die Analysen genutzt wurde.

Eine weitere Frage, die es zu überprüfen gab, bezieht sich auf die Aliquotierungsvolumina, die ein stabiles, reproduzierbares Ergebnis liefern. Wir haben die Ergebnisse der Methylierungsanalysen aus 1 ml mit 8 ml Aszites verglichen und keinen signifikanten Unterschied detektieren können.

Ein anderer präanalytischer Schritt bezog sich auf die Stabilität der gewonnenen DNA. Nach aktueller Studienlage ist dies an DNA im Aszites bisher in der Literatur nicht beschrieben. Im Gegensatz dazu wurde die Frage zur Stabilität von miRNA bereits in unserer Gruppe durch Schindler et al. untersucht [116]. Schindler konnte hier eine Stabilität der miRNA über 48 Stunden bei Raumtemperatur und beim Vergleich der Lagerung bei -20 °C vs. -80 °C darstellen. Wir konnten in unserem Patientenkollektiv eine 72-stündige Stabilität der Proben der Gruppe PHT unter Inkubation bei Raumtemperatur nachweisen und zudem reproduzierbare Ergebnisse aufzeigen.

Dieser Teil der Arbeit dient als Grundlage für die weiteren Abschnitte. Wegen der geringen Probenanzahl in teilweise ausgewählten Untergruppen, können hier nur orientierende *proof of*

principle Analysen angestrebt werden. Jedoch ergeben sich bereits jetzt Hinweise für die in unseren Experimenten verwendeten Proben auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit kommerziell erhältlichen und gut zu handhabenden Kits, gleichbleibende Qualität der Ergebnisse bei unterschiedlichen Alliquotierungsvolumina sowie eine Stabilität über 72 Stunden. Dies sind gute Grundlagen für die Evaluation eines potentiellen Biomarkers.

4.2 DNA-Methylierung im Aszites als diagnostischer Biomarker

Methylierungsanalysen können sowohl in Geweben als auch als sog. *Liquid biopsies* mit zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA), aber auch in Zellpellets erfolgreich durchgeführt werden, wobei die Analyse von Körperflüssigkeiten in den vergangenen Jahren aufgrund der relativ einfachen Zugänglichkeit besonderes Interesse geweckt hat.

Bereits 1948 fanden *Liquid biopsies* Eingang in die Fachliteratur [117]. Gut untersuchte Methylierungsanalysen in Körperflüssigkeiten liegen für SHOX2 und SEPT9 vor. Hier haben unterschiedlichste Studien einen diagnostischen sowie prognostischen Wert für SHOX2 bei z. B. Bronchialaspiraten und Plasmaanalysen in Bronchialkarzinomen evaluiert [118-122]. Die Bestimmung der Methylierung von SEPT9 aus dem Blutplasma wurde außerdem 2016 von der U. S. Food and Drug Administration (FDA) zum Screening für Kolonkarzinome zugelassen [123]. In unserer Studie wurde das Augenmerk insbesondere auf maligne Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes gelegt.

Neben den bereits erwähnten Körperflüssigkeiten zählen Urin, Pleuraerguss, Peritoneallavage und auch Aszites zu den vielversprechenden diagnostischen Tools. So wurden beispielsweise Methylierungsanalysen an Peritoneallavagen von Patienten mit Magenkarzinom in unterschiedlichen TNM Stadien durchgeführt und ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Methylierungsverhaltens an unterschiedlichen Genen detektiert [94]. Trotz des nicht zu vernachlässigenden Auftretens, insbesondere in den gastroentero- und onkologischen Fachbereichen, gibt es nur wenig veröffentlichte Studien zur Methylierungsanalyse im Aszites. In 2016 wurde eine Studie über den diagnostischen und prognostischen Wert der DNA-Methylierung von den oben erwähnten Genen SHOX2 und SEPT9 und der Zytologie in benignem, paramalignem und malignem Aszites veröffentlicht. Eine Hypermethylierung von SEPT9 korrelierte hierbei signifikant mit dem Nachweis maligner Zellen [113].

In unserer Arbeit untersuchten wir das Methylierungsverhalten von LINE-1 und miR-137 im Aszites, speziell aus 1 ml oder 8 ml gewonnenen Zellpellets. Diese Gene sind in aktuell veröffentlichten Studien bisher nicht im Aszites untersucht, jedoch vielfach im Gewebe und anderen Körperflüssigkeiten. In einer bereits 2009 erschienenen Studie zeigte sich u. a., dass es nur teilweise zu einer übereinstimmenden Methylierung zwischen Tumorgewebe und Peritoneallavage kommt, wofür die Tumoheterogenität und entsprechende Unterschiede auch bei Metastasen sowie der Gehalt an verwertbarem Material verantwortlich sein könnten

4 Diskussion

[124]. Bei Studienteilnehmern, deren Peritoneallavage eine abweichende Methylierung aufzeigte, d. h. Hypermethylierung im Bereich der Promoterregion der untersuchten Zielgene, war ein verringertes regressionsfreies Überleben zu verzeichnen, wobei der Progress nicht unbedingt peritoneal zu detektieren war.

Eine andere Arbeit von Hiraki et. al. beschreibt eine abweichende DNA-Methylierung in einer Peritoneallavage als Risikofaktor für ein Rezidiv eines Magenkarzinoms anhand der unterschiedlichen Infiltrationstiefe des Primärtumors [94]. Zudem wurde ebenfalls die Konkordanz zwischen der DNA-Methylierung unterschiedlicher Gene in der Peritoneallavage und dem entsprechendem Tumorgewebe untersucht. Interessant hierbei ist, dass ein Zellpellet der gewonnenen Peritoneallavage zur Genanalyse verwendet wurde. Sowohl für *Checkpoint With Forkhead And Ring Finger Domains* (CHFR), E-cadherin als auch *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3) konnte eine signifikante Korrelation zwischen Tumorstadium und Methylierungsstatus gezeigt werden.

Auch wenn wahrscheinlich keine 100 %ige Übereinstimmung zwischen Gewebe, *liquid biopsies* bzw. Pellet einer *liquid biopsy* in allen Genen vorliegt, so scheint eine gewisse Konkordanz zum Tumorgewebe vorhanden zu sein. In einer Studie von Murata et al. zeigte sich eine Hypomethylierung von LINE-1 sowohl im Kolonkarzinom als Primärtumor als auch in den hepatischen Metastasen [125]. Aufgrund des Mangels an wissenschaftlichen Studien hinsichtlich der Methylierung von LINE-1 und miR-137 im Aszites mussten wir uns an dem vorhandenen Wissensstand orientieren.

Bereits in den 90er Jahren erschienen Studien, die abweichende Expression von LINE-1 regulierten Proteinen in Tumorzellen darstellten. Ebenso zeigte sich eine hohe gewebespezifische Variabilität im Methylierungsstatus [85, 86]. Oft untersucht in diesem Zusammenhang sind gastrointestinale Karzinome. Beispielsweise war eine geringere Methylierung bei Tumorgewebe von Magenkarzinomen und Kolonkarzinomen im Vergleich zu deren benachbarten nicht malignem Gewebe zu detektieren [88]. Interessant ist nun die Frage, wie es sich im Aszites mit dessen Vielfalt an Zellen und Zusammensetzung verhält.

Da bei Patienten mit PCA und Peritonitis im Vergleich zur PHT u. a. vermehrt Lymphozyten im Aszites vorhanden sind, haben wir dahingehend ebenfalls unsere Recherche vertieft. Im Vergleich zur Methylierung im Gewebe finden sich kontroverse Studien bezüglich der LINE-1 Methylierung in Leukozyten im Blut bei Patienten mit und ohne Karzinom. Eine große Metaanalyse zeigte eine Hypomethylierung von LINE-1 in malignem Gewebe, nicht jedoch im Blut bei Patienten mit Malignomen [126]. Eine andere Studie zeigte ein ähnliches Ergebnis, dass es keinen Unterschied im Vergleich von Schwestern gab, von denen eine an Brustkrebs erkrankt war [127]. In einer anderen Veröffentlichung von Di et al. wurde für Patienten mit einer Hypomethylierung ein erhöhtes Risiko beschrieben an einem HCC zu erkranken [128]. Im Gegensatz dazu ergab die Studie von Wu et al. diesbezüglich keinen Unterschied [129].

4 Diskussion

In unserem Patientenkollektiv gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Gruppe PHT mit PCA. Ursächlich könnten verschiedene Punkte sein. Zum einen liegt eine eher geringe Anzahl an Patienten mit PCA vor, mit zudem teilweise unterschiedlichem Primarius und somit eventuell verschiedenem gewebespezifischen Methylierungsmuster, wodurch sich eine höhere Variabilität der Ergebnisse ergibt. Zum anderen ist die PCA an Hand des Nachweises von malignen Zellen im Punktat oder Biopstat des Peritoneums diagnostiziert wurden, so dass auch in anderen Gruppen Patienten mit PCA aufgrund falsch negativer Ergebnisse vorhanden sein können. Weiterhin ist es denkbar, dass aufgrund vieler Lymphozyten und somit vermehrt vorhandener Lymphozyten-DNA der Nachweis von Tumorzell-DNA und deren spezifischer DNA-Methylierung gestört wird.

Eine Studie von Zhu et al. untersuchte die LINE-1 Methylierung von Leukozyten im Blut und zeigte einen Wert von $76,2 \pm 6,2$ [130]. Dieser ist signifikant höher als der Wert in unserer Gruppe der PHT. Möglich ist, dass Tumorzellen eine geringere Methylierung aufweisen, diese aber durch den höheren Methylierungsstatus in den vermehrt vorhandenen Lymphozyten verfälscht wird. Hierdurch wird erneut die Bedeutung des Ziels unserer Studie, spezifische DNA-Methylierungsmuster oder -stellen zu finden, die sich besser zur Detektion einer PCA eignen, unterstrichen.

Wie bereits vorbeschrieben, haben wir ebenfalls untersucht, ob sich zwischen den verschiedenen Krebsentitäten, die in unserem Patientenkollektiv zu einer PCA geführt haben, Unterschiede in der Methylierung aufzeigen lassen. Ein signifikantes Ergebnis bezogen auf LINE-1 kam hier nicht zur Darstellung. Direkt vergleichbare Studien fehlen aber auch hier. Was jedoch beschrieben wurde ist, dass die LINE-1 Methylierung in verschiedenen Geweben unterschiedlich und mit jeweils unterschiedlicher Spannbreite vorkommt. So finden sich in Gewebe wie Leber, Nieren, Brust, Lunge und Magen eher geringe Variationen, wohingegen z. B. Schilddrüse und Ösophagus eine breitere Variabilität aufzeigen [86]. Inwieweit die Analyse einer größeren als der unseren Kohorte zur Identifikation von statistisch signifikanten Veränderungen führen wird, bleibt noch offen.

Interessant ist weiterhin, dass der Methylierungsgrad von LINE-1 in der Gruppe der PHT im Vergleich zur Gruppe der Peritonitis einen Trend zur geringen Methylierung aufwies. Eine Ursache dafür könnte die deutlich vermehrte Anzahl an Zellen, insbesondere Entzündungszellen wie Lymphozyten oder Makrophagen sein, die bei einer Peritonitis gemessen wurden und somit auch mehr DNA zur Analyse zur Verfügung stand. Dahingegen sind die Punktate der Gruppe der PHT deutlich zellärmer. Wie bereits weiter oben beschrieben ist die Methylierung von LINE-1 in Leukozyten im Blut höher als vom Aszites der Gruppe der PHT. Bei einer detaillierteren Analyse der LINE-1 Methylierung der Gruppe der Peritonitis

4 Diskussion

konnten keine weiteren Unterschiede aufgezeigt werden. So kamen beim Vergleich von Peritonitis vs. keine Peritonitis, keine Peritonitis vs. SBP vs. sekundäre Peritonitis, positiver vs. negativer Mikrobiologie und Patienten die eine Peritonitis hatten mit vs. ohne Leberzirrhose keine signifikanten Werte zur Darstellung.

Bekannt ist, dass sich bei einer Infektion zusätzlich Entzündungszellen mitunter im Gebiet der Infektion aufhalten und somit Material liefern, was analysiert wird. Zum einen könnte es durch die Infektion selbst zu einer Veränderung der DNA-Methylierung in den Entzündungszellen kommen, zum anderen sind diese oft vermehrt bei den im Vergleich zur Gruppe PHT zellreicheren Punktaten einer Peritonitis und PCA vorzufinden. Die daraus resultierend gehäuft anzutreffende DNA sowie vermehrt vorliegende Zellen könnten auch das nicht signifikante Ergebnis der LINE-1 Methylierung von Peritonitis vs. PCA erklären.

Eine weitere, eher nachrangige, Überlegung ist, dass die Veränderung in der DNA-Methylierung zu einer Infektion führen könnte. Eine ähnliche Überlegung ist in einer 2019 veröffentlichten Arbeit erwähnt. In dieser wurde die DNA-Methylierung von Monozyten im Blut bei Patienten mit und ohne Sepsis miteinander verglichen und eine abweichende Methylierung festgestellt [131]. In einer Studie von Chalitchagorn et al. wurde gezeigt, dass Leukozyten gesunder Individuen per se keine Hypomethylierung aufwiesen [86]. Leukozyten im Blut von Patienten mit einer Osteoarthritis im Knie zeigten im Vergleich zu gesunden Individuen eine Hypomethylierung von LINE-1 [132]. In einer weiteren Studie von Maugeri et al. wurde an menschlichen Retinazellen eine Entzündungsreaktion provoziert und die Methylierung von LINE-1 im Vergleich zu gesunden Retinazellen verglichen [133]. In der Entzündungsreaktion zeigte sich eine Hypomethylierung. Nach Behandlung mit einem Polyphenol zeigte sich eine Wiederherstellung des ursprünglichen Methylierungsgrades. Eine andere Arbeit von Baptista et al., bei der das Methylierungsverhalten von Mundspüllösungen von gesunden Probanden und Patienten mit aggressiver Parodontitis verglichen wurden, zeigte eine leicht geringere Methylierung in dem Probenmaterial der Parodontitisgruppe, jedoch am ehesten einer normalen Variabilität geschuldet [134]. Eine weitere Studie, bei der Zahnfleischproben gesunder Individuen mit denen mit einer chronischen Parodontitis verglichen wurden, zeigten keinen Unterschied im Methylierungsstatus von LINE-1 [135].

Etwas anders verhielt es sich bei der Methylierungsanalyse von miR-137. Hier konnte ein signifikanter Unterschied im Methylierungsverhalten zwischen der Gruppe Peritonitis vs. keine Peritonitis, keine Peritonitis vs. sekundäre Peritonitis und ein Trend zwischen der Gruppe SBP vs. keine Peritonitis nachgewiesen werden, wobei die Gruppen mit Infektion bzw. Entzündung einen geringeren Methylierungsgrad aufwiesen. Vergleichbare Daten sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht zu eruieren. In 2 Studien wird von einem Zusammenhang zwischen miR-137

4 Diskussion

Methylierung bzw. Expression und dem Progress einer Osteoarthritis in Chondrozyten berichtet. Hier wirkten sich eine Hypomethylierung bzw. Überexpression positiv auf den Progress der Osteoarthrose aus [136, 137]. Es ist durchaus zu vermuten, dass bei einer Entzündung ein abweichendes Methylierungsverhalten vorliegt und einige Targets von miR-137 direkt oder indirekt Einfluss auf Entstehung, Verlauf und Prognose einer Entzündung haben könnten. Häufig ist bei einer Peritonitis, wie auch bei malignen Erkrankungen, eine erhöhte Zellzahl sowie abweichende Zusammensetzung der Zellen im Vergleich zum portalen Aszites zu finden.

Im Vergleich unserer definierten Gruppen zeigten sich ebenfalls signifikante Ergebnisse bei der Gruppe PHT vs. Peritonitis sowie der Gruppe Peritonitis vs. PCA, wobei die miR-137 Methylierung der Gruppe PCA am höchsten, die der Gruppe Peritonitis am geringsten war. Es zeigte sich zudem ein Trend zur Hypermethylierung von miR-137 bei malignen Erkrankungen (CA, PCA) bezogen zu unserem Vergleichskollektiv der PHT. In einer weiteren Analyse konnten wir außerdem einen signifikanten Unterschied zwischen Aszitesproben mit und ohne Malignom aufzeigen, wobei die Proben mit Malignom eine Hypermethylierung aufwiesen. Das deckt sich zumindest mit den Ergebnissen der gängigen Literatur, dass eine Hypermethylierung von miR-137 zur Karzinogenese beitragen kann, da es als Tumorsuppressorgen fungiert. So wurde in einer von Chen et al. veröffentlichten Studie eine Herunterregulation durch Hypermethylierung bei Magenkarzinomgewebe im Vergleich zur normalen Magenmukosa beschrieben [138]. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei anderen Krebsentitäten, u. a. bei weiteren Karzinomen des Gastrointestinaltraktes aber auch aus anderen Bereichen wie z. B. beim Endometriumkarzinom [139]. In einer Studie von Kushlinski et al. wurde die Methylierung verschiedener miRNA Gene, u. a. von miR-137 von Primärgewebe, normalem Gewebe und peritonealen Metastasen miteinander verglichen, wobei eine Zunahme der Methylierung vom normalen Gewebe zum Primärtumor und weiter zu peritonealen Metastasen detektiert wurde [140]. Obwohl die vorliegenden Studien keinen direkten Vergleich mit unseren Ergebnissen zulassen, da es sich in der publizierten Literatur vor allem um Gewebe und Zelllinien und nicht um Körperflüssigkeiten, insbesondere Aszites handelt, ist anzunehmen, dass auch Veränderungen bei der Methylierung von miR-137 im Aszites zu detektieren sind, da sich hier neben Entzündungszellen auch höchstwahrscheinlich abgeschilferte Zellen peritonealer Absiedlungen finden und so ihre DNA zur Messung beisteuern. Unseres Wissens nach sind keine Studienergebnisse bezogen auf miR-137 Methylierung in Leukozyten oder anderen Entzündungszellen vorhanden, so dass unsere Methylierungsergebnisse dahingehend nicht zielführend diskutiert werden können.

Im Vergleich der verschiedenen Krebsentitäten ist kein signifikanter Unterschied zu sehen. Hier könnte eine höhere Probenanzahl und damit auch die Möglichkeit zur weiteren Subgruppierung eine bessere Aussage möglich machen. Prinzipiell ist auch hier davon

auszugehen, dass die Tatsache, dass alle Zellen und nicht z.B. separat Tumorzellen oder Entzündungszellen betrachtet wurden mit zu den präsentierten Ergebnissen beitragen.

4.3 Korrelation und Rolle laborchemischer Parameter

Bereits in der Einleitung wurde auf die Diagnostik und Differentialdiagnostik des Aszites ausführlich eingegangen. Kurz zusammengefasst sind Zellzahl und Anzahl der neutrophilen Granulozyten über 250 Zellen/ μ l Aszites der Goldstandard zur Definition einer SBP. Problematisch ist jedoch, dass bei einer Peritonealkarzinose ebenfalls erhöhte Zellzahlen auftreten können oder auch ein Mischbild vorliegen kann. Auch andere laborchemische Parameter wie beispielsweise Protein und Albumin können Hinweise zum Ursprung des Aszites geben. Interessant ist es, inwieweit ein Zusammenhang zwischen diagnostischen Laborparametern und der Methylierung der beiden von uns untersuchten Genabschnitte gibt.

Bei miR-137, nicht aber bei LINE-1, ist eine negative Korrelation in Bezug auf die Zellzahl und PMN im gesamten Kollektiv zu detektieren. Zumindest für miR-137 ist es mit der vorherigen Analyse, dass bei Patienten mit Peritonitis eine geringere Methylierung vorherrscht als bei der Gruppe der PHT, kongruent. Das bedeutet, dass bei einer Peritonitis die meisten Zellen/PMN und laut unserer Analyse die geringste Methylierung vorzufinden sind.

Bezogen auf die Gruppe der Peritonitis und die Gruppe der Peritonealkarzinose, denen in dieser Arbeit besonderes Interesse zukommt, zeigte sich bei miR-137 ein Trend zur negativen Korrelation bezogen auf die PMN nur in der Gruppe der Peritonitis. Bei der Peritonealkarzinose hat sich bei der Methylierung sowohl für LINE-1 als auch für miR-137 keine signifikante Korrelation mit der Zellzahl und den PMN aufzeigen lassen. Ebenso konnten wir keinen Zusammenhang zwischen Methylierung und weiteren Laborparameter wie CRP und Leukozyten im Blut, Albumin und Protein im Aszites sehen. Denkbar ist zum einen, dass es tatsächlich keine Korrelation mit bestimmten Parametern gibt. Zum anderen könnte eine Differenzierung der Zellen und Erhöhung der Probenanzahl eindeutigere Ergebnisse hervorbringen. Vergleiche mit anderen Arbeiten sind bei aktuell ausbaufähiger Datenlage nicht möglich.

Es liegen unseres Wissens nach keine Studien zu ähnlich aufgebauten Korrelationsanalysen vor. Das Thema Entzündungswerte und Methylierung in Körperflüssigkeiten fand allerdings mit anderen Schwerpunkten Eingang in die Forschung. In einer Studie von Baccarelli et al. fand sich keine Assoziation von LINE-1 Methylierung im Blut mit CRP bei selbstständigen älteren Patienten [141]. Eine Arbeit von Zhang et al. zeigte ebenfalls keine Korrelation zwischen LINE-1 Methylierung in Leukozyten im Blut mit CRP oder Anzahl von Leukozyten in einer Kohorte ohne Malignome [142]. Damit verglichen sind die Ergebnisse unserer Studie, bezogen auf die eben erwähnten Parameter, gut nachvollziehbar.

4 Diskussion

Was sich in unserer Studie gezeigt hat, auch wenn nicht primär Fokus dieser Arbeit, ist ein höherer Serum CRP- und Leukozyten-Wert in der Gruppe Peritonitis im Vergleich zur Gruppe keine Peritonitis und im Vergleich zur Gruppe PHT. Bezogen auf die Peritonitis und erhöhten CRP-Werte zeigen sich in verschiedenen Studien vergleichbare Ergebnisse, die Leukozyten-Werte werden kontrovers dargestellt, aber größtenteils wie in unserer Studie ebenfalls erhöht. Yildirim et al. beispielsweise kamen in einer Studie zu dem Ergebnis, dass die CRP-Werte von Patienten mit einer SBP signifikant höher waren als die von Patienten mit portaler Hypertonie oder malignem Aszites, eine signifikante Differenz hinsichtlich der Leukozyten wurde nicht beschrieben [143]. Iliaz et al. hingegen zeigten bei Patienten mit Leberzirrhose sowohl signifikant erhöhte CRP- als auch Leukozyten-Werte bei einer SBP im Vergleich zur Abwesenheit einer solchen auf [144]. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Preto-Zamperlini et al., die erhöhte CRP- und Leukozyten-Werte bei einer SBP verglichen mit nicht infiziertem Aszites bei Kindern mit chronischer Lebererkrankung feststellten [145].

Für den CRP-Wert konnte zusätzlich ein signifikant höherer Wert in der Gruppe der PCA verglichen mit der PHT ermittelt werden. Dies deckt sich mit den in der Literatur vorhandenen Daten [146].

4.4 Aktuelle Datenlage zur Methylierung von LINE-1 und miR-137 - mögliche Einsatzgebiete als Biomarker

Wir möchten zuerst auf LINE-1 als globalen Methylierungsmarker eingehen. Einsatz könnte dieser im Rahmen der Vorhersage, Diagnostik und von Vorsorgeuntersuchungen finden. Die meisten Studien unterstützten die Ansicht, dass eine LINE-1 Hypomethylierung mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines Malignoms in Zusammenhang steht. Eine prospektive Studie von Orgino et al. konnte beispielsweise bei Patienten mit einer familiären Belastung hinsichtlich eines Kolonkarzinoms zeigen, dass eine Hypomethylierung im Kolon mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines KRK verbunden ist, was wiederum auf eine Beziehung zwischen genetischer Prädisposition und somatisch epigenetischen Veränderungen hindeuten könnte [147].

In einigen Studien wurde ein Anstieg der Hypomethylierung im Prozess der Karzinogenese entsprechend der Malignität beschrieben. Die aktuelle Studienlage ist nicht eindeutig. So zeigten Kupcinskas et al., dass in präkanzerösen Läsionen keine verminderte Methylierung von LINE-1 im Vergleich zu Magenkarzinomen nachgewiesen werden konnte [88], wohingegen entsprechend einer Studie von Bea et al. bereits früh in der Karzinogenese eine Hypomethylierung zu detektieren war und eine Untergruppe mit schlechter Prognose anhand des Methylierungsstatus definiert werden konnte [90].

4 Diskussion

Weitere Neuerungen könnten sich in Bezug auf Prognose und Therapieansprechen ergeben. Eine Studie demonstrierte, dass bei gastrointestinalen Stromatumoren eine zunehmende Hypomethylierung von LINE-1 mit höherer Risikostratifizierung vorlag. Eine andere Studie konnte eine zunehmende Hypomethylierung bei höherem T Status sowie eine Assoziation mit einer schlechteren Prognose bei intrahepatischen CCC finden [148, 149].

Verschiedene Metaanalysen unterstützten die These, dass eine globale DNA-Hypomethylierung mit einer schlechteren Prognose in Tumorpatienten verbunden ist [126, 150]. Ye et al. konnten dies hinsichtlich des Überlebens von Patienten mit KRK in einer Metaanalyse aufzeigen. Eine Hypomethylierung war mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert und könnte einen prognostischen Wert haben [151].

Auch bezüglich des Therapieansprechens, was einen beträchtlichen Anteil für die Prognose ausmacht, wäre ein Einsatz der Methylierungsanalysen denkbar. Kawakami et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen einer adjuvanten Chemotherapie mit oralen Fluoropyrimidinen und dem Methylierungsstatus bei Patienten mit Kolonkarzinom. In dieser Studie zeigten sich Patienten mit adjuvanter Chemotherapie und hypomethylierten Karzinomen im Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit adjuvanter Chemotherapie und hypermethylierten Karzinomen [152]. Anders verhielt es sich in einer Studie von Lou et al., bei der Patienten mit Resektion eines Kolonkarzinoms im Stadium UICC III eine adjuvant Chemotherapie nach dem FOLFOX (Folinsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin)-Schema erhielten. Hier war eine LINE-1 Hypomethylierung mit einem früheren postoperativen Rezidiv sowie kürzerem krankheitsfreiem Überleben assoziiert [153]. Ähnliches war in einer Arbeit von Kaneko et al. zu sehen. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Kolonkarzinom und LINE-1 Hypomethylierung zeigte sich ein schlechteres progressionsfreies- und Gesamtüberleben und ein schlechteres Ansprechen auf die Chemotherapie nach dem FOLFOX-Schema [154]. Auch in anderen Tumoren wie z. B. HCC scheint die Hypomethylierung Einfluss auf die Prognose zu nehmen. Eine Hypomethylierung bei reseziertem HCC war mit einem schlechteren tumorfreien- und Gesamtüberleben verbunden [155].

Zudem könnten entsprechende Methylierungsanalysen zu einer Erweiterung des molekularen Verständnisses der Tumorbilogie und somit zur Evaluation individualisierter Therapieoptionen beitragen. Es hat sich beispielsweise gezeigt, dass LINE-1 Methylierung invers mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und *CpG island methylator phenotype* (CIMP) in KRK korreliert [156]. Denkbar wäre es auch, Methylierungsanalysen im Bereich des Monitorings bzw. im Rahmen von Staginguntersuchungen mit einzubeziehen. Interessante Informationen könnte auch die Methylierung spezifischer LINE-1 Sequenzen innerhalb von z. B. Protoonkogenen liefern [157].

4 Diskussion

Folgend wird die lokale Methylierungsanalyse des Tumorsuppressors miR-137 und dessen Stärke als zukünftiger potentieller Biomarker diskutiert. Der Anteil an durch Methylierung beeinflussten miRNA Genen ist höher als der von Protein kodierenden Genen, was positiv im Rahmen des Einsatzes als potentiellen Biomarker zu werten ist [101]. Methylierungsanalysen von miR-137 sowie Messung der Expression scheinen vielversprechende Möglichkeiten in Diagnostik und Therapie zu eröffnen. Bei der Expression von miR-137 zeigte sich in verschiedenen Studien eine negative Korrelation mit dem Methylierungsstatus. Nimmt man dies als Tatsache, ergeben sich anhand der aktuellen Studienlage inklusive Expressionsanalysen enorm viele Ansatzpunkte für eine personalisierte Medizin. So ist zwar weiterhin Forschung auf diesem Gebiet notwendig, es liegen jedoch auch schon vielversprechende Ergebnisse vor. So konnte in einer Studie von Zhu et al. demonstriert werden, dass es nach ektopter Expression von miR-137 in NSCLC Zelllinien zu einer Reduktion von *cell division control protein 42* (Cdc42) und *cell division protein kinase 6* (Cdk6) und einem G1 Zellzyklusarrest kam [158]. Eine weitere Studie zeigte, dass miR-137 in Pankreaskarzinomzellen deren Sensitivität für Doxorubicin fördert [159] und miR-137 zukünftig eventuell einen therapeutischen Stellenwert bekommt. Eine weitere Studie untersuchte die Methylierung von SHOX2, gemessen in ccfDNA im Blut bei Patienten mit Nierenzellkarzinom und Karzinomgewebe [160]. Hierbei konnte eine positive Korrelation mit fortgeschrittenen Karzinomstadium und Tod nach Nephrektomie bzw. Teilnephrektomie demonstriert werden. Zudem wäre denkbar, z. B. in Bezug auf das Auftreten von Metastasen in miR-137 einen prädiktiven Marker zu finden. Filippova et al. zeigte, dass bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom der prädiktive Wert der Methylierung von miR-137 in Bezug zum Auftreten von Metastasen mit einer Sensitivität von 82 % und einer Spezifität von 86 % bestimmt werden konnte. [161]. Gemeinsam mit anderen tumorspezifischen Genen oder Genprodukten könnten sich diese Zahlen eventuell noch optimieren lassen. Beispielsweise korreliert die Expression von miR-137 und dem Zielgen AFM mit dem Progress im HCC [162]. Auch hinsichtlich der Prognose ist ein Zugewinn an Informationen mit Hilfe von miR-137 Methylierungsanalysen denkbar. In einer Studie von Langevin et al. konnte eine Assoziation zwischen Methylierung von miR-137 und einem schlechteren Gesamtüberleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals Bereich nachgewiesen werden [163]. Die Bestimmung der Methylierung der Gene SHOX2 und SEPT9 zeigten in ccfDNA sowie in zellulären Bestandteilen von Aszites einen zur zytologischen Untersuchung zusätzlichen diagnostischen sowie prognostischen Wert [113]. In einer anderen Arbeit von Patienten mit resektablem KRK wurden sowohl der Primärtumor als auch die bei der Operation gewonnene Flüssigkeit der Peritoneallavage hinsichtlich Methylierung von 4 tumor-assoziierten Genen untersucht. Festgestellt wurde ein kürzeres progressionsfreies Überleben bei Methylierung mindestens eines dieser Gene [124]. Neben

4 Diskussion

der erwähnten, zukünftig vorstellbaren Einsatzgebiete, könnte man sich ebenso den Einsatz im Rahmen von Staginguntersuchungen vorstellen.

Die Ausbeute an vorhandenen Studien bezogen auf Methylierung bei Peritonitis ist nicht groß. Aber wenn wir davon ausgehen, wie bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert, dass Änderungen im Methylierungsverhalten vorliegen, wäre der Einsatz sowohl in Gebieten wie Diagnostik, Prognose, Beurteilung des Therapieansprechens und Monitoring durchaus denkbar.

4.5 Limitationen der Studie und Ausblick

Auch wenn unsere Studie eine der ersten in diesem Bereich darstellt und wir erfolgreich systematisch die DNA-Methylierung im Aszites analysiert haben, sollten einige Limitationen diskutiert werden.

Proben von Patienten mit PCA sind recht selten und wurden im Rahmen dieser prospektiven Studie aktiv gesammelt, dennoch bleibt die Zahl der eingeschlossenen Patienten relativ klein. Die miR-137 und LINE-1 Methylierungsanalysen wurden prospektiv erhoben, wodurch die Anzahl an eingeschlossenen Patienten in diesem Zeitraum womöglich geringer ausfällt, als bei einer retrospektiven Analyse.

Eine weitere Limitation bietet die Diagnostik des Aszites. Hier können z. B. falsch negative Ergebnisse eine Peritonealkarzinose verschleiern. Zudem ist gerade diese Gruppe in unserem Kollektiv recht heterogen, d. h., dass wenige Proben zu den einzelnen Krebsentitäten vorhanden sind, die als Primarius eingestuft wurden. Das wiederum erschwert die Analyse der einzelnen Tumorarten. Des Weiteren konnten wir, da Aszites per se pathologisch ist, keine gesunden Patienten als Kontrollgruppe einschließen. Stattdessen haben wir als Vergleichsgruppe die PHT vorgeschlagen, da diese Proben unserer Ansicht nach am wenigsten ortsfremde Zellen beinhalten.

Die durch Zentrifugation des Aszites gewonnenen Zellpellets enthalten je nach Genese des Aszites in unterschiedlicher Menge Zelldetritus, aber auch DNA-liefernde Zellen wie maligne Zellen, normale Peritonealzellen, Entzündungszellen wie Makrophagen und Leukozyten. Wenn, wie bei unserer Studie speziell ein Unterschied zur Peritonealkarzinose und Peritonitis aufgezeigt werden soll, scheint es sinnvoll zu sein, die Zellen entsprechend zu differenzieren und danach zu untersuchen. Zudem befinden sich in der Aszitesflüssigkeit neben Zellen auch DNA-Bestandteile (z. B. exosomale DNA oder zirkulierende zellfreie DNA), die eventuell weitere zielführende Informationen liefern und ebenfalls in weiteren Studien integriert werden könnten.

Ein anderer Punkt ist die Verwendung der uns zur Verfügung stehenden Arbeitsmaterialien. Die DNA-Methylierung von LINE-1 und miR-137 ist in unserem Labor zwar seit Jahren gut etabliert und validiert, die verwendeten Kits sind jedoch theoretisch zur Anwendung an

4 Diskussion

Gewebe gedacht, so dass es sich um ein noch nicht für Zellpellets standardisiertes Verfahren handelt. In den Versuchen konnten wir aber eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufzeigen. Ebenfalls anzumerken ist, dass ein Profiling aller DNA-Bereiche einen größeren Vorteil bieten würde. Wir haben uns in unserer *proof of principle* Studie für LINE-1 als globalen Methylierungsmarker und miR-137 als fungierenden Tumorsuppressor entschieden.

Auch wenn Expressionsanalysen nicht Gegenstand der aktuellen Arbeit sind, ist es ein interessantes Feld die DNA-Methylierung und miRNA-Expression im Aszites in zukünftigen Studien parallel zu betrachten.

Zudem könnten die zusätzliche Analyse weiterer Faktoren wie Alter, Geschlecht, Lebensgewohnheiten und Komorbiditäten einen Informationszugewinn liefern [164].

Unsere Studie lässt zwar keine hinreichenden Schlüsse auf eine Anwendung hinsichtlich einer besseren Diagnostik des Aszites zu, zeigt aber die Möglichkeit der Analyse von DNA-Methylierung im Aszites, was bis heute keinen breiten Eingang in aktuelle Forschung gefunden hat.

Für einen möglichen zukünftigen klinischen Einsatz ist die Datenlage nicht ausreichend und es bedarf weiterer Studien um die DNA-Methylierung von LINE-1 und miR-137 bzw. anderer Zielmoleküle im klinischen Alltag als sinnvolles Tool zu integrieren.

5 Zusammenfassung

Aszites, häufig Symptom einer ernst zu nehmenden Erkrankung, bedarf dringend weiterer Diagnostik. Den unterschiedlichen Methoden zur Abklärung mangelt es jedoch an ausreichend guter Sensitivität und teilweise Spezifität. Die DNA-Methylierung als diagnostisches Tool ist ein vielversprechendes Forschungsgebiet und findet bereits bei Körperflüssigkeiten wie Blut und bei Gewebeproben Anwendung. Aufgrund der guten Zugänglichkeit, komplikationsarmen Gewinnung von Material sowie unmittelbaren Nähe zum Fokus des Interesses ist Aszites als gute Quelle zur Evaluation neuer Biomarker zu sehen. Durch Methoden wie Amplifikation kann bereits mit geringen DNA-Konzentrationen gearbeitet werden.

Im Fokus dieser Arbeit steht zum einen als *proof of principle* die Möglichkeit des Nachweises von DNA-Methylierung im Aszites und zum anderen die Bestimmung der Methylierung von LINE-1 und miR-137 zur Unterscheidung zwischen malignem Aszites und Peritonitis mitunter wegen der dramatischen Konsequenzen hinsichtlich Therapie und Prognose. Dafür haben wir prospektiv 79 Aszitesproben unterschiedlicher Genese gesammelt und analysiert.

Wir konnten erfolgreich die DNA-Methylierung im Aszites messen und reproduzierbare Ergebnisse aufzeigen, die sich über 72 Stunden stabil zeigten, unabhängig vom Alliquotierungsvolumen. LINE-1 zeigte sich bei Patienten mit portaler Hypertonie im Vergleich zu einer Kombination von Peritonitis und Karzinom hypomethyliert. Eine Hypomethylierung von miR-137 war bei der Gruppe der Peritonitis vs. portale Hypertonie, vs. Peritonealkarzinose und vs. keine Peritonitis zu detektieren. Außerdem konnte eine Hypermethylierung von miR-137 beim Vergleich von Patienten mit und ohne Malignom aufgezeigt werden.

Die Entzündungsparameter CRP und Leukozyten im Blut lagen bei Peritonitis höher als bei der Gruppe ohne Hinweis auf eine Peritonitis. Zellzahl und PMN im Aszites zeigten eine negative Korrelation zur miR-137 Methylierung.

Unsere Daten dieser *proof of principle* Studie legen nahe, dass Unterschiede im DNA-Methylierungsstatus im Aszites hinsichtlich der Genese zu detektieren sind. Mit einer Erweiterung der Analysen in der Zukunft, wie z. B. einer Zelldifferenzierung, Einbeziehung von mehr Proben, Analyse des gesamten Genoms sowie extrazellulärer DNA wären weitere wichtige und differenziertere Beurteilungen bezüglich eines machbaren translationalen Einsatzes von Methylierungsanalysen aus dem Aszites möglich.

6 Literaturverzeichnis

1. Rudralingam, V., C. Footitt, and B. Layton, *Ascites matters*. *Ultrasound*, 2017. **25**(2): p. 69-79.
2. Gerbes, A.L., et al., [*German S 3-guideline "ascites, spontaneous bacterial peritonitis, hepatorenal syndrome"*]. *Z Gastroenterol*, 2011. **49**(6): p. 749-79.
3. Pache, I. and M. Bilodeau, *Severe haemorrhage following abdominal paracentesis for ascites in patients with liver disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. **21**(5): p. 525-9.
4. McVay, P.A. and P.T. Toy, *Lack of increased bleeding after paracentesis and thoracentesis in patients with mild coagulation abnormalities*. *Transfusion*, 1991. **31**(2): p. 164-71.
5. European Association for the Study of the Liver, *EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis*. *J Hepatol*, 2010. **53**(3): p. 397-417.
6. Horvatis, T., et al., [*Hepatocardiac disorders : Interactions between two organ systems*]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 2016. **111**(5): p. 447-52.
7. Appenrodt, B., J. Trebicka, and T. Sauerbruch, [*Complications of liver cirrhosis*]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2011. **136**(31-32): p. 1601-4.
8. Zipprich, A. and C. Ripoll, [*Cirrhosis*]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2021. **146**(10): p. 684-697.
9. Izbicki, J.R., et al., *Extrahepatic portal hypertension in chronic pancreatitis: an old problem revisited*. *Ann Surg*, 2002. **236**(1): p. 82-9.
10. Scurt, F.G., et al., [*Acute kidney injury following acute pancreatitis (AP-AKI): Definition, Pathophysiology, Diagnosis and Therapy*]. *Z Gastroenterol*, 2020. **58**(12): p. 1241-1266.
11. Oey, R.C., H.R. van Buuren, and R.A. de Man, *The diagnostic work-up in patients with ascites: current guidelines and future prospects*. *Neth J Med*, 2016. **74**(8): p. 330-335.
12. Runyon, B.A., et al., *The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites*. *Ann Intern Med*, 1992. **117**(3): p. 215-20.
13. Rimola, A., et al., *Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club*. *J Hepatol*, 2000. **32**(1): p. 142-53.
14. Runyon, B.A., J.C. Hoefs, and T.R. Morgan, *Ascitic fluid analysis in malignancy-related ascites*. *Hepatology*, 1988. **8**(5): p. 1104-9.
15. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
16. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
17. Bose, K., et al., *Perioperative Therapy of Oesophagogastric Adenocarcinoma: Mainstay and Future Directions*. *Gastroenterol Res Pract*, 2017. **2017**: p. 5651903.
18. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
19. Piso, P. and D. Arnold, *Multimodal treatment approaches for peritoneal carcinosis in colorectal cancer*. *Dtsch Arztebl Int*, 2011. **108**(47): p. 802-8.
20. Sampson, J.A., *Implantation Peritoneal Carcinomatosis of Ovarian Origin*. *Am J Pathol*, 1931. **7**(5): p. 423-444 39.
21. Mikula-Pietrasik, J., et al., *The peritoneal "soil" for a cancerous "seed": a comprehensive review of the pathogenesis of intraperitoneal cancer metastases*. *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(3): p. 509-525.
22. Kusamura, S., et al., *Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis*. *World J Gastrointest Oncol*, 2010. **2**(1): p. 12-8.
23. Terzi, C., N.C. Arslan, and A.E. Canda, *Peritoneal carcinomatosis of gastrointestinal tumors: where are we now?* *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(39): p. 14371-80.
24. Valasek, M.A. and R.K. Pai, *An Update on the Diagnosis, Grading, and Staging of Appendiceal Mucinous Neoplasms*. *Adv Anat Pathol*, 2018. **25**(1): p. 38-60.
25. Ronnett, B.M., et al., *Patients with pseudomyxoma peritonei associated with disseminated peritoneal adenomucinosis have a significantly more favorable prognosis than patients with peritoneal mucinous carcinomatosis*. *Cancer*, 2001. **92**(1): p. 85-91.

6 Literaturverzeichnis

26. Rufian-Andujar, B., et al., *From the Ronnett to the PSOGI Classification System for Pseudomyxoma Peritonei: A Validation Study*. Ann Surg Oncol, 2021. **28**(5): p. 2819-2827.
27. Sadeghi, B., et al., *Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study*. Cancer, 2000. **88**(2): p. 358-63.
28. Böcking, A., Motherby, Helma, Pomjanski, Natalja, *Treffsicherheit der Ergusszytologie samt adjuvanten Untersuchungsmethoden*. Dtsch Arztebl International, October 6, 2000. **97**: p. 2626-30.
29. Garrison, R.N., et al., *Malignant ascites. Clinical and experimental observations*. Ann Surg, 1986. **203**(6): p. 644-51.
30. Ayantunde, A.A. and S.L. Parsons, *Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study*. Ann Oncol, 2007. **18**(5): p. 945-9.
31. Sangisetty, S.L. and T.J. Miner, *Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures*. World J Gastrointest Surg, 2012. **4**(4): p. 87-95.
32. McMullen, J.R.W., et al., *Peritoneal carcinomatosis: limits of diagnosis and the case for liquid biopsy*. Oncotarget, 2017. **8**(26): p. 43481-43490.
33. Esquivel, J., et al., *Accuracy and clinical relevance of computed tomography scan interpretation of peritoneal cancer index in colorectal cancer peritoneal carcinomatosis: a multi-institutional study*. J Surg Oncol, 2010. **102**(6): p. 565-70.
34. Jayakrishnan, T.T., et al., *Role of laparoscopy in patients with peritoneal metastases considered for cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC)*. World J Surg Oncol, 2014. **12**: p. 270.
35. Sugarbaker, P.H., *Peritoneal Carcinomatosis: Principles of Management*. Springer Science & Business Media, Kluwer Academic Publishers (Boston, Dordrecht, London), 1996: p. 434.
36. Pelz, J.O. and C.T. Germer, *[Morbidity and mortality of hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion]*. Chirurg, 2013. **84**(11): p. 957-61.
37. Spratt, J.S., et al., *Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy*. Cancer Res, 1980. **40**(2): p. 256-60.
38. Barrios Sanchez, P., *Radical treatment of peritoneal carcinomatosis: Times are changing*. Cir Esp, 2019. **97**(3): p. 125-127.
39. Gonzalez-Moreno, S., *Peritoneal Surface Oncology: A progress report*. Eur J Surg Oncol, 2006. **32**(6): p. 593-6.
40. Esquivel, J., et al., *Consensus statement on the loco regional treatment of colorectal cancer with peritoneal dissemination*. J Surg Oncol, 2008. **98**(4): p. 263-7.
41. Helm, J.H., et al., *Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: a systematic review and meta-analysis*. Ann Surg Oncol, 2015. **22**(5): p. 1686-93.
42. Morano, W.F., et al., *Clinical studies in CRS and HIPEC: Trials, tribulations, and future directions- A systematic review*. J Surg Oncol, 2018. **117**(2): p. 245-259.
43. Lambert, L.A., *Looking up: Recent advances in understanding and treating peritoneal carcinomatosis*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(4): p. 284-98.
44. de Boer, N.L., et al., *Acute malignant obstruction in patients with peritoneal carcinomatosis: The role of palliative surgery*. Eur J Surg Oncol, 2019. **45**(3): p. 389-393.
45. Jalan, R., et al., *Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013*. J Hepatol, 2014. **60**(6): p. 1310-24.
46. Conn, H.O., *Spontaneous Peritonitis and Bacteremia in Laennec's Cirrhosis Caused by Enteric Organisms. A Relatively Common but Rarely Recognized Syndrome*. Ann Intern Med, 1964. **60**: p. 568-80.
47. Krencker, E., *Bacterium coli commune als Sepsiserreger in 2 fallen von abdominalen krankungen*. Munchen Med Wschr., 1907(54): p. 2095.
48. Mattos, A.A., et al., *Spontaneous bacterial peritonitis and extraperitoneal infections in patients with cirrhosis*. Ann Hepatol, 2020. **19**(5): p. 451-457.

6 Literaturverzeichnis

49. Nousbaum, J.B., et al., *Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 2007. **45**(5): p. 1275-81.
50. Evans, L.T., et al., *Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites*. Hepatology, 2003. **37**(4): p. 897-901.
51. Guarner, C., et al., *Risk of a first community-acquired spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics with low ascitic fluid protein levels*. Gastroenterology, 1999. **117**(2): p. 414-9.
52. Bajaj, J.S., et al., *Association of proton pump inhibitor therapy with spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(5): p. 1130-4.
53. Dam, G., et al., *Proton pump inhibitors as a risk factor for hepatic encephalopathy and spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis with ascites*. Hepatology, 2016. **64**(4): p. 1265-72.
54. Terg, R., et al., *Proton pump inhibitor therapy does not increase the incidence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: a multicenter prospective study*. J Hepatol, 2015. **62**(5): p. 1056-60.
55. Obstein, K.L., et al., *Association between model for end-stage liver disease and spontaneous bacterial peritonitis*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(12): p. 2732-6.
56. Appenrodt, B., et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1327-33.
57. Nischalke, H.D., et al., *Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis*. J Hepatol, 2011. **55**(5): p. 1010-6.
58. Lachar, J. and J.S. Bajaj, *Changes in the Microbiome in Cirrhosis and Relationship to Complications: Hepatic Encephalopathy, Spontaneous Bacterial Peritonitis, and Sepsis*. Semin Liver Dis, 2016. **36**(4): p. 327-330.
59. Wiest, R., M. Lawson, and M. Geuking, *Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis*. J Hepatol, 2014. **60**(1): p. 197-209.
60. Scurt, F.G., et al., *[Paradigm shift in understanding Acute kidney injury in patients with chronic liver disease: From pathophysiology to defining disease entities]*. Z Gastroenterol, 2020. **58**(3): p. 254-266.
61. Schmid, S.A., et al., *[Spontaneous bacterial peritonitis]*. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2012. **107**(7): p. 548-52.
62. D. Häussinger, M.W., C. Kudlek, *Spontan bakterielle Peritonitis: Diagnose, Therapie und Prophylaxe*. Dtsch Arztebl International, 2000. **97**(42): p. 2789.
63. McHutchison JG, R.B., *Spontaneous bacterial peritonitis*. In: Surawicz CM, Owen RL, editors. *Gastrointestinal and hepatic infections*. Philadelphia, PA: WB Saunders Company. 1994.
64. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e.e.e. and L. European Association for the Study of the, *Corrigendum to "EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis" [J Hepatol 69 (2018) 406-460]*. J Hepatol, 2018. **69**(5): p. 1207.
65. Dever, J.B. and M.Y. Sheikh, *Review article: spontaneous bacterial peritonitis--bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention*. Aliment Pharmacol Ther, 2015. **41**(11): p. 1116-31.
66. Friedrich, K., et al., *Microbiology and resistance in first episodes of spontaneous bacterial peritonitis: implications for management and prognosis*. J Gastroenterol Hepatol, 2016. **31**(6): p. 1191-5.
67. de Mattos, A.A., et al., *Multi-resistant bacteria in spontaneous bacterial peritonitis: a new step in management?* World J Gastroenterol, 2014. **20**(39): p. 14079-86.
68. Gines, P., et al., *Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial*. Hepatology, 1990. **12**(4 Pt 1): p. 716-24.
69. Bernard, B., et al., *Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis*. Hepatology, 1999. **29**(6): p. 1655-61.

6 Literaturverzeichnis

70. Chavez-Tapia, N.C., et al., *Antibiotic prophylaxis for cirrhotic patients with upper gastrointestinal bleeding*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(9): p. CD002907.
71. Fernandez, J., et al., *Primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis delays hepatorenal syndrome and improves survival in cirrhosis*. Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 818-24.
72. Goel, A., et al., *Systematic review with meta-analysis: rifaximin for the prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2017. **46**(11-12): p. 1029-1036.
73. Sort, P., et al., *Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis*. N Engl J Med, 1999. **341**(6): p. 403-9.
74. Marciano, S., et al., *Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis: incidence, outcomes, and treatment strategies*. Hepat Med, 2019. **11**: p. 13-22.
75. Yu, T., et al., *Proton pump inhibitor therapy and its association with spontaneous bacterial peritonitis incidence and mortality: A meta-analysis*. Dig Liver Dis, 2016. **48**(4): p. 353-9.
76. Tergast, T.L., et al., *Dose-dependent impact of proton pump inhibitors on the clinical course of spontaneous bacterial peritonitis*. Liver Int, 2018.
77. Senzolo, M., et al., *beta-Blockers protect against spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a meta-analysis*. Liver Int, 2009. **29**(8): p. 1189-93.
78. Arvaniti, V., et al., *Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis*. Gastroenterology, 2010. **139**(4): p. 1246-56, 1256 e1-5.
79. Liu, F., et al., *Evaluation of tumor markers for the differential diagnosis of benign and malignant ascites*. Ann Hepatol, 2014. **13**(3): p. 357-63.
80. Zhan, N., W.G. Dong, and J. Wang, *The clinical significance of vascular endothelial growth factor in malignant ascites*. Tumour Biol, 2016. **37**(3): p. 3719-25.
81. Sun, J., Y.X. Chang, and C.Y. Niu, *Evaluation of ascitic soluble human leukocyte antigen-G for distinguishing malignant ascites from benign ascites*. Tumour Biol, 2017. **39**(11): p. 1010428317726840.
82. Biomarkers Definitions Working, G., *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 89-95.
83. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
84. Gama-Sosa, M.A., et al., *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(19): p. 6883-94.
85. Baba, Y., et al., *Long Interspersed Element-1 Methylation Level as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Cancers*. Digestion, 2018. **97**(1): p. 26-30.
86. Chalitchagorn, K., et al., *Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis*. Oncogene, 2004. **23**(54): p. 8841-6.
87. Thayer, R.E., M.F. Singer, and T.G. Fanning, *Undermethylation of specific LINE-1 sequences in human cells producing a LINE-1-encoded protein*. Gene, 1993. **133**(2): p. 273-7.
88. Kupcinskis, J., et al., *LINE-1 hypomethylation is not a common event in preneoplastic stages of gastric carcinogenesis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4828.
89. Park, S.Y., et al., *Comparison of CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in premalignant stages of gastric cancer, stratified for Helicobacter pylori infection*. J Pathol, 2009. **219**(4): p. 410-6.
90. Bae, J.M., et al., *ALU and LINE-1 hypomethylations in multistep gastric carcinogenesis and their prognostic implications*. Int J Cancer, 2012. **131**(6): p. 1323-31.
91. Lee, J.R., et al., *Differential LINE-1 Hypomethylation of Gastric Low-Grade Dysplasia from High Grade Dysplasia and Intramucosal Cancer*. Gut Liver, 2011. **5**(2): p. 149-53.
92. Kim, E.J., et al., *Long interspersed nuclear element (LINE)-1 methylation level as a molecular marker of early gastric cancer*. Dig Liver Dis, 2016. **48**(9): p. 1093-7.
93. Jung, A. and T. Kirchner, *Liquid Biopsy in Tumor Genetic Diagnosis*. Dtsch Arztebl Int, 2018. **115**(10): p. 169-174.

6 Literaturverzeichnis

94. Hiraki, M., et al., *Aberrant gene methylation in the peritoneal fluid is a risk factor predicting peritoneal recurrence in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(3): p. 330-8.
95. Hiraki, M., et al., *Aberrant gene methylation is a biomarker for the detection of cancer cells in peritoneal wash samples from advanced gastric cancer patients*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(10): p. 3013-9.
96. Kerachian, M.A. and M. Kerachian, *Long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) methylation in colorectal cancer*. Clin Chim Acta, 2019. **488**: p. 209-214.
97. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
98. Goel, A. and C.R. Boland, *Epigenetics of colorectal cancer*. Gastroenterology, 2012. **143**(6): p. 1442-1460 e1.
99. Ma, Y., X. Wang, and H. Jin, *Methylated DNA and microRNA in body fluids as biomarkers for cancer detection*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 10307-31.
100. Balaguer, F., et al., *Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis*. Cancer Res, 2010. **70**(16): p. 6609-18.
101. Kunej, T., et al., *Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature*. Mutat Res, 2011. **717**(1-2): p. 77-84.
102. Shimizu, T., et al., *Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer*. Eur Urol, 2013. **63**(6): p. 1091-100.
103. Kozaki, K., et al., *Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(7): p. 2094-105.
104. Loginov, V.I., et al., *[Novel miRNA genes hypermethylated in breast cancer]*. Mol Biol (Mosk), 2016. **50**(5): p. 797-802.
105. Kang, N., et al., *Silencing of miR-137 by aberrant promoter hypermethylation in surgically resected lung cancer*. Lung Cancer, 2015. **89**(2): p. 99-103.
106. Bandres, E., et al., *Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer*. Int J Cancer, 2009. **125**(11): p. 2737-43.
107. Huang, Y.C., et al., *Epigenetic silencing of miR-137 contributes to early colorectal carcinogenesis by impaired Aurora-A inhibition*. Oncotarget, 2016. **7**(47): p. 76852-76866.
108. Steponaitiene, R., et al., *Epigenetic silencing of miR-137 is a frequent event in gastric carcinogenesis*. Mol Carcinog, 2016. **55**(4): p. 376-86.
109. Nista, E.C., et al., *Humoral Predictors of Malignancy in IPMN: A Review of the Literature*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(23).
110. Conti, I., et al., *MicroRNAs Patterns as Potential Tools for Diagnostic and Prognostic Follow-Up in Cancer Survivorship*. Cells, 2021. **10**(8).
111. Ohtsuka, M., et al., *Circulating MicroRNAs in Gastrointestinal Cancer*. Cancers (Basel), 2021. **13**(13).
112. Wang, M., et al., *Diagnostic and Prognostic Value of Circulating CircRNAs in Cancer*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 649383.
113. Jung, M., et al., *Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant, and malignant ascites*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 24.
114. Rubin, M., *When to adjust alpha during multiple testing: a consideration of disjunction, conjunction, and individual testing*. Synthese, 2021. **199**(3): p. 10969-11000.
115. Mukaka, M.M., *Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research*. Malawi Med J, 2012. **24**(3): p. 69-71.
116. Schindler, P., et al., *Expression of microRNAs in the ascites of patients with peritoneal carcinomatosis and peritonitis*. Cancer Cytopathol, 2018. **126**(5): p. 353-363.
117. Rosenfeld, N., et al., *MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 462-9.
118. Palanca-Ballester, C., et al., *Cancer Epigenetic Biomarkers in Liquid Biopsy for High Incidence Malignancies*. Cancers (Basel), 2021. **13**(12).

6 Literaturverzeichnis

119. Wei, B., et al., *A panel of DNA methylation biomarkers for detection and improving diagnostic efficiency of lung cancer*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 16782.
120. Li, N., Y. Zeng, and J. Huang, *Signaling pathways and clinical application of RASSF1A and SHOX2 in lung cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2020. **146**(6): p. 1379-1393.
121. Mari-Alexandre, J., et al., *Translating cancer epigenomics into the clinic: focus on lung cancer*. Transl Res, 2017. **189**: p. 76-92.
122. Warton, K. and G. Samimi, *Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer*. Front Mol Biosci, 2015. **2**: p. 13.
123. Fu, B., et al., *Cell-Free Circulating Methylated SEPT9 for Noninvasive Diagnosis and Monitoring of Colorectal Cancer*. Dis Markers, 2018. **2018**: p. 6437104.
124. Kamiyama, H., et al., *Promoter hypermethylation of tumor-related genes in peritoneal lavage and the prognosis of patients with colorectal cancer*. J Surg Oncol, 2009. **100**(1): p. 69-74.
125. Murata, A., et al., *Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer*. Br J Cancer, 2013. **109**(2): p. 408-15.
126. Barchitta, M., et al., *LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109478.
127. Wu, H.C., et al., *Repetitive element DNA methylation levels in white blood cell DNA from sisters discordant for breast cancer from the New York site of the Breast Cancer Family Registry*. Carcinogenesis, 2012. **33**(10): p. 1946-52.
128. Di, J.Z., et al., *Association of hypomethylation of LINE-1 repetitive element in blood leukocyte DNA with an increased risk of hepatocellular carcinoma*. J Zhejiang Univ Sci B, 2011. **12**(10): p. 805-11.
129. Wu, H.C., et al., *Global DNA methylation levels in white blood cells as a biomarker for hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study*. Carcinogenesis, 2012. **33**(7): p. 1340-5.
130. Zhu, Z.Z., et al., *Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis*. Int J Epidemiol, 2012. **41**(1): p. 126-39.
131. Lorente-Sorolla, C., et al., *Inflammatory cytokines and organ dysfunction associate with the aberrant DNA methylome of monocytes in sepsis*. Genome Med, 2019. **11**(1): p. 66.
132. Teerawattanapong, N., et al., *Blood leukocyte LINE-1 hypomethylation and oxidative stress in knee osteoarthritis*. Heliyon, 2019. **5**(5): p. e01774.
133. Maugeri, A., et al., *Resveratrol Modulates SIRT1 and DNMT Functions and Restores LINE-1 Methylation Levels in ARPE-19 Cells under Oxidative Stress and Inflammation*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(7).
134. Baptista, N.B., et al., *DNA methylation levels of SOCS1 and LINE-1 in oral epithelial cells from aggressive periodontitis patients*. Arch Oral Biol, 2014. **59**(7): p. 670-8.
135. Andia, D.C., et al., *DNA methylation analysis of SOCS1, SOCS3, and LINE-1 in microdissected gingival tissue*. Clin Oral Investig, 2015. **19**(9): p. 2337-44.
136. Wang, J., et al., *miR-137 targets the inhibition of TCF4 to reverse the progression of osteoarthritis through the AMPK/NF-kappaB signaling pathway*. Biosci Rep, 2020.
137. Zhang, Y., et al., *miR-137 suppresses cell growth and extracellular matrix degradation through regulating ADAMTS-5 in chondrocytes*. Am J Transl Res, 2019. **11**(11): p. 7027-7034.
138. Chen, Q., et al., *miR-137 is frequently down-regulated in gastric cancer and is a negative regulator of Cdc42*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(7): p. 2009-16.
139. Zhang, W., et al., *miR-137 is a tumor suppressor in endometrial cancer and is repressed by DNA hypermethylation*. Lab Invest, 2018. **98**(11): p. 1397-1407.
140. Kushlinskii, N.E., et al., *[Clinical significance of methylation of a group of miRNA genes in patients with ovarian cancer.]*. Klin Lab Diagn, 2020. **65**(5): p. 321-327.
141. Baccarelli, A., et al., *Repetitive element DNA methylation and circulating endothelial and inflammation markers in the VA normative aging study*. Epigenetics, 2010. **5**(3): p. 222-8.

6 Literaturverzeichnis

142. Zhang, F.F., et al., *White blood cell global methylation and IL-6 promoter methylation in association with diet and lifestyle risk factors in a cancer-free population*. Epigenetics, 2012. **7**(6): p. 606-14.
143. Yildirim, B., R. Sari, and N. Isci, *Patients with spontaneous bacterial peritonitis, and malignant and cirrhotic ascites*. J Natl Med Assoc, 2005. **97**(2): p. 276-80.
144. Iliaz, R., et al., *Predicting mortality in patients with spontaneous bacterial peritonitis using routine inflammatory and biochemical markers*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2018. **30**(7): p. 786-791.
145. Preto-Zamperlini, M., et al., *Elevated C-reactive protein and spontaneous bacterial peritonitis in children with chronic liver disease and ascites*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2014. **58**(1): p. 96-8.
146. van de Poll, M.C., et al., *C-reactive protein concentration is associated with prognosis in patients suffering from peritoneal carcinomatosis of colorectal origin*. Int J Colorectal Dis, 2011. **26**(8): p. 1067-73.
147. Ogino, S., et al., *Prospective study of family history and colorectal cancer risk by tumor LINE-1 methylation level*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(2): p. 130-40.
148. Igarashi, S., et al., *A novel correlation between LINE-1 hypomethylation and the malignancy of gastrointestinal stromal tumors*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(21): p. 5114-23.
149. Jeong, S., et al., *Tumoral LINE-1 hypomethylation is associated with poor survival of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 588.
150. Li, J., et al., *The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106290.
151. Ye, D., et al., *The role of LINE-1 methylation in predicting survival among colorectal cancer patients: a meta-analysis*. Int J Clin Oncol, 2017. **22**(4): p. 749-757.
152. Kawakami, K., et al., *Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation is a potential biomarker for the prediction of response to oral fluoropyrimidines in microsatellite stable and CpG island methylator phenotype-negative colorectal cancer*. Cancer Sci, 2011. **102**(1): p. 166-74.
153. Lou, Y.T., et al., *LINE-1 Methylation Status Correlates Significantly to Post-Therapeutic Recurrence in Stage III Colon Cancer Patients Receiving FOLFOX-4 Adjuvant Chemotherapy*. PLoS One, 2014. **10**(4): p. e0123973.
154. Kaneko, M., et al., *Prognostic and predictive significance of long interspersed nucleotide element-1 methylation in advanced-stage colorectal cancer*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 945.
155. Gao, X.D., et al., *Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 promoter is associated with poor outcomes for curative resected hepatocellular carcinoma*. Liver Int, 2014. **34**(1): p. 136-46.
156. Ogino, S., et al., *LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Int J Cancer, 2008. **122**(12): p. 2767-73.
157. Hur, K., et al., *Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis*. Gut, 2014. **63**(4): p. 635-46.
158. Zhu, X., et al., *miR-137 inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6*. FEBS Lett, 2013. **587**(1): p. 73-81.
159. Wang, Z.C., et al., *MicroRNA-137 inhibits autophagy and chemosensitizes pancreatic cancer cells by targeting ATG5*. Int J Biochem Cell Biol, 2019. **111**: p. 63-71.
160. Jung, M., et al., *Cell-Free SHOX2 DNA Methylation in Blood as a Molecular Staging Parameter for Risk Stratification in Renal Cell Carcinoma Patients: A Prospective Observational Cohort Study*. Clin Chem, 2019. **65**(4): p. 559-568.
161. Filippova, E.A., et al., *Hypermethylated Genes of MicroRNA in Ovarian Carcinoma: Metastasis Prediction Marker Systems*. Bull Exp Biol Med, 2019. **167**(1): p. 79-83.

6 Literaturverzeichnis

162. Wei, Q., et al., *Prognostic relevance of miR-137 and its liver microenvironment regulatory target gene AFM in hepatocellular carcinoma*. J Cell Physiol, 2019. **234**(7): p. 11888-11899.
163. Langevin, S.M., et al., *MicroRNA-137 promoter methylation is associated with poorer overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer, 2011. **117**(7): p. 1454-62.
164. Terry, M.B., et al., *DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies*. Epigenetics, 2011. **6**(7): p. 828-37.

Danksagung

Ich danke allen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Alexander Link, der mir die gesamte Zeit Verständnis und Vertrauen entgegengebracht und mich wissenschaftlich als auch nicht wissenschaftlich unterstützt hat.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner, Prof. Dr. med. Ali Canbay und Prof. Dr. med. Jochen Weigt, die mich, jeder auf ihre Art, motivierend und hilfreich begleitet haben.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie für die Bereitstellung der frisch abgenommenen Proben, sowie für das bereits vorhandene Material. Auch dem Forschungslabor möchte ich meinen Dank aussprechen. Hier standen mir insbesondere Frau Cosima Thon sowie Frau Ursula Stolz mit ihrer Fachexpertise immer zur Seite.

Meinen Freunden danke ich für die wiederkehrenden motivierenden, aufbauenden und ehrlichen Worte.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich in den guten aber auch schwierigen Zeiten begleitet, das Vertrauen in mich nicht verloren haben und immer für mich da waren. Mein Dank gilt meiner Mutter Karola, meinem Vater Gerhard, meinem Freund Florian und unserer wundervollen Tochter Mia.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke- Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„DNA-Methylierung als potentieller Biomarker in der Differentialdiagnose von Peritonitis und Peritonealkarzinose im Aszites“

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit der Unterstützung durch Prof. Dr. med. Alexander Link ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 12.06.2023

Katrin Bose

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den 12.06.2023

Katrin Bose

Anlagen

Anl. 1: RNA/miRNA- und DNA-Isolierung mit dem RNeasy Plus Universal Mini Kit

Vorbereitung

- für RNA/miRNA- und DNA-Isolation aus einer Probe
- Buffer RLT, Buffer RPE mit 100 % Ethanol mischen
- pro Probe: 1 RNeasy Mini Spin Column, 3 1,5 ml Eppendorf Tubes, 1 Collection Tube

RNA- und miRNA-Isolierung

1. Probe im Tube in Trockeneis platzieren, kleine Zentrifuge auf 4 °C vorkühlen
2. Tissue Ruptor benutzen (Probe darf nicht auftauen)
 - a. Material + 900 µl QIAzol Lysis Reagent mittels Tissue Ruptor zerkleinern (homogen), maximale Geschwindigkeit für 40 sek
3. 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. 180 µl Chloroform hinzufügen und 15 sek Homogenisieren mittels Vortexer und für 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
5. 15 min bei 13.000 revolutions per minute (rpm) (4 °C) zentrifugieren (danach Zentrifuge auf Raumtemperatur einstellen)
6. 750 µl 100 %iger Ethanol in neues 1,5 ml Eppendorf Tube geben und mit 500 µl der oberen, wässrigen Phase resuspendieren
7. 700 µl der Probe in ein Spin Column füllen, für 15 sek bei 10.000 rpm zentrifugieren und Durchfluss entfernen
8. den Rest der oberen, wässrigen, mit Ethanol resuspendierten Phase hinzugeben, für 15 sek bei 10.000 rpm zentrifugieren und Durchfluss entfernen
9. 700 µl Buffer RWT hinzufügen, 15 sek bei 10.000 rpm zentrifugieren und Durchfluss entfernen
10. 500 µl Buffer RPE hinzufügen, 15 sek bei 10.000 rpm zentrifugieren und Durchfluss entfernen
11. 500 µl Buffer RPE hinzufügen, 2 min bei 10.000 rpm zentrifugieren und Durchfluss entfernen
12. Spin Column in neues Collection Tube stellen und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
13. Spin Column in neues 1,5 ml Eppendorf Tube auf Eis stellen, für 2 min mit 50 µl RNase-freiem Wasser inkubieren, 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren und Wiederholung des Schrittes mit dem gewonnenen Eluat (statt RNase-freiem Wasser)
14. gewonnene RNA bei -80 °C lagern
15. restliches QIAzol (rosa und weiße Schicht) für DNA-Isolierung

DNA-Isolierung

- Ausgangsmaterial: rosa QIAzol und weiße Protein-/DNA-Schicht von der RNA-Isolation
 - organische Phase kann bei 4 °C über Nacht gelagert werden, RNA-Isolation (RNeasy Plus Universal Mini Kit) erst beenden
1. Zentrifuge auf 4 °C vorkühlen
 2. Reste der flüssigen Phase komplett abpipettieren
 3. 300 µl 100 %igen Ethanol hinzufügen und 15 sek Homogenisieren mittels Vortexer
 4. 15 min auf Eis inkubieren
 5. 2 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugieren und den Überstand entfernen
 6. 1 ml 0,1 M Natriumcitratlösung (mit 10 % Ethanol) hinzugeben, für 15 sek Homogenisieren mittels Vortexer und 30 min bei Raumtemperatur im Eppendorf Thermomixer inkubieren (alle 5 min mischen)
 7. 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugieren, Überstand entfernen
 8. Schritt 6 und 7 zweimal wiederholen
 9. 1,5 ml 75 %igen Ethanol hinzufügen, 15 sek Homogenisieren mittels Vortexer und 20 min bei Raumtemperatur im Eppendorf Thermomixer inkubieren (alle 5 min mischen)
 10. 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugieren und den Überstand vollständig entfernen
 11. 15 min lufttrocknen

Anlagen

12. 100 μ l 8 mM Natriumhydroxidlösung (NaOH) und lange vortexen (Restmembran soll sich auflösen)
13. 10 min bei 14.000 rpm und Raumtemp. Zentrifugieren und den Überstand in 1,5 ml Eppendorf Tube geben
14. 12 μ l 0,1 M HEPES Lösung und 1,1 μ l 0,1 M EDTA Lösung hinzugeben
15. DNA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

Anl. 2: Bisulfitmodifikation mit dem Cell-to-CpG Bisulfite Conversion Kit 50

Vorbereitung

- als Kontrollprobe dienen Jurkat-Zellen (DNA)
- Herstellen der Pufferlösungen für neue Kits:
 - Binding Buffer + 14 ml 100 % Isopropanol
 - Wash Buffer + 44 ml 100 % Ethanol
 - Desulfonation Reagent + 10 ml 100 % Ethanol
- Unmittelbar vor der Reaktion zur Herstellung des Conversion Reagent werden
 - 26 µl Denaturation Reagent + 800 µl Wasser in ein Conversion Reagent Tube gemischt und
 - 50 µl Conversion Buffer für 12 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert und gelegentlich mit Vortexer gemischt (die Lösung sollte ganz klar sein).

Denaturieren der DNA

- 500 ng der DNA werden in 45 µl RNase-freies Wasser gegeben und 5 µl Denaturation Reagent
- hinzugefügt
- die Mischung bei 50 °C für 10 min im Thermomixer inkubieren

Bisulfitkonversion

- zur Umwandlung von Cytosinen zu Uracil in der denaturierten DNA
 - 100 µl Conversion Reagent werden hinzugefügt und anschließend in einem Thermocycler wie folgt inkubiert

30 min	65 °C
90 sek	95 °C
30 min	65 °C
90 sek	95 °C
30 min	65 °C
danach	4 °C

Desulfonierung und Aufreinigung der DNA

1. Binding Column 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, dann 600 µl Binding Buffer hinzufügen, anschließend 150 µl der Probe auf die Säule geben und durch Kippen mischen
2. 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, anschließend Durchfluss entfernen
3. 600 µl Wash Buffer zugeben
4. 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, anschließend Durchfluss entfernen
5. 200 µl Desulfonation Reagent zugeben
6. 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
7. 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, anschließend Durchfluss entfernen
8. 400 µl Wash Buffer zugeben
9. 2 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, anschließend Durchfluss entfernen
10. 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren, anschließend Durchfluss entfernen
11. Säule in ein neues Elution Tube überführen
12. 40 µl Elution Buffer für 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
13. 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren

Weiterverarbeitung der bisulfitkonvertierten DNA oder Lagerung bei -20 °C

Anl. 3: Quantitative Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung

- PC und Sequenzierer (PyroMark Q96 ID, Qiagen, Hilden, Ger) einschalten
- PC: Programm PyroMark/PyroMark Q96 starten
- Tools -> Preferences -> Test-Connection -> OK
- New Run -> MA-Code 002
- Heizblock auf 85 °C vorheizen

Vorbereitung der Sequenzierung

1. Pyromark Gold Q96 Reagent (Qiagen, Hilden, Ger) dem Kühlschrank entnehmen
2. Enzym und Substrat
 - a) mit je 620 µl Chromatografiewasser ansetzen, mischen
 - b) 10 min bei Raumtemperatur lösen
 - c) je 100 µl in kleinen Tubes erstellen (Bezeichnung z.B. Substrat und Datum)
 - d) bei -20 °C lagern, vor Gebrauch sanft auftauen
3. PCR-Platte (Immobilisierung der PCR Produkte)
 - a) Streptavidin Sepharose HP* (Beads) (Merck, Darmstadt, Ger) gut schütteln
 - b) Mastermix 1 mischen:

Mastermix 1	x1	z. B. x10
Beads	5 µl	50 µl
PyroMark Binding Buffer (BB)	40 µl	400 µl
PCR Produkt	35 µl	350 µl
Total	80 µl	800 µl
 - c) Mastermix 1 in PCR-Platte pipettieren: Beads und BB, Proben hinzufügen; Wasser für Negativkontrolle
 - d) Platte mit Alufolie umwickeln
 - e) 15 min bei 1400 rpm schütteln
 - f) Während der Immobilisierung der PCR Produkte PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen, Hilden, Ger) vorbereiten
4. Vorbereiten der Sequenzierplatte
 - a) Mastermix 2 für jedes Gen einzeln ansetzen

Mastermix 2	x1	z. B. x6
Sequenzierprimer (20µM)	1,6 µl	9,6 µl
Annealingbuffer	38,4 µl	230,4 µl
Total	40 µl	240 µl
 - b) Mastermix 2 in Platte pipettieren

Vorbereitung der PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen, Hilden, Ger)

1. PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen, Hilden, Ger) auf eine gerade Fläche stellen
2. einen Schlauch vom geraden blauen Anschluss auf dem Deckel des liquid waste containers und der Vakuumpumpe verbinden
3. einen zweiten Schlauch vom gewinkelten blauen Anschluss auf dem Deckel des liquid waste containers mit dem Verbindungsstück der Rückseite der PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen, Hilden, Ger) verbinden
4. ein dritter Schlauch verbindet das Vacuum Prep Tool mit dem Vacuum tubing connector oben auf der PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen, Hilden, Ger)
5. Testplatte zur Überprüfung des Waschkopfes benutzen
6. Flüssigkeitsstand des Abfallbehälters überprüfen (bis zum Strich -> ins Waschbecken)
7. Testplatte mit Aqua dest füllen (Tropfpipette um Luftblasen zu entfernen)
8. links unten in die Arbeitsstation stellen
9. Vakuumpumpe anstellen, Vakuumschalter einschalten
10. Waschkopf in die Waschschale eintauchen
11. 2 mal durchspülen und danach immer senkrecht halten um das Absaugen zu erleichtern

Anlagen

12. Waschkopf waagrecht in die Testplatte eintauchen und leicht in den Wells bewegen
13. Waschkopf wieder hoch halten und anschließend Vakuum ausschalten
14. in Ausgangsstation zurücklegen

Arbeiten mit der PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen, Hilden, Ger)

1. 70 %iges Ethanol, Wash Buffer und 0,2 M NaOH aus dem Kühlschrank entnehmen und Wash Buffer mit Aqua dest verdünnen
2. Die Vertiefungen der Arbeitsstation wie folgt befüllen:

Waschkopf (mit 180 ml Aqua dest)	
90 ml NaOH	110 ml Aqua dest
110 ml Ethanol 70 %	110 ml Wash Buffer
PCR-Platte	Sequenzierplatte (PyroMark Plate)

3. Vakuum anstellen
4. Waschkopf horizontal in die PCR Platte tauchen und leicht bewegen (15 sek) (mittig arbeiten)
5. anschließend in Ethanol tauchen (15 sek) nicht bewegen (mittig arbeiten)
6. anschließend in NaOH tauchen (15 sek) nicht bewegen (mittig arbeiten)
7. in Wash Buffer tauchen (15 sek) nicht bewegen (mittig arbeiten)
8. Waschkopf hochhalten bis alle Flüssigkeit abgesaugt ist
9. in Sequenzierplatte überführen
 - a) darüber halten
 - b) Vakuum abstellen
 - c) Eintauchen, leicht bewegen, Waschkopf herausnehmen
10. Vakuum anstellen, dann in Aqua dest tauchen
11. Sequenzierplatte entnehmen, in Heizblock bei 85 °C für 2 min stellen
12. Waschkopf 3-4 mal mit Aqua dest waschen
13. Sequenzierplatte 10 min auskühlen lassen und Weiterverarbeitung im PyroMark Q96 ID (Qiagen, Hilden, Ger)

Durchführung der Sequenzierung

1. am PC
 - a) in der Plattenübersicht
 - i. auf Well klicken, Rechtsklick, Load Assay, Namen geben z.B. miR-137
 - ii. Beschriftung einfügen
 - b) RUN Note (oben), z.B. Test, Plate ID: Datum miR-137 bzw. LINE-1
 - c) Tools, Prevalences, Volume Information, Nukleotid und Substrat bzw. Enzymmenge
 - i. 15 – 20 % weniger bei Nukleotiden als vom PC angezeigt

2. Reagent Cartridge wie folgt befüllen:

	dGTP	
dCTP		dTTP
Substrate	dATPαS	Enzyme

3. Sequenzierer bestücken
 - a) Deckel anheben
 - b) oberen Hebel hochziehen, Reagent Cartridge mit Label nach vorne einfügen und schließen
 - c) unteren Hebel hochziehen, Plastikrahmen anheben, Sequenzierplatte hineingeben und alles verschließen
4. Start drücken, Name einfügen (identisch mit Platten ID)
5. Schalen auskippen und auswaschen