

**Untersuchungen zu medikamenteninduzierter Freisetzung extrazellulärer
Nukleinsäuren von in vitro kultivierten humanen Lungenkarzinomzellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Florian Rode
geboren am 02.08.1991 in Osnabrück
Betreuer: Prof. Dr. med. B. Schmidt
Gutachter: Prof. P. Michl
PD D. Dietrich (Bonn)

07.12.2021

04.07.2022

Referat

Extrazelluläre Nukleinsäuren gewinnen zunehmend an Bedeutung in der klinischen Verwendung beim Staging, der Therapieüberwachung und Prognosestellung von Tumorerkrankungen. Ihr ubiquitäres Vorkommen in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise im Blut, macht sie zu einem gut zugänglichen Biomarker. Epigenetische Veränderungen, wie zum Beispiel die Methylierung Tumor-assoziiertes Gene, lassen sich in extrazellulären Nukleinsäuren nachweisen. Untersuchungen dieser extrazellulären Nukleinsäuren dienen somit als vielversprechender neuer Ansatz in der Behandlung von Patienten mit Krebserkrankungen. Die Mechanismen der Freisetzung zellfreier DNA (cfDNA) sowie ein möglicher Zusammenhang zwischen Pharmakotherapie und epigenetischen Veränderungen sind bisher kaum untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es daher zu untersuchen, ob eine Pharmakotherapie Einfluss auf die Methylierung von cfDNA hat. Hierzu wurden drei humane Lungenkrebszelllinien (H1650, H1975 und H358) mit ausgewählten Medikamenten (Cisplatin, HCT, Ibuprofen und Prednisolon) behandelt. Die Proliferation wurde mittels Zellzählung quantifiziert, der prozentuale Anteil avitaler Zellen wurde durch eine FACS-Analyse bestimmt und der Methylierungsstatus der cfDNA ausgewählter Gene (SEPT9, SHOX2, PITX2 und CDO1) im Kulturüberstand wurde nach Bisulfit-Konversion mittels qPCR gemessen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass bei allen oben genannten Medikamenten über alle Zelllinien hinweg unterschiedliche Veränderungen der cfDNA-Methylierung der oben genannten Gene im Kulturüberstand auftreten. Es ergab sich kein einheitliches Muster. Es zeigten sich jedoch unter Cisplatin- und Prednisolon-Behandlung bei zwei Zelllinien (H1650, H1975) Trends hinsichtlich einer Veränderung der Methylierung des Gens SHOX2, was einen möglichen Zusammenhang zwischen der Methylierung von SHOX2 und der Behandlung mit diesen Medikamenten nahelegt. Die HCT-Behandlung hatte in den Experimenten keinen Einfluss auf die Methylierung von cfDNA, die durch die in vitro kultivierten Lungenkrebszellen freigesetzt wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es im Zeitverlauf der Zellkultivierung zu einer Zunahme der cfDNA-Konzentration im Überstand der kultivierten Zellen kam, insbesondere bei starker Wachstumshemmung. Es konnte hierbei jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der cfDNA-Konzentration im Überstand und dem Zelluntergang beobachtet werden. Neben dem Zelluntergang können demnach andere Mechanismen, wie möglicherweise eine aktive Freisetzung, zum Anstieg der cfDNA-Konzentration beitragen. Weitere Untersuchungen mit zusätzlichen Medikamenten und Zelllinien sowie mit einer größeren Anzahl biologischer Replikate sind notwendig um die hier gezeigten Tendenzen zu bestätigen.

Rode, Florian: Untersuchungen zu medikamenteninduzierter Freisetzung extrazellulärer Nukleinsäuren von in vitro kultivierten humanen Lungenkarzinomzellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 69 Seiten, 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Extrazelluläre Nukleinsäuren und zellfreie DNA.....	1
1.2	Epigenetische Veränderungen	4
1.2.1	Untersuchte Biomarker.....	6
1.2.2	Methoden zur Detektion der DNA-Methylierung	7
2	Zielstellung.....	9
3	Material und Methodik.....	10
3.1	Zelllinien und Medikamente	10
3.2	Zellkultur.....	11
3.2.1	Kultivierung	11
3.2.2	Kultivierung während des Experiments	12
3.2.3	Überstandgewinnung	12
3.2.4	Zellzählung.....	12
3.3	Fluorescence-activated-cell-sorting (FACS)	13
3.3.1	Annexin-V FITC/Propidiumiodid-Protokoll	13
3.4	DNA-Methylierung	13
3.4.1	Isolation der cfDNA	13
3.4.2	Bisulfit-Konversion	13
3.4.3	Quantitative PCR	14
4	Ergebnisse	19
4.1	Wachstumskurven.....	19
4.1.1	Cisplatin-Behandlung	19
4.1.2	HCT-Behandlung	20
4.1.3	Ibuprofen-Behandlung.....	20
4.1.4	Prednisolon-Behandlung	20
4.2	Apoptose-Messung	20
4.2.1	Cisplatin-Behandlung	20
4.2.2	HCT-Behandlung	21

4.2.3	Ibuprofen-Behandlung.....	21
4.2.4	Prednisolon-Behandlung.....	21
4.3	Zellfreie DNA-Quantifizierung.....	25
4.4	Einfluss der Medikamentenbehandlung und des Zellunterganges auf die Methylierung der cfDNA im Überstand.....	27
4.4.1	Cisplatin-Behandlung der Zelllinie H1650.....	28
4.4.2	Cisplatin-Behandlung der Zelllinie H1975.....	28
4.4.3	Cisplatin-Behandlung der Zelllinie H358.....	30
4.4.4	HCT-Behandlung der Zelllinie H1650.....	33
4.4.5	HCT-Behandlung der Zelllinie H1975.....	33
4.4.6	HCT-Behandlung der Zelllinie H358.....	34
4.4.7	Ibuprofen-Behandlung der Zelllinie H1975.....	37
4.4.8	Ibuprofen-Behandlung der Zelllinie H358.....	37
4.4.9	Prednisolon-Behandlung der Zelllinie H1650.....	40
4.4.10	Prednisolon-Behandlung der Zelllinie H1975.....	41
4.4.11	Prednisolon-Behandlung der Zelllinie H358.....	43
5	Diskussion.....	46
5.1	Proliferation und Zelluntergang.....	46
5.2	cfDNA im Überstand.....	48
5.3	Einfluss der Medikamentenbehandlung und des Zellunterganges auf die Methylierung cfDNA der untersuchten Gene.....	49
5.3.1	Methylierung von SHOX2.....	51
5.3.2	Methylierung von SEPT9.....	52
5.3.3	Methylierung von PITX2.....	53
5.3.4	Methylierung von CDO1.....	54
6	Zusammenfassung.....	56
7	Literaturverzeichnis.....	58
8	Thesen.....	69

9	Selbstständigkeitserklärung.....	V
10	Erklärung über frühere Promotionsversuche	VI
11	Danksagung.....	VII

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ACTB	Actin beta
bp	Basenpaare
CDO1	Cysteine dioxygenase 1
cfDNA	Zellfreie DNA
cfRNA	Zellfreie RNA
Ct	Threshold cycle
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferasen
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMV	Extrazelluläre Membranvesikel
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorting
FCS	Fötale bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
HCT	Hydrochlorothiazid
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NSAID	Non-steroidal-anti-inflammatory-drugs
NSCLC	Non small-cell-lung-cancer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
PITX2	Paired-like homeodomain transcription factor 2
PME	Polymer-mediated-enrichment
PMR	Percentage of methylated reference
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonucleic acid
SAM	S-Adenosylmethionin
SCLC	Small-cell-lung-cancer
SEPT9	Septin 9
SHOX2	Short stature homeobox 2
Std.-Abw.	Standardabweichung
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitoren

1 Einleitung

Lungenkrebs zählt zu den häufigsten Krebs-bedingten Todesursachen in Deutschland, bei Männern ist es die häufigste, bei Frauen die zweithäufigste Krebstodesursache (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). 2016; Statistisches Bundesamt 2020). Obwohl low-dose Computertomographie-Untersuchungen zur Früherkennung von Lungenkrebs nachweislich die Mortalität reduzieren konnten, wie es im National Lung Screening Trial gezeigt wurde, werden durch viele falsch-positive Ergebnisse Patienten mit benignen Lungenerkrankungen unnötig invasiver Diagnostik und Therapie unterzogen (Leng et al. 2018). Lungenkrebs wird unter anderem aufgrund des zunächst asymptomatischen Verlaufs in der herkömmlichen Diagnostik bei vielen Patienten erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert (Nasim et al. 2019). Daher ist es von großer Bedeutung, ergänzende Möglichkeiten wie zum Beispiel Biomarker zur zuverlässigen frühzeitigen Diagnosestellung zu entwickeln.

Der Begriff extrazelluläre Nukleinsäuren beschreibt das Vorkommen von Nukleinsäuren – DNA oder RNA – in zellfreier Umgebung, wie zum Beispiel in humanem Blutplasma, Serum, in anderen Körperflüssigkeiten oder auch in Überständen von in vitro kultivierten Zellen. Im klinischen Alltag kann Probenmaterial wie beispielsweise Blut, Liquor, Bronchiallavage, Sputum, Urin oder Stuhl sehr einfach gewonnen werden („liquid biopsy“) und folglich die darin enthaltenen extrazellulären Nukleinsäuren untersucht werden (Abb. 1). Beobachtungen, dass Tumorzellen genau wie gesunde Zellen Nukleinsäuren in die Zirkulation freisetzen, lassen die Vermutung zu, dass extrazelluläre Nukleinsäuren annähernd ein Abbild aller physiologischen und pathologischen Prozesse im Körper geben könnten. Diese Eigenschaft macht sie zu einem interessanten Objekt für die zukünftige Entwicklung von Biomarkern (Fleischhacker und Schmidt 2007).

Um die Erkenntnisse der Forschung besser in die klinische Praxis umzusetzen und somit das immense Potential zu nutzen, das extrazelluläre Nukleinsäuren als Biomarker bieten, ist es notwendig, Bildung, Freisetzung und Regulation extrazellulärer Nukleinsäuren zu verstehen (Bronkhorst et al. 2016; Grabuschnig et al. 2020).

1.1 Extrazelluläre Nukleinsäuren und zellfreie DNA

Schon Anfang der 1970er-Jahre beobachteten Stroun und Anker die Freisetzung eines Komplexes aus extrazellulären Nukleinsäuren aus in vitro kultivierten Froschherzzellen. Sie konnten nach wenigen Tagen Kultivierung der Zellen DNA im Überstand nachweisen. Diese schien weder von Bakterien noch von geschädigten Zellen zu kommen und war mit Froschherz-RNA hybridisierbar (Stroun und Anker 1971). Auch bei in vitro kultivierten humanen Zellen (Lymphozyten) zeigten sich extrazelluläre Nukleinsäuren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Freisetzung der zellfreien DNA (cfDNA) ein aktiv-

regulatorischer Mechanismus zugrunde liegen müsse, der unabhängig von der Inkubationszeit der Zellen oder der Zelltodesrate gewesen war, da sich nach einer bestimmten Zeit eine Maximalkonzentration an cfDNA einstellte. Zellen, die nach Zentrifugation in ihr vorheriges Medium zurückgegeben wurden, zeigten eine unveränderte Konzentration der cfDNA im Medium, wohingegen Zellen, die nach Zentrifugation in neuem Medium kultiviert wurden, einen erneuten Anstieg der Konzentration bewirkten (Anker et al. 1975).

Anker et al. untersuchten cfDNA im Blutplasma von Krebspatienten und brachten diese mit Malignomen in Zusammenhang. Sie charakterisierten die cfDNA als Doppelstrang DNA, RNase und Pronase resistent, aber DNase sensibel und vorrangig auftretend mit geringem molekularem Gewicht. Anhand eines Tests für verminderte DNA-Strang-Stabilität wurde nachgewiesen, dass zumindest ein Teil der cfDNA aus Tumorzellen stammte (Stroun et al. 1987; Stroun et al. 1989). Zudem wurde postuliert, dass extrazelluläre Nukleinsäuren allem Anschein nach nicht „frei“ ausgeschleust werden, sondern als Komplexe mit Proteolipiden oder mit dem p53-Protein. Desweiteren können sie in extrazelluläre Vesikel eingebettet sein oder auch an Zellmembranen gebunden vorkommen (Wieczorek et al. 1985; Kawamura et al. 1999; Tamkovich et al. 2005; Contreras-Naranjo et al. 2017).

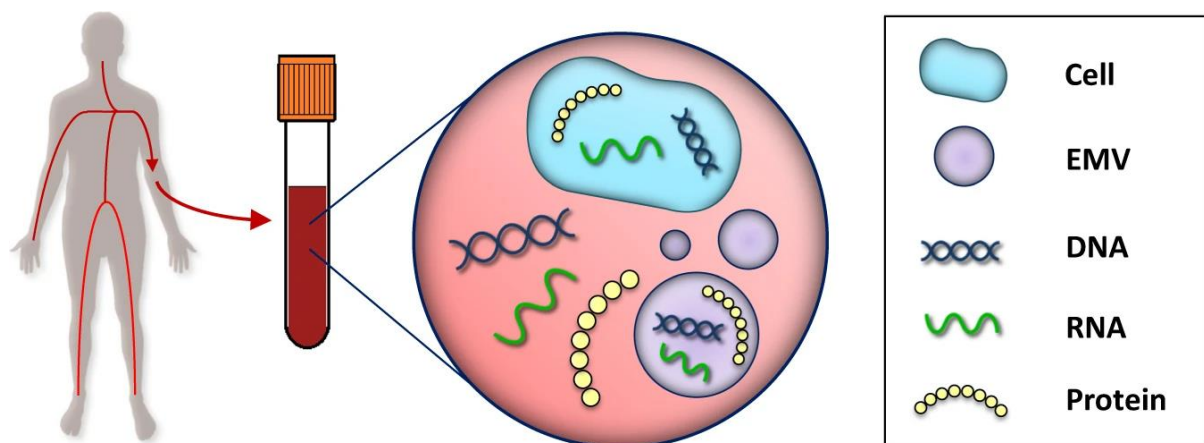


Abb. 1: Prinzip der „liquid biopsy“. In verschiedenen Körperflüssigkeiten, zum Beispiel im Blut, können extrazelluläre Nukleinsäuren nachgewiesen werden: Extrazelluläre Membranvesikel (EMV), cfDNA und cfRNA. (Pös et al. 2018).

Im Hinblick auf die Quantität der extrazellulären Nukleinsäuren wurde beschrieben, dass bei Tumorpatienten die Menge an cfDNA im Plasma höher ist als bei gesunden Individuen (Sozzi et al. 2003). Hinsichtlich der Konzentration der cfDNA und der Tumorgröße, Tumorstadium oder Tumorlokalisation konnten andere Gruppen keine Korrelation beobachten. Auch wenn gesunde Individuen häufig niedrigere cfDNA-Konzentrationen im Vergleich zu Tumorpatienten aufweisen, scheint es eine Überschneidung zu geben, denn erhöhte cfDNA-Konzentrationen wurden auch bei Patienten mit Präkanzerosen, Entzündungsreaktionen, nach Trauma,

sportlicher Überlastung oder bei chronischer Erkrankung älterer Patienten beobachtet (Fleischhacker und Schmidt 2007).

Die Konzentration an cfDNA im Verlauf einiger Tage kann bei gesunden Probanden, während einer Schwangerschaft (Zhong et al. 2000) oder auch einer Tumorerkrankung (Stroun et al. 1989) schwanken, daher scheint die alleinige quantitative Bestimmung der cfDNA zu einem gegebenen Zeitpunkt nicht geeignet, Tumorpatienten von gesunden Patienten zu unterscheiden. Die Kinetik der cfDNA-Konzentration mit zusätzlicher Berücksichtigung genetischer Marker scheint jedoch spezifischer mit Tumorprogress oder Therapieerfolg bei Tumorpatienten zu korrelieren (Sozzi et al. 2001).

Es gibt mindestens drei verschiedene Mechanismen, die für die Freisetzung der extrazellulären Nukleinsäuren verantwortlich gemacht werden: aktive Freisetzung, Apoptose und Nekrose. cfDNA kann sowohl von normalen Zellen als auch von Tumorzellen stammen, wobei es große Unterschiede bezüglich der Fraktion der Tumor-cfDNA an der Gesamt-cfDNA im Blutplasma geben kann (Jahr et al. 2001; Fleischhacker und Schmidt 2007). Während häufig sterbende und tote Zellen als Hauptquelle von cfDNA angenommen werden, sind die genauen Mechanismen der Freisetzung nicht im Detail geklärt (Choi et al. 2004). In der Literatur gibt es zum Teil widersprüchliche Publikationen, die einen der oben genannten Ursprünge favorisieren. So wird vermutet, dass vor allem die aktive Freisetzung und Apoptose einer der wesentlichen Ursprünge für cfDNA ist (Stroun et al. 2001a; Stroun et al. 2001b). In einer Studie an Hämodialyse-Patienten mit Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) wurde beobachtet, dass die cfDNA im Plasma der Patienten in der Gelelektrophorese eine Apoptose-charakteristische Leiterstruktur aufwies, was vor allem Apoptose als den Ursprung der cfDNA als wahrscheinlich erscheinen ließ (Rumore et al. 1992). Andere Untersuchungen zeigten in vitro einen Unterschied in der cfDNA-Freisetzung zwischen Apoptose- und Nekrose-induzierten Zellen. Während apoptotische Zellen einen signifikanten Anstieg der cfDNA-Freisetzung zeigten, konnte dies bei nekrotischen Zellen nicht gezeigt werden (Choi et al. 2004). Im Gegensatz dazu beobachteten Jahr et. al in vitro und im Tiermodell, dass sowohl Apoptose-induzierte Zellen als auch Nekrose-induzierte Zellen cfDNA freisetzen können und schlussfolgerten, dass die cfDNA sowohl aus apoptotischen als auch nekrotischen Zellen stammen könne und einen Großteil der Quelle von cfDNA darstelle (Jahr et al. 2001).

Die Frage nach der Funktion extrazellulärer Nukleinsäuren ist bis heute nicht im Detail geklärt (Grabuschnig et al. 2020). Zu extrazellulären Nukleinsäuren werden nukleäre und mitochondriale DNA sowie verschiedene Arten von RNA-Molekülen gezählt (Pös et al. 2018; Bronkhorst et al. 2021). Es wird vermutet, dass extrazelluläre Nukleinsäuren unter anderem beim Informationsaustausch zwischen Lymphozyten eine Rolle spielen, da gezeigt wurde, wie isolierte Überstände von Virus-exponierten T-Lymphozyten, die anschließend mit B-Zellen inkubiert wurden, eine Virus-spezifische Antikörperreaktion der B-Zellen hervorriefen (Anker

et al. 1980). Gleichermaßen wurde postuliert, dass ausgeschleuste DNA-Komplexe auch als „genetischer Informationsträger“ zwischen anderen Zellen fungieren könnten, da man zeigen konnte, dass Mäuse-Milzzellen, die mit Tumorzellmedium inkubiert wurden, das [³H]-markiertes Thymidin enthielt, vermehrt [³H]-Thymidin in ihr Zytosol aufnahmen und ins Genom einbauten. Die Tatsache, dass andersherum Tumorzellen, die im Medium normaler Zellen inkubiert wurden, weniger dieser cfDNA-Komplexe ins Genom einbauten, führte zur Schlussfolgerung, dass es eine Konkurrenz um die Aufnahme der cfDNA geben müsse, je nachdem, ob sie aus Tumor oder nicht-Tumorzellen stammte (Adams et al. 1997). In einer Arbeit von García-Olmo et al. wurde zunächst anhand eines Experiments im Tiermodell mit tumortragenden Ratten vermutet, dass im Plasma befindliche cfDNA aus Tumorzellen früher nachzuweisen sei als zirkulierende Tumorzellen selbst. Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine hämatogene Metastasierung möglicherweise eher mit zellfreier TumordNA assoziiert sei als mit zirkulierenden Tumorzellen selbst (García-Olmo et al. 2005; García-Olmo et al. 2006).

1.2 Epigenetische Veränderungen

Wie bei genomischer DNA wurden auch bei cfDNA Modifikationen nachgewiesen. Neben genetischen Veränderungen wie Punktmutationen, Deletionen, Duplikation und Inversion treten auch hier epigenetische Veränderungen wie beispielsweise DNA-Methylierung auf (Fleischhacker und Schmidt 2007). Diese werden neben genetischen Veränderungen als ein wesentlicher Pathomechanismus in der Entwicklung von Tumoren angesehen (Risch und Plass 2008; Taby und Issa 2010). Als Epigenetik bezeichnet man jede meiotische oder mitotische Veränderung der Genexpression, die nicht auf der Nukleotidsequenz der DNA basiert (Egger et al. 2004). Physiologische Zelldifferenzierung ist ein Beispiel dafür: Trotz eines identischen genetischen Codes können sich verschiedene Zelltypen entwickeln (Taby und Issa 2010). Gewissermaßen stellt die Epigenetik damit eine Verbindung zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp dar, da durch epigenetische Veränderungen das Produkt eines Genlokus verändert werden kann, ohne die zugrunde liegende DNA-Sequenz zu verändern. Zu diesen Mechanismen zählen DNA-Methylierung, Histonmodifikation und posttranslationale Genregulation durch nicht-kodierende RNAs (Korkmaz et al. 2011). Im Folgenden wird sich auf die DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus beschränkt.

DNA-Methylierung bezeichnet eine kovalente Verknüpfung einer Methylgruppe an das C5'-Atom eines Cytosinrestes in der DNA (Abb. 2). Der Großteil der Methylierung im Säugetier-Genom findet an CG-Paaren statt (Inbar-Feigenberg et al. 2013). Diese CG-Paare (auch CpG-Dinukleotide (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) genannt) sind Basenabfolgen in der DNA-Sequenz, bei der in 5'-3' Richtung auf ein Cytosin- ein Guaninrest folgt (Korkmaz et al. 2011).

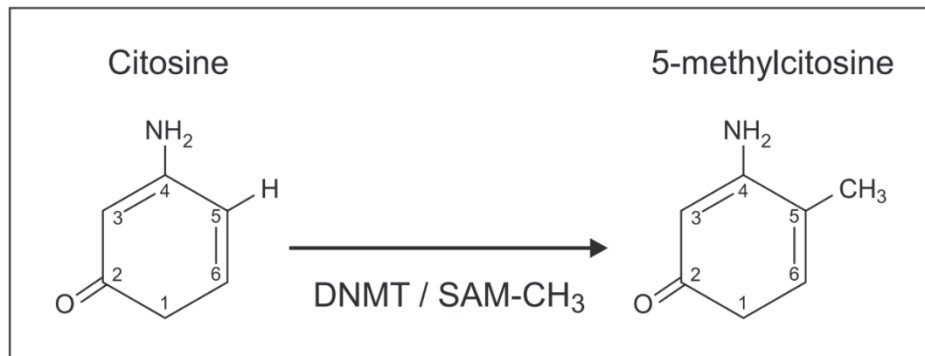


Abb. 2: Mechanismus der DNA-Methylierung. Katalysiert durch DNA-Methyltransferasen (DNMT 1, 3a oder 3b) wird eine Methylgruppe (CH₃) eines S-Adenosylmethionin (SAM) auf das C5'-Atom eines Cytosinmoleküls transferiert (Lehrbach et al. 2003).

CG-Paare sind im gesamten Genom verteilt, sie kommen aber besonders häufig in Promotorregionen von transkribierten Genen vor und werden dann als CpG-Inseln bezeichnet. Hypermethylierung dieser CpG-Inseln innerhalb eines Promotors führt letztlich zur Inaktivierung des Gens durch Inhibierung der Bindung von Transkriptionsfaktoren, während Hypomethylierung typischerweise mit einer Aktivierung von Genen assoziiert ist (Taby und Issa 2010; Korkmaz et al. 2011). In normalen Zellen sichert der Methylierungsstatus eine dem Metabolismus der Zelle angepasste Regulation der Genexpression sowie eine stabile Geninaktivierung, wie sie zum Beispiel bei der Inaktivierung des weiblichen X-Chromosoms oder auch beim Genimprinting notwendig ist. Es wird allgemein angenommen, dass Hypermethylierung der Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen zu ihrer Inaktivierung führt. In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Inaktivierung vieler unterschiedlicher Gene durch veränderte DNA-Methylierung bei unterschiedlichen Krebsarten vorkommt (Kulis und Esteller 2010).

Veränderungen des Methylierungsstatus kommen in Tumorzellen ubiquitär vor. Es wurde gezeigt, dass Tumorzellen generell überwiegend hypomethyliert, aber promotorspezifisch hypermethyliert sind (Taby und Issa 2010). Dennoch hat dabei nicht jedes aberrant methylierte Gen zwingend Einfluss auf die Tumorgenese. Vielmehr sind einige Gene nur deshalb inaktiviert, weil sie in der Nähe eines langen epigenetisch inaktivierten Genabschnittes liegen. Auch aberrante Methylierungsmuster eben dieser Gene, die in verschiedenen Tumorentitäten vorkommen, können als Biomarker herangezogen werden (Fleischhacker et al. 2013). Bei der Untersuchung des Methylierungsniveaus in Tumorgewebe von Patienten mit adenosquamösen Bronchialkarzinomen wurden zahlreiche hypermethylierte CpG-Inseln gefunden. Dabei wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die bei Patienten mit diesen Bronchialkarzinomen in 80-100% der Fälle hypermethyliert sind, in normalem Lungengewebe jedoch nahezu keine Methylierung zeigen. Derartige methylierte Marker stellen im Hinblick auf die zukünftige klinische Anwendung eine ideale Möglichkeit zur Früherkennung und

Therapieüberwachung dar (Rauch et al. 2008). Ein konkretes Beispiel hierfür ist das Gen SHOX2 (short stature homeobox 2): Dieses Gen liegt innerhalb des Genlokus 3q25. Eine Hypermethylierung von SHOX2 korreliert hochsignifikant mit der Amplifikation dieses Genlokus (Schneider et al. 2011). Diese Amplifikation wiederum wurde als eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen bei Lungenkrebs beschrieben (Yen et al. 2007; Dehan et al. 2007; Qian und Massion 2008; Shen et al. 2009; Huang et al. 2009). Damit eignet sich die Methylierung von SHOX2 als potentieller Biomarker bei Lungenkrebs (Kneip et al. 2011).

1.2.1 Untersuchte Biomarker

SHOX2

Das humane homöotische Gen (Hox-Gen) short stature homeobox 2 (SHOX2) befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 3 (3q25-q26.1) und wird in mindestens zwei verschiedenen Isoformen transkribiert (Blaschke et al. 1998). Hox-Gene kodieren für homöotische Proteine, die meist im C-terminalen Bereich eine DNA-bindende Domäne enthalten (Heinrich et al. 2014), mit der sie die Transkription einer Vielzahl von Genen regulieren. SHOX2 spielt eine Rolle in der Regulation des Chondrozytenwachstums und damit in der Skelettreifung, außerdem in der Entwicklung des Nervensystems und des Herzens (Blaschke et al. 1998). SHOX2 wird unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Geweben exprimiert, wie auch unter pathologischen Bedingungen in unterschiedlichen Tumoren (zum Beispiel im Neuroblastom, Mamma- oder Bronchialkarzinom) (Schmidt et al. 2010). Kürzlich durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass methylierte SHOX2 Plasma-DNA für die Diagnostik und die Therapieüberwachung von Bronchialkarzinomen einen wertvollen Biomarker darstellen könnte (Kneip et al. 2011; Dietrich et al. 2012b; Schmidt et al. 2015).

SEPT9

Das Gen Septin 9 (SEPT9) kodiert für ein GTP-bindendes Protein, das zur Septin-Familie gehört. Proteine dieser Familie sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie der Zellteilung, der Organisation des Zytoskeletts oder dem Membran-Remodelling (Weirich et al. 2008; Behrouz Sharif et al. 2016). Obwohl die molekulare Funktion von SEPT9 bei Tumoren nicht abschließend geklärt ist, wird eine Beteiligung von SEPT9 bei verschiedenen Tumoren vermutet (zum Beispiel bei Leukämie, Brust-, Ovarial- und Hirntumoren) (Behrouz Sharif et al. 2016). Weiterhin ist aberrant methylierte SEPT9 DNA mit dem Kolorektal- und Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich assoziiert. Vor allem beim Kolorektalkarzinom gilt methylierte SEPT9 DNA als ein vielversprechender Biomarker (deVos et al. 2009; Church et al. 2014; Bergheim et al. 2018).

PITX2

PITX2 (paired-like homeodomain transcription factor 2) gehört ebenfalls wie SHOX2 zur Familie der Hox-Gene. Als Transkriptionsfaktor hat PITX2 für die Regulierung der Genexpression in der Frühentwicklung des Embryos eine Bedeutung. Besonders bei der Differenzierung verschiedener Organe wie Lunge, Herz, Hypophyse, Zähne und Augen ist PITX2 involviert (Lin et al. 1999; Berry et al. 2006). Die terminale Differenzierung der somatotropen und laktotropen Zellen der Hypophyse und auch die basale und Hormon-gesteuerte Prolaktinausschüttung werden durch das von PITX2 kodierte Protein gesteuert. Bei einer autosomal-dominanten Erkrankung der Augen, dem Rieger-Syndrom, sind Mutationen im PITX2 Gen beschrieben. Methylierte PITX2 DNA korreliert bei Tumoren der Brust, Prostata, Lunge, beim Kolorektalkarzinom oder auch beim Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich mit der Prognose (Dietrich et al. 2012a; Sailer et al. 2017; Aubele et al. 2017).

CDO1

Cysteine dioxygenase 1 (CDO1) ist ein Enzym, das sowohl im Cytosin-Katabolismus (Joseph und Maroney 2007) als auch in der Taurin-Biosynthese (Satsu et al. 2003) involviert ist und wird als ein potentiell Tumorsuppressorgen angesehen (Meller et al. 2016). Eine Hypermethylierung in der Promotorregion von CDO1 zeigte bei Brustkrebs eine Korrelation zum Krankheitsprogress unter Anthrazyklin-Therapie. Sie trägt vermutlich zur Entstehung von Anthrazyklin-resistenten Brustkrebszellen bei (Dietrich et al. 2010; Jeschke et al. 2013). Auch bei primären Brustkrebspatienten zeigt sich ein prognostischer Wert des Methylierungsniveaus von CDO1 (Minatani et al. 2016), ebenso wie bei Nierenzellkarzinomen. Weitere solide Tumoren, bei denen eine Hypermethylierung der CDO1 Promotorregion beschrieben wurde, sind das Ösophagus-, Harnblasen- und Magenkarzinom sowie das cholangiozelluläre und Kolorektalkarzinom (Meller et al. 2016).

1.2.2 Methoden zur Detektion der DNA-Methylierung

In den letzten Jahrzehnten gab es wesentliche Weiterentwicklungen, Methylierungsmuster zu erfassen. War es früher zunächst nur möglich genspezifisch Methylierung zu erfassen, so ist es heute genomweit möglich.

Um isolierte DNA aus unterschiedlichsten Proben auf die DNA-Methylierung zu untersuchen, gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Methoden. Zu den drei häufigsten zählen der Restriktionsverdau mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen, die Affinitätsaufreinigung von methylierter DNA und die Bisulfit-Konversion von DNA (Han und Garcia 2013).

1.2.2.1 Bisulfit-Konversion und quantitative PCR

Heutzutage wird zumeist die Bisulfit-Konversion mit anschließenden PCR (polymerase chain reaction) -basierten Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung herangezogen (Paska und Hudler 2015). Bei der Bisulfit-Konversion handelt es sich um eine chemische Veränderung der DNA, die die epigenetische Information der Methylierung in eine detektierbare Veränderung der Nukleotidsequenz umschreibt (Abb. 3). Hierbei werden unmethylierte Cytosin- zu Uracilresten deaminiert, wobei lediglich methylierte Cytosinreste unverändert bleiben. Die aufgrund der Bisulfit-Konversion resultierende veränderte Gensequenz kann durch molekularbiologische Methoden wie zum Beispiel der quantitativen polymerase chain reaction (qPCR) analysiert werden: Hier binden verschiedene Primer spezifisch jeweils an Bisulfit-konvertierte methylierte DNA oder an unmethylierte DNA und führen so zur spezifischen Amplifikation. Hierüber kann man Informationen über den Methylierungsstatus einer beliebigen Gensequenz erhalten (Herman et al. 1996).

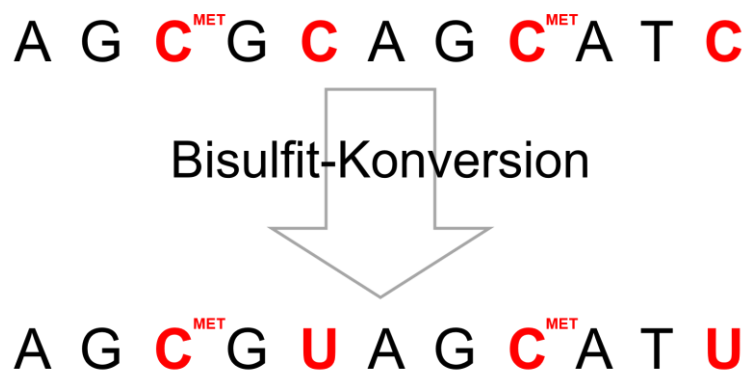


Abb. 3: Auswirkung der Bisulfit-Behandlung. Nicht methylierte Cytosinbasen können in Anwesenheit von Bisulfit zu Uracil deaminiert werden, wohingegen methylierte Cytosinbasen („MET“) unverändert bleiben.

Mit der qPCR ist eine genaue und reproduzierbare Messung der Ausgangsmenge eines Zielgens in einer gegebenen Probe möglich. In der exponentiellen Phase der PCR besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Ausgangsmenge an DNA und dem PCR-Zyklus, an dem sich das „reporter“-Signal signifikant vom Hintergrundsignal abhebt, dem sogenannten „threshold cycle“ (Ct). Erstellt man nun eine Standardkurve, bei der bekannte Mengen eines Zielgens eingesetzt werden, so kann man bei einem bestimmten Ct einer Probe auf die enthaltene Menge des Zielgens schließen (Irvine und Hsieh 2004).

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, herauszufinden, ob Medikamente als einer von vielen äußeren Faktoren Einfluss auf die von Körper- bzw. Tumorzellen freigesetzte extrazelluläre DNA nehmen können.

Wie in einer Pilotstudie gezeigt wurde (Schmidt et al. 2015), kann der Methylierungsstatus eines Biomarkers das Ansprechen einer Chemotherapie bei Patienten mit Bronchialkarzinomen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorhersagen. Aber sind diese Veränderungen des Methylierungsstatus ein direktes Resultat der erfolgreichen Therapie und des Absterbens von Tumorzellen? Oder könnten Veränderungen der Methylierung auch durch Pharmakotherapie von begleitenden Komorbiditäten entstehen? Können Medikamente wie Chemotherapeutika (zum Beispiel Cisplatin) oder andere Medikamente der alltäglichen Pharmakotherapie, zum Beispiel zur Linderung starker Übelkeit bei Tumorpatienten (zum Beispiel Prednisolon) oder Schmerzen (zum Beispiel Ibuprofen) oder zur Therapie der arteriellen Hypertonie (zum Beispiel Hydrochlorothiazid (HCT)), Veränderungen des Methylierungsstatus von cfDNA bestimmter Gene bewirken?

Diese Arbeit soll medikamentöse Einflüsse auf die Freisetzung und den Methylierungsstatus von cfDNA in einem in vitro Modell untersuchen. Die Analyse des Methylierungsstatus der cfDNA erfolgt hierbei unter Zuhilfenahme verschiedener Bronchialkarzinom-Zelllinien (H1650, H1975, H358) und anhand vier ausgewählter Gene, die als potentielle Biomarker für verschiedene Tumorerkrankungen identifiziert wurden: SEPT9, SHOX2, PITX2 und CDO1. Die verwendeten vier Medikamente sind Cisplatin, Prednisolon, Ibuprofen, und HCT.

3 Material und Methodik

3.1 Zelllinien und Medikamente

Die Experimente wurden mithilfe von drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt (Tab. 1). Es handelt sich dabei um Zellen aus Bronchialkarzinomen: H1650, H1975 und H358 (ATCC 2021a, 2021b, 2021c).

Tab. 1: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Charakteristika
H1650	Lungenepithel-Zellen: Adeno- und Bronchoalveoläres Karzinom; männlich, Raucher
H1975	Lungenepithel-Zellen: Adenokarzinom, NSCLC; weiblich, nicht-Raucher
H358	Lungenepithel-Zellen: Bronchoalveoläres Karzinom, NSCLC; männlich, Raucher-Status unbekannt

Die verwendeten Medikamente in dieser Arbeit sind Prednisolonacetat, Ibuprofen, HCT und Cisplatin. Die eingesetzten Konzentrationen der Medikamente in den in vitro Versuchen orientierten sich an den Plasmazielkonzentrationen, die im klinischen Gebrauch angestrebt werden. Um jedoch die möglicherweise geringen Effekte der Medikamente auf die cfDNA zu verstärken, wurde (mit Ausnahme der Cisplatin-Behandlung) das 10-fache der Plasmazielkonzentrationen zur Behandlung der Zellen verwendet. Im Fall von Cisplatin war dies aufgrund einer zu starken zytotoxischen Wirkung nicht möglich. Die Konzentration des Chemotherapeutikums wurde auf ein Maß reduziert, das ausreichende Proliferation ermöglichte, aber dennoch zytotoxische Effekte auf die Zellproliferation zeigte. Entsprechend des jeweiligen Lösungsverhaltens der Medikamente wurden Lösungsmittel in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Als Lösungsmittelkontrollen wurden dieselben Konzentrationen des reinen Lösungsmittels verwendet, die für die Lösung des Medikamentes benötigt wurden (Tab. 2). Des Weiteren wurde eine (Negativ-)Kontrolle (ohne Medikament und ohne Lösungsmittel) mitgeführt.

Tab. 2: Eingesetzte Medikamente- und Lösungsmittelkonzentrationen im Überblick.

Medikament	Lösungsmittel	Löslichkeit in 96%-Ethanol (EtOH)	Plasmazielkonzentration	Konzentration im Versuch
Prednisolonacetat	96%-Ethanol	1 mg/ml EtOH	0,024 mg / l	0,24 mg / l (=10x)
Ibuprofen	96%-Ethanol	25 mg/ml EtOH	15,0 – 30 mg / l	150,00 mg / l (=10x)
HCT	96%-Ethanol	1 mg/ml EtOH	0,1 mg / l	1,00 mg / l (=10x)
Cisplatin	0,9% NaCl	-	1 mg / l	0,10 mg / l (=0,1x)

3.2 Zellkultur

Für das Experiment wurde je Zelllinie eine definierte Zahl von Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und 7 Tage inkubiert. Drei Tage nach dem Aussäen erfolgte im Rahmen eines Mediumwechsels die Zugabe des jeweiligen Medikamentes. Die Überstände wurden dann nach Inkubationszeiten von 24, 72 und 96 h gewonnen. Diese waren Grundlage der weiteren Analyse. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

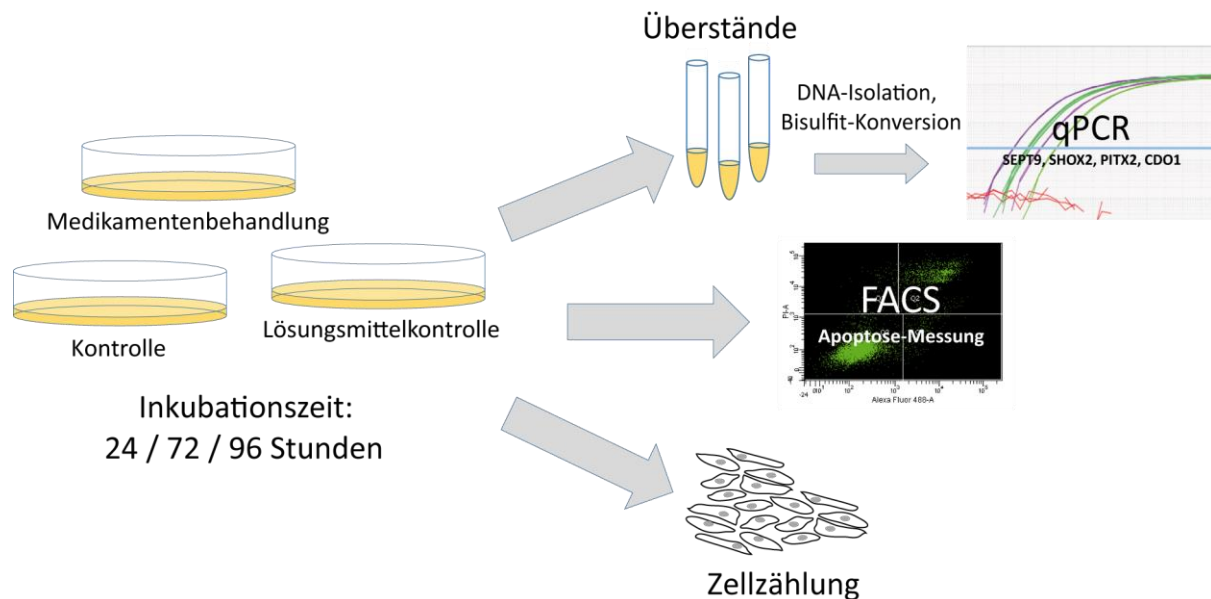


Abb. 4: Schematischer Versuchsablauf. Jede Medikamentenbehandlung wird jeweils mit zwei Kontrollen, Kontrolle (Medium ohne weitere Zusätze) und Lösungsmittelkontrolle (Medium mit jeweiligem Lösungsmittel des Medikamentes versetzt), durchgeführt. Die Auswertung erfolgte immer in Relation zu den jeweiligen Kontrollen.

3.2.1 Kultivierung

Die Zellen wurden in 75-cm²-Zellkulturflaschen in 15 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, das mit 10 % fötalem bovinem Serum (FCS) versetzt wurde, kontinuierlich bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Alle vier bis fünf Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Zum Ablösen wurde eine mit PBS und Ethylendiaminetetraacetat (EDTA) verdünnte Trypsinlösung (0,07 %-Trypsin) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 6 min bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die abgelösten Zellen in ein Falcon überführt. Die Zellkulturflasche wurde mit PBS nachgespült und diese Suspension mit den abgelösten Zellen vereint. Die Zellen wurden bei 1300 rpm für 4 min abzentrifugiert, anschließend in neuem Medium resuspendiert und in oben genanntem Verhältnis ausgesät.

3.2.2 Kultivierung während des Experiments

Die Zellen wurden für insgesamt 7 Tage in 58-cm²-Zellkulturschalen in Kultur gehalten.

Die Zellen wurden in 12 ml Kulturmedium nach oben genanntem Protokoll ausgesät. Für H1650 wurden 300.000 Zellen, für H1975 120.00 Zellen, für H358 500.000 Zellen pro Schale ausgesät. Jede Zelllinie wurde insgesamt auf 9 Schalen verteilt: drei Schalen für eine Medikamentenbehandlung, drei Schalen für Kontrollen und drei Schalen für Lösungsmittelkontrollen – entsprechend der Anzahl der drei Inkubationszeitpunkte.

An Versuchstag 3 erfolgte ein Mediumwechsel: Die Schalen für die Medikamentenbehandlung erhielten 15 ml neues Medium, das das Medikament in Lösung beinhaltet. Die Schalen der Kontrollen erhielten lediglich 15 ml neues Medium ohne weitere Zusätze. Die Schalen der Lösungsmittelkontrollen erhielten 15 ml neues Medium, das die gleiche Menge an Lösungsmittel wie das Medium der Medikamentenschalen enthielt.

An den Versuchstagen 4, 5 und 7 – entsprechend nach etwa 24, 72 und 96 h Inkubationszeit – erfolgten Überstandgewinnung, Zellzählung und Apoptose-Messung gemäß der folgenden Protokolle.

3.2.3 Überstandgewinnung

Es wurde bei jeder Schale zunächst der Überstand gewonnen, in ein 15-ml-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Die Überstände wurden durch zweimaliges Zentrifugieren, zuerst für 10 min bei 1500 rpm, dann nach Überführung des Überstandes in ein neues Röhrchen für 15 min bei 3500 rpm aufbereitet. Der erneut überführte Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse eingefroren.

3.2.4 Zellzählung

Die Zellzahlbestimmung jeder Schale erfolgte mithilfe des Zählautomaten Z1 Coulter Particle Counter (Beckmann Coulter). Die Schalen wurden zunächst kurz mit 5 ml 0,07 %-Trypsin gespült, um damit Reste des Mediums zu entfernen, die ein Ablösen der Zellen prolongiert hätten. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml 0,07 %-Trypsin und 6-10 min Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ abgelöst und in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Es wurden die restlichen Zellen mit 10 ml PBS heruntergewaschen und zur Zellsuspension hinzugefügt. Sofern noch nicht alle Zellen abgelöst waren, erfolgte eine weitere Trypsinierung mit 2 ml für 4 min bei 37 °C und 5 % CO₂, gefolgt von erneutem Waschen mit 5 ml PBS. Von der vereinten Zellsuspension wurde ein 100 µl Aliquot für die Zellzählung entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde für die Apoptose-Messung nach dem Annexin-V FITC/Propidiumiodid-Protokoll (siehe unten) weiterverarbeitet.

3.3 Fluorescence-activated-cell-sorting (FACS)

Fluorescence-activated-cell-sorting (FACS) Analyse wurde am BD LSRFortessa durchgeführt. Für die Apoptose-Messung wurde einem Annexin-V FITC/Propidiumiodid-Protokoll gefolgt. Die Auswertung mit der BD FACSDiva Software Version 6.1.3 schloss sich an.

3.3.1 Annexin-V FITC/Propidiumiodid-Protokoll

Die Zellsuspension wurde nach dem Ablösen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und in ein 5-ml-FACS-Röhrchen überführt, Zentrifugation erfolgte jeweils bei 3000 rpm für 1 min. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit erst 2 ml, dann 400 µl 1x Bindingbuffer (0,01 M HEPES (pH 7,5), 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂, in aq. dest.) sowie anschließendes Filtern der 400 µl Zellsuspension. Auch hier erfolgte die Zentrifugation jeweils bei 3000 rpm für 1 min. Nach Zugabe von 5 µl Annexin-V FITC (BD, Ref. 556419) erfolgte eine Inkubation von 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Dann wurden 10 µl Propidiumiodid (100 µg/ml, Sigma-Aldrich, P4864) und 2,5 µl RNase A (50 µg/l) zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Zellen nochmals durch den Zellfilter gegeben.

3.4 DNA-Methylierung

DNA-Isolation und Bisulfit-Konversion wurden mithilfe des innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit (Analytik Jena) durchgeführt. Für alle Proben unter Behandlung mit dem Medikament Prednisolon wurde zur DNA-Isolation das PME free-circulating DNA Extraction Kit, Vers. 12/15 (Analytik Jena, LOT 001-16) und zur Bisulfit-Behandlung das innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit, Vers. 07/15 (Analytik Jena, LOT V-02-2016) verwendet. Aufgrund einer Produktaktualisierung seitens des Herstellers wurde bei der Analyse der Proben aller weiteren Medikamente sowohl zur DNA-Isolation als auch zur Bisulfit-Behandlung nur das innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit, Vers. 07/15 (Analytik Jena, LOT V-02-2016 und LOT 03-2016) gemäß des Protokolls des Herstellers verwendet.

3.4.1 Isolation der cfDNA

Das Prinzip der cfDNA-Isolation basiert auf einer Polymer-vermittelten-Anreicherung (PME) und erfolgte anhand des Protokolls des PME free-circulating DNA Extraction Kit, Vers. 12/15 und innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit Vers. 07/15 (Analytik Jena). Es wurden jeweils 3 ml des gewonnenen Überstandes eingesetzt. Am Ende der cfDNA-Isolation wurde die an eine Filtersäule gebundene DNA insgesamt mit 60 µl RNase-freiem Wasser (zweimal mit jeweils 30 µl) eluiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Bisulfit-Konversion

Die Bisulfit-Konversion wurde mithilfe des innuCONVERT Bisulfite Body Fluids Kit, Vers. 07/15 (Analytik Jena) durchgeführt. Es wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt, mit kleinen Modifikationen der Waschschriffe. Auch dieses Kit verwendet das Prinzip der PME.

Ausgangsmaterial waren 26 µl isolierte cfDNA. Durch zweimalige Elution mit 40 µl Elutionspuffer (Zusammensetzung unbekannt), insgesamt 80 µl, wurde die an der Filtersäule gebundene bisulfitierte DNA eluiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Quantitative PCR

Um den Methylierungsstatus der cfDNA zu erfassen wurde die mit der Bisulfit-Konversion behandelte cfDNA mittels quantitativer PCR analysiert. Dabei wurde ein 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) verwendet. Für den ACTB-SEPT9-SHOX2-Assay wurden 10 µl bisulfitierte DNA (unverdünnt) eingesetzt, für den PITX2- und CDO1-Assay wurde aufgrund begrenzten Ausgangsmaterials jeweils eine 1:2 Verdünnung verwendet. Jede Probe wurde im jeweiligen PCR-Ansatz in Triplikaten gemessen. Zudem wurde auf jeder qPCR Platte eine synthetische Bisulfit-konvertierte komplett methylierte DNA wie zuvor beschrieben als Kalibrator mitgeführt (Dietrich et al. 2013a). Die Ergebnisse wurden mittels 7500 Software Version 2.3 (Applied Biosystems) ausgewertet. Die Zusammensetzungen des Reaktionsgemischs für jede PCR-Reaktion sowie die unterschiedlichen PCR-Temperatur-Bedingungen und Primer werden im Folgenden aufgelistet (Tab. 3, Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6).

ACTB-SEPT9-SHOX2-Assay

Tab. 3: Zusammensetzung des Reaktionsgemischs je Reaktion.

Reagenz	Volumen
Mastermix	10 µl
70 mM Tris-HCl, pH 8,4	
12 mM MgCl ₂	
100 mM KCl	
8 % Glycerol	
0,5 mM je dNTP	
0,0006 µl ROX Lösung	
2 U FastStart Taq DNA Polymerase	
Primer + Probe (= Sonde) (Tab. 6)	
bisulfitierte DNA	10 µl
Endvolumen	20 µl

Folgendes Temperatur Protokoll wurde am PCR-Cycler verwendet:

1. 95 °C: 20 Min.
2. 62 °C: 2 Sek.
3. 56 °C: 45 Sek.
4. 95 °C: 15 Sek; Wiederholung von Schritt 2-4 für 50 Zyklen.

PITX2-Assay

Tab. 4: Zusammensetzung des Reaktionsgemischs je Reaktion.

Reagenz	Volumen
Mastermix	10 µl
35 mM Tris-HCl, pH 8,4	
6 mM MgCl ₂	
50 mM KCl	
5 % Glycerol	
0,25 mM je dCTP, dGTP, dATP	
0,5 mM dUTP	
0,004 µl ROX/DMSO Lösung	
3 U FastStart Taq DNA Polymerase	
Primer + Probe (= Sonde) (Tab. 6)	
bisulfitierte DNA	10 µl
Endvolumen	20 µl

Folgendes Temperatur Protokoll wurde am PCR-Cycler verwendet:

1. 95 °C: 20 Min.
2. 62 °C: 2 Sek.
3. 56 °C: 45 Sek.
4. 95 °C: 15 Sek.

Wiederholung von Schritt 2-4 für 50 Zyklen.

CDO1-Assay

Tab. 5: Zusammensetzung des Reaktionsgemischs je Reaktion.

Reagenz	Volumen
Mastermix	10 µl
35 mM Tris-HCl, pH 8,4	
6 mM MgCl ₂	
50 mM KCl	
5 % Glycerol	
0,25 mM je dCTP, dGTP, dATP	
0,5 mM dUTP	
0,004 µl ROX/DMSO Lösung	
3 U FastStart Taq DNA Polymerase	
Primer + Probe (= Sonde) (Tab. 6)	
bisulfitierte DNA	10 µl
Endvolumen	20 µl

Folgendes Temperatur Protokoll wurde am PCR-Cycler verwendet:

1. 95 °C: 15 Min.
2. 66 °C: 2 Sek.
3. 55 °C: 60 Sek.
4. 95 °C: 15 Sek. Wiederholung von Schritt 2-4 für 50 Zyklen.

Primer

Tab. 6: Verwendete Primer der oben genannten Assays.

ACTB-SEPT9-SHOX2-Assay	
Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'
ACTB	
Forward Primer	GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT
Reverse Primer	CCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA
Hydrolysis Probe	Cy5-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-BBQ650
SEPT9	
Forward Primer	AAATAATCCCATCCAATA
Reverse Primer	GTTGTTTATTAGTTATTATGT
Reverse Blocker	GTTATTATGTTGGATTTTGTGGTTAATGTGTAG-Spacer C3
Hydrolysis Probe	JOE-TTAACCGCGAAATCCGAC-BHQ1
SHOX2	
Forward-Primer	GTTTTTGGATAGTTAGGTAAT
Forward Blocker	TAATTTTTGTTTTGTTTGTGGATTGGGGTTGTATGA-SpacerC3
Reverse Primer (MSP-Primer)	TAACCCGACTTAAACGACGA
Hydrolysis Probe	6-FAM-CTCGTACGACCCCGATCG-BBQ-650
PITX-2 Assay	
Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'
Forward Primer 1	GGAGGGAAGTAGATGTTA
Reverse Primer 1	CCAAATCCCCTCTCCTTTC
Forward Primer 2	TTGGTGATTAATTTAAAGGAGTTAT
Reverse Primer 2	AATTACCTAAAAACCAAACCTAA
Blocker	CCTTCACTCTCCCAACTCCAACCTCCCAA-SpacerC3
Probe (CH3)	6-FAM-TCGGAGTCGGGAGAGC-DABCYL
Probe (Total)	R6G-TTAAAGAAATGGTGAGAGTTTGGTAT-BHQ-1
CDO1-Assay	
Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'
Forward Primer	ATTTATTTTATAGTTTTTGGTA
Reverse primer	TCTAACCTAATTTATATATACAC
Methylation specific Probe	6-FAM-ACGATCCCGAATCCACTACG-BHQ-1
Unmethylated specific Probe	VIC-TCCAACAATCCCAAATCCACTACA-BHQ-1

Prozentuale Methylierungsrate (PMR) von SEPT9, SHOX2 und PITX2

Die Auswertung des ACTB-SEPT9-SHOX2- und des PITX2-Assays erfolgte anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Wie zuvor beschrieben (Dietrich et al. 2013a) erfolgte hier die Verwendung der Formeln (1) – (3). Um ein Maß für die Methylierung der einzelnen Zielgene in Bezug zur Gesamt-DNA zu erhalten wurde die prozentuale Methylierung (percentage of methylated reference, PMR) mithilfe der Formel (4) errechnet (Dietrich et al. 2013a; Dietrich et al. 2013b).

- (1) $\Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} = \text{Ct}_{\text{Zielgen (Probe)}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen (Probe)}}$
- (2) $\Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}} = \text{Ct}_{\text{Zielgen (Kalibrator)}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen (Kalibrator)}}$
- (3) $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$
- (4) $\text{PMR} = 100\% \cdot 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Für den ACTB-SEPT9-SHOX2-Assay waren jeweils methyliertes SEPT9 und methyliertes SHOX2 die Zielgene, ACTB (Actin beta) das Referenzgen.

Für den PITX2-Assay war methyliertes PITX2 das Zielgen, während die Gesamt-PITX2-DNA methylierungsunspezifisch als Referenz herangezogen wurde.

Methylierung von CDO1

Auch hier wurde zur Auswertung des CDO1-Assays die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode verwendet (Livak und Schmittgen 2001), siehe Formel (5) – (6). Um die Methylierung von CDO1 zu ermitteln wurde Formel (7) verwendet (Meller et al. 2016). Mit dieser Formel (7) wurde dann das absolute Verhältnis von methylierten zu nicht-methylierten CDO1-Allelen errechnet.

- (5) $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{CDO1-P-U}} - \text{Ct}_{\text{CDO1-P-M}}$
- (6) $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$
- (7) $\text{Methylierung von CDO1} = \frac{100}{1+2^{\Delta\Delta\text{Ct}}}$

Beim CDO1-Assay wurden die methylierten Allele (CDO1-P-M) gegen die unmethylierten (CDO1-P-U) gemessen.

Standardkurve

Anhand einer Standardkurve im ACTB-SEPT9-SHOX2-Assay für das Referenzgen ACTB wurde die absolute Konzentration an cfDNA pro 10 μl Probe isolierter bisulfittierter DNA bestimmt. Hierbei wurde mittels 7500 Software Version 2.3 (Applied Biosystems) eine

Standardkurve anhand einer 3-fachen Verdünnungsreihe der Kalibratorlösung erstellt (5000, 500, 50 ng/nl, siehe Formel (8)).

$$(8) \quad Ct_{ACTB} = -3,165 \cdot x + 28,539$$

Da in der exponentiellen Phase der qPCR ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Ausgangsmenge DNA einer Probe (x) und dem Ct von ACTB (Ct_{ACTB}) (siehe Formel (9)) besteht (Irvine und Hsieh 2004),

$$(9) \quad \log(x) = \frac{(Ct_{ACTB} - 28,539)}{-3,165}$$

konnte nach Formel (10) für jede Probe die absolute Konzentration von ACTB im Überstand ermittelt werden.

$$(10) \quad x = 10^{\left(\frac{(Ct_{ACTB} - 28,539)}{-3,165}\right)}$$

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumskurven

Um die freigesetzte cfDNA in Relation zu der Menge an Zellen betrachten zu können wurde zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten, 24 h, 72 h und 96 h, die Zellzahl bestimmt (Abb. 5). Bei der Behandlung mit Cisplatin und Ibuprofen konnte eine Reduzierung der Proliferation beobachtet werden, während unter HCT- und Prednisolon-Behandlung keine Veränderung der Zellzahl auftrat.

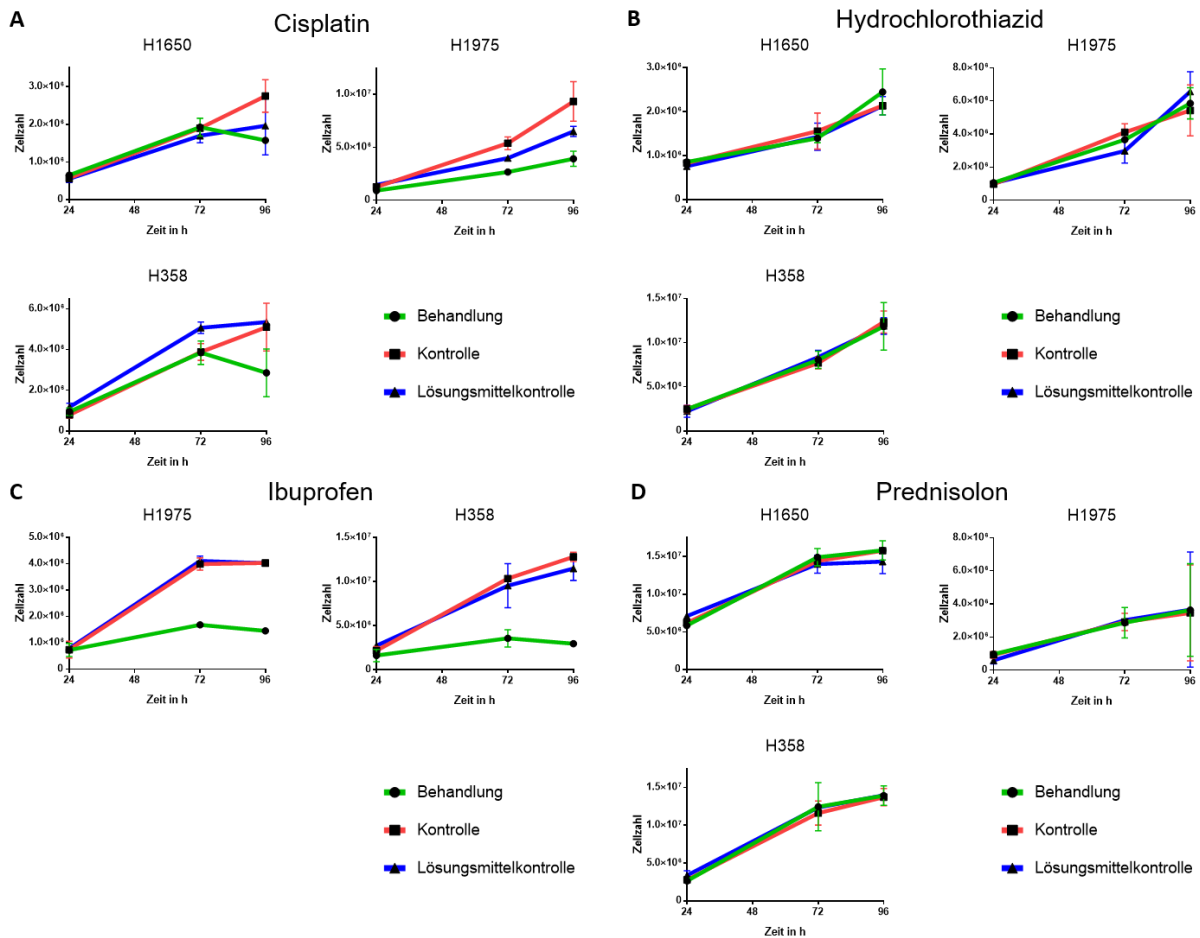


Abb. 5: Wachstumskurven. Entwicklung der Zellzahl für die verschiedenen Behandlungen und Kontrollen je Zelllinie: Cisplatin (A), HCT (B), Ibuprofen (C) und Prednisolon (D). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

4.1.1 Cisplatin-Behandlung

Die Zelllinien H1650 und H358 zeigten unter Cisplatin-Behandlung nach 72 h Inkubationszeit einen Abfall in der Wachstumskurve, der bei den Kontrollen nicht zu beobachten war. Bei H1975 zeigte sich ab dem ersten Tag eine verminderte Zellzahl gegenüber den Kontrollen. Auch bei der Lösungsmittelkontrolle war bei H1975 eine leichte Reduktion der Zellzahl

sichtbar, da es sich hierbei lediglich um eine geringe Menge 0,9% NaCl handelte, ist diese am ehesten als Artefakt einzuordnen.

4.1.2 HCT-Behandlung

Die Behandlung mit HCT hatte verglichen mit den Kontrollen bei keiner Zelllinie eine Veränderung der Zellzahl zu Folge.

4.1.3 Ibuprofen-Behandlung

Die Zelllinie H1650 unter Ibuprofen-Behandlung und deren Kontrollen wurden mangels reproduzierbarer Replikate von der gesamten Auswertung ausgeschlossen. Eine weitaus stärkere Reduktion der Zellzahl als bei Cisplatin-Gabe zeigte sich im Experiment durch die Behandlung mit Ibuprofen an den Zelllinien H1975 und H358. Schon nach 72 h war die Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen stark reduziert.

4.1.4 Prednisolon-Behandlung

Unter Prednisolon-Behandlung fanden sich wie bei HCT im Vergleich zu den Kontrollen bei keiner Zelllinie Veränderungen der Zellzahl.

4.2 Apoptose-Messung

Der prozentuale Anteil avitaler (also früh-, spätapoptotischer und nekrotischer Zellen) und vitaler Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Messung nach Annexin-V FITC/Propidiumiodid-Färbung analysiert, um mögliche Einflüsse des Zellunterganges auf die Freisetzung von extrazellulären Nukleinsäuren zu untersuchen.

Insgesamt zeigten die Zelllinien unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der Anteile avitaler Zellen: Die Zelllinie H1650 zeigte generell eher gleichbleibende Anteile avitaler Zellen über die 96 h Inkubationszeit, nur während des Versuchsdurchlaufes mit Cisplatin-Behandlung und den Kontrollen kam es nach 96 h zum Anstieg sowohl in der Behandlungs- als auch in den Kontrollgruppen. Bei der Zelllinie H1975 zeigte sich eher ein Absinken der Menge avitaler Zellen über den Zeitverlauf von 96 h, die Zelllinie H358 zeigte in der Tendenz eher gleichbleibende Anteile avitaler Zellen. Die Zahlenwerte der Anteile der avitalen Zellen sind in Tab. 7 aufgelistet.

4.2.1 Cisplatin-Behandlung

Im Vergleich zu den Effekten in den Wachstumskurven (Abb. 5) zeigten sich bei der Apoptose-Messung unter Cisplatin-Behandlung lediglich geringe Unterschiede zu den Kontrollen (Abb. 6A, Tab. 7).

Bei H1650 zeigten sich keine Unterschiede zwischen Cisplatin-Behandlung und Kontrollen: Nach 96 h wurden in den Kontrollen und unter Cisplatin-Behandlung maximale Mengen avitaler Zellen erreicht. Bei H1975 konnte nach 24 h Cisplatin-Behandlung tendenziell ein

höherer Anteil avitaler Zellen gegenüber den Kontrollen beobachtet werden. Für H358 ergaben sich zwischen Behandlung und Kontrollen wie bei H1650 keine Unterschiede.

4.2.2 HCT-Behandlung

Bei der Behandlung mit HCT zeigten sich bei keiner Zelllinie starke Unterschiede, geringfügige Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen waren vorrangig aufgrund größerer Standardabweichung zu verzeichnen (Abb. 6B, Tab. 7).

Die Zelllinie H1650 zeigte in den ersten 72 h unter HCT-Behandlung eine in der Tendenz erhöhte Menge avitaler Zellen, wobei aufgrund von Messungenauigkeiten an der Durchflusszytometrie für die Apoptose-Messung das Duplikat nach 24 h unter HCT-Behandlung von der Auswertung ausgeschlossen wurde und der Mittelwert nach 72 h Behandlung eine erhöhte Standardabweichung aufwies. Die Kontrollen hatten über die 96 h Inkubationszeit einen gleichbleibenden Anteil. Bei H1975 lag nach 24 h HCT-Behandlung der Anteil avitaler Zellen geringfügig niedriger als in den Kontrollen. Im weiteren Verlauf näherten sich die Werte der avitalen Zellen zwischen Behandlung und Kontrollen an, nach 96 h bestand kein Unterschied mehr. Für die Zelllinie H358 lag nach 24 h Inkubation mit HCT bei erhöhter Standardabweichung eine größere Menge avitaler Zellen vor als in den Kontrollen, allerdings wurde aufgrund von Messungenauigkeiten an der Durchflusszytometrie für die Kontrolle das Duplikat nach 24 h von der Auswertung ausgeschlossen. Nach 72 h lag sowohl in der Behandlungs- als auch in der Lösungsmittelkontrollgruppe der Anteil avitaler Zellen höher als in der Kontrolle, wobei auch hier die erhöhte Standardabweichung die Deutung erschwert. Nach 96 h bestand kein Unterschied zwischen Behandlung und Kontrollen.

4.2.3 Ibuprofen-Behandlung

Während der Inkubation mit Ibuprofen zeigten sich für H1975 keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Menge avitaler Zellen zwischen Behandlung und Kontrollen (Abb. 6C, Tab. 7). Für H358 zeigten sich ebenfalls keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen. Abgesehen von der Lösungsmittelkontrolle nach 96 h, wo die Menge an avitalen Zellen sowohl unter Medikamentenbehandlung als auch unter Kontrollbedingungen größer war, bestand zwischen Behandlung und Kontrollen kein Unterschied. Bei nicht übereinstimmenden Kontrollen ist hier am ehesten von einem Artefakt auszugehen.

4.2.4 Prednisolon-Behandlung

Beim Vergleich der Prednisolon-Behandlung mit den Kontrollen zeigten sich für alle Zelllinien geringfügige Unterschiede in Bezug auf die Menge avitaler Zellen (Abb. 6D, Tab. 7).

Bei H1650 gab es insgesamt wenig Unterschiede. Dennoch nahm nach 96 h nur in der Kontrolle die Menge avitaler Zellen zu, wobei hier eine größere Standardabweichung ein Artefakt vermuten lässt. Für H1975 lagen in den ersten 72 h mit Prednisolon-Behandlung

weniger avitale Zellen vor als in den Kontrollen. Nach 96 h Inkubation zeigten behandelte Zellen und Kontrollzellen aber dieselbe Menge an avitalen Zellen. Die Zelllinie H358 zeigte in der Kontrolle nach 72 h einen reduzierten Anteil an avitalen Zellen, den es bei den behandelten Zellen und der Lösungsmittelkontrolle nicht zu beobachten gab. Auch hier lässt die größere Standardabweichung ein Artefakt wahrscheinlich werden. Nach 96 h haben alle Gruppen dieselben Anteile avitaler Zellen. Allerdings wurde hier aufgrund von Messungenauigkeiten an der Durchflusszytometrie für H358 für die Medikamentenbehandlung und die Lösungsmittelkontrolle jeweils das Duplikat nach 24 h von der Auswertung ausgeschlossen.

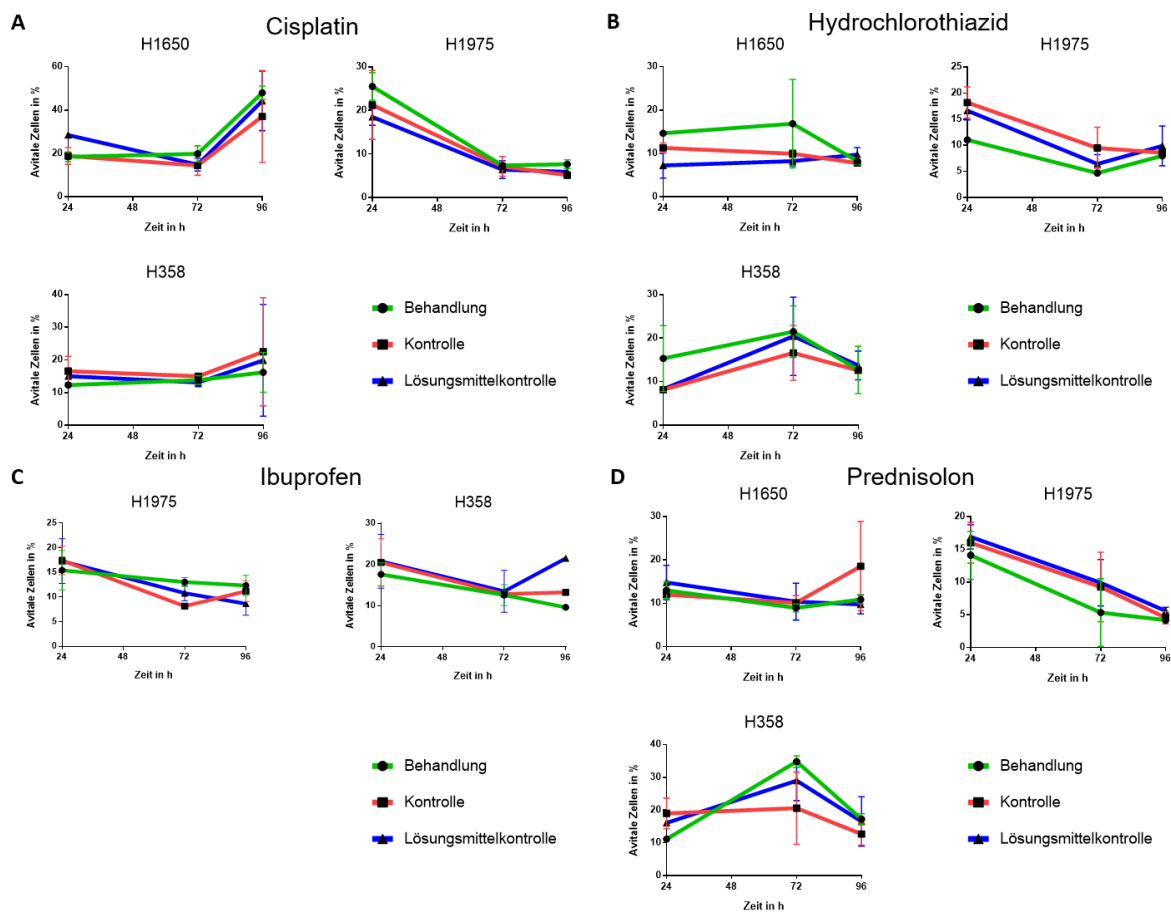


Abb. 6: Anteile avitaler Zellen. Entwicklung der Anteile avitaler Zellen für die verschiedenen Behandlungen und Kontrollen je Zelllinie: Cisplatin (A), HCT (B), Ibuprofen (C) und Prednisolon (D). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

Tab. 7: Anteile avitaler Zellen. Zahlenwerte der Anteile avitaler Zellen unter den verschiedenen Behandlungen und Kontrollbedingungen je Zelllinie. Gezeigt sind Mittelwerte in Prozent und Standardabweichung (bei mit *-markierten Werten, handelt es sich um Messungen, bei denen ein Duplikat ausgeschlossen wurde; Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite).

Zelllinie H1650						
	Cisplatin-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	18,5	2,3	28,5	1,0	18,9	3,9
72 h	19,9	3,7	14,9	3,0	14,5	4,5
96 h	48,0	3,1	44,3	13,7	37,1	21,2
Zelllinie H1975						
	Cisplatin-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	25,6	3,2	18,6	1,9	21,3	7,9
72 h	7,4	0,1	6,5	2,1	7,2	2,3
96 h	7,7	1,0	6,0	1,5	5,2	0,1
Zelllinie H358						
	Cisplatin-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	12,3	0,0	15,1	2,1	16,6	4,5
72 h	13,9	1,3	13,1	1,3	15,0	0,8
96 h	16,2	6,1	19,9	17,1	22,5	16,5
Zelllinie H1650						
	HCT-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	14,7*	0,0*	7,3	2,9	11,3	1,1
72 h	16,9	10,2	8,3	1,1	10,0	0,9
96 h	8,3	0,8	9,8	1,6	7,8	0,6
Zelllinie H1975						
	HCT-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	11,1	0,5	16,7	1,8	18,2	3,0
72 h	4,7	0,4	6,5	1,8	9,5	4,0
96 h	8,0	0,0	9,9	3,8	8,6	0,3
Zelllinie H358						
	HCT-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	15,4	7,6	8,3	0,4	8,2*	0,0 *
72 h	21,5	5,9	20,5	9,0	16,7	6,3
96 h	12,8	5,4	13,8	3,3	12,6	0,4

Zelllinie H1975						
	Ibuprofen-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	15,5	4,0	17,3	4,5	17,5	2,9
72 h	13,1	0,9	10,8	1,6	8,2	0,2
96 h	12,4	2,1	8,7	2,3	11,2	2,1
Zelllinie H358						
	Ibuprofen-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	17,7	2,8	20,8	6,5	20,5	5,8
72 h	12,6	2,5	13,5	5,1	12,9	0,1
96 h	9,7	0,1	21,5	0,6	13,3	0,2
Zelllinie H1650						
	Prednisolon-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	13,0	2,0	14,8	4,0	12,0	0,7
72 h	9,0	0,9	10,4	4,2	10,2	1,6
96 h	10,9	1,0	9,8	2,2	18,6	10,3
Zelllinie H1975						
	Prednisolon-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	14,1	3,7	16,9	1,8	16,0	3,1
72 h	5,4	5,2	9,9	3,5	9,3	5,3
96 h	4,2	0,0	5,6	0,6	4,6	0,9
Zelllinie H358						
	Prednisolon-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.	Avitale Zellen	Std.-Abw.
24 h	11,2*	0,0*	16,1	0,0*	19,0	4,7
72 h	34,9	1,8	29,0	6,1	20,6	11,0
96 h	17,3	1,6	16,6	7,6	12,7	3,4

4.3 Zellfreie DNA-Quantifizierung

Anhand des Referenzgens ACTB wurde die Menge an cfDNA im Überstand der Zellen gemessen. ACTB wurde hier als Marker für die Gesamtmenge an cfDNA herangezogen. Betrachtet man die Konzentration an cfDNA im Überstand pro 10^5 Zellen, so ließ sich bei allen Zelllinien eine starke Zunahme der cfDNA-Konzentration feststellen (Abb. 7). Ein besonders starker Anstieg der cfDNA-Konzentration pro 10^5 Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich bei allen drei Zelllinien unter Behandlung mit Cisplatin und Ibuprofen. (Abb. 7A und C).

Abb. 8 zeigt die Mittelwerte der cfDNA-Konzentration pro 10^5 Zellen der jeweiligen Zelllinien unter Kontrollbedingungen, das heißt, die Zellen wurden mit Kulturmedium ohne weitere Zusätze für 24, 72, und 96 h inkubiert. Unabhängig von der Zelllinie war bei den Kontrollen ein Zuwachs der Mittelwerte der cfDNA-Konzentration pro 10^5 Zellen zu beobachten. Je nach Zelllinie lag der Zuwachs etwa zwischen 200 – 700 %. Für die Zelllinie H1650 zeigte der Mittelwert der cfDNA-Konzentration aller Kontrollen im Zeitverlauf eine Zunahme um etwa das 7-fache (nach 24 h: 1,3 ng/nl/ pro 10^5 Zellen, nach 72 h: 5,6 ng/nl pro 10^5 Zellen, nach 96 h: 9,18 ng/nl pro 10^5 Zellen). Bei der Zelllinie H1975 betrug der Zuwachs der Mittelwerte der cfDNA-Konzentration aller Kontrollen auch etwa das 7-fache (nach 24 h bei: 6,5 ng/nl pro 10^5 Zellen, nach 72 h bei: 21,4 ng/nl pro 10^5 Zellen und nach 96 h bei: 44,8 ng/nl pro 10^5 Zellen). Bei der Zelllinie H358 nahmen die Mittelwerte der cfDNA-Konzentration um etwa das 2-fache zu (nach 24 h: 5,9 ng/nl pro 10^5 Zellen, nach 72 h: 8,7 ng/nl pro 10^5 Zellen und nach 96 h: 10,9 ng/nl pro 10^5 Zellen).

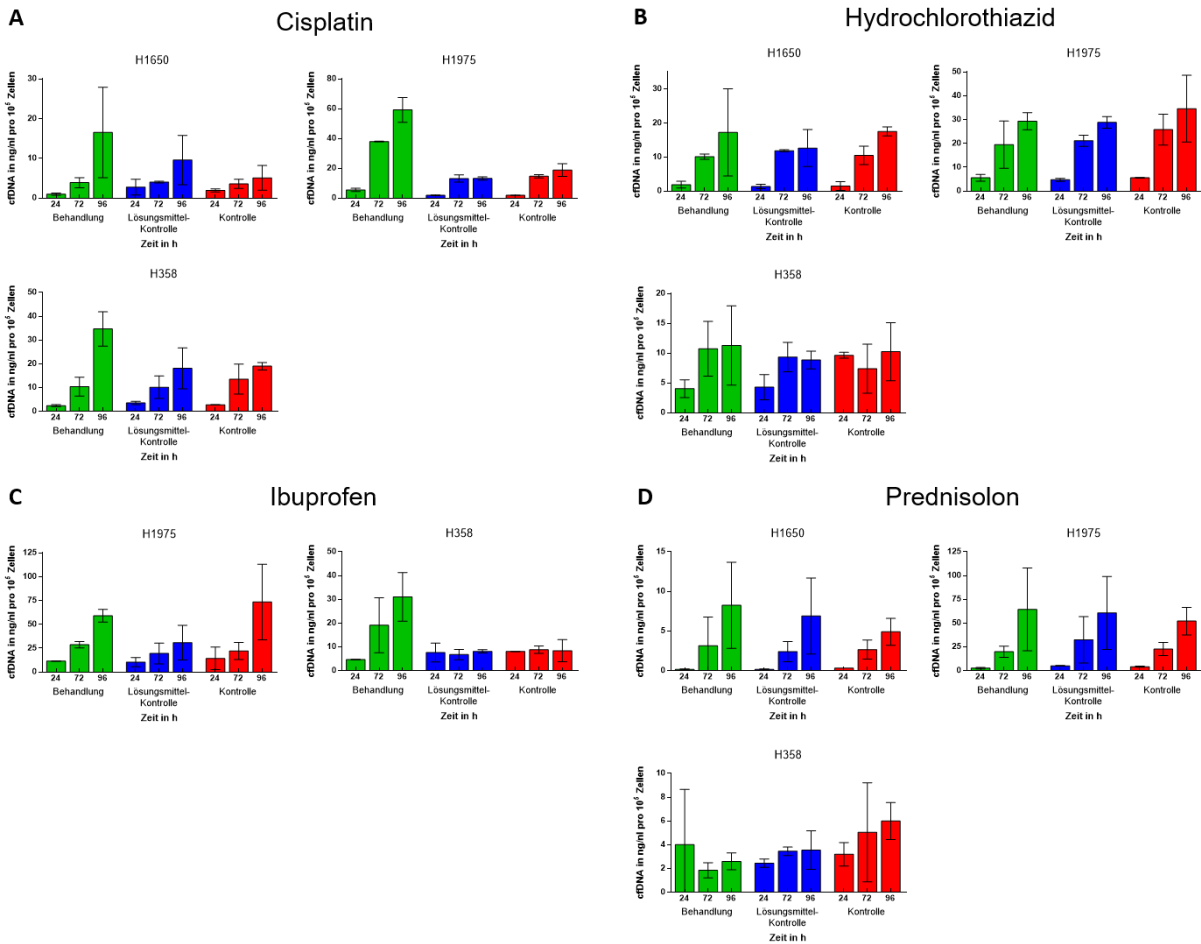


Abb. 7: cfDNA-Konzentration im Verhältnis zur Zellzahl. cfDNA-Konzentration in ng/ml pro 10^5 Zellen für die verschiedenen Behandlungen und Kontrollen je Zelllinie: Cisplatin (A), HCT (B) Ibuprofen (C) und Prednisolon. Grün: Medikamentenbehandlung, blau: Lösungsmittelkontrolle, rot: Kontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

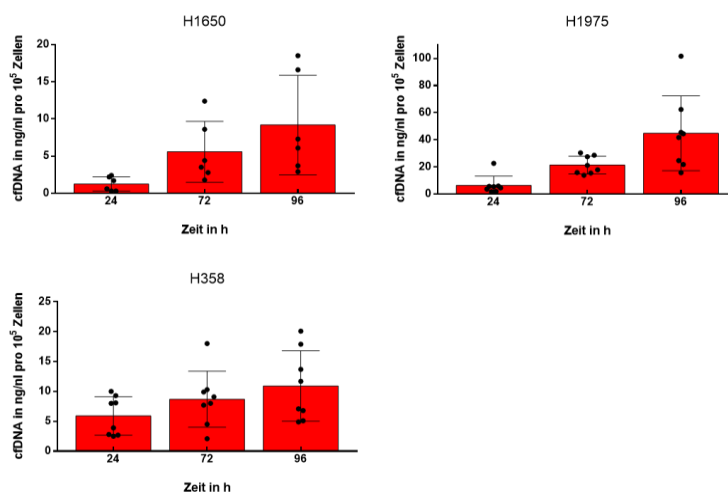


Abb. 8: cfDNA-Konzentration im Verhältnis zur Zellzahl aller Kontrollen je Zelllinie. cfDNA-Konzentration in ng/ml pro 10^5 Zellen für alle Kontrollen je Zelllinie: Für H1650 n=6, für H1975 und H358 jeweils n=8. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

4.4 Einfluss der Medikamentenbehandlung und des Zellunterganges auf die Methylierung der cfDNA im Überstand

Die Untersuchung des Methylierungsstatus der cfDNA, die aus dem Überstand der drei Zelllinien isoliert wurde, zeigte unter Inkubation mit den verschiedenen Medikamenten für die vier ausgewählten Gene SEPT9, SHOX2, PITX2 und CDO1 die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse.

Es erfolgte eine Normalisierung der PMR bzw. der Methylierung jeder Probe auf die PMR bzw. die Methylierung der Lösungsmittelkontrolle nach 24 h Inkubation je qPCR. Um den Zusammenhang der Veränderungen der Methylierung der cfDNA der verschiedenen Gene und dem Zelluntergang zu untersuchen, erfolgte zum jeweiligen Zeitpunkt der Vergleich des Methylierungsstatus mit dem Anteil avitaler Zellen.

Das Gen PITX2 war nur bei den Zelllinien H1650 und H1975 methyliert. Im Rahmen der Voruntersuchungen zeigten wiederholte qPCR-Messungen, dass bei H358 das Gen PITX2 nicht methyliert vorlag (Daten nicht gezeigt). Somit war es hier den methylierungsspezifischen qPCR-Untersuchungen nicht zugänglich.

Es sei vorweg erwähnt, dass das Methylierungsniveau von CDO1 in den ausgewählten Zelllinien generell niedrig war. Der Anteil der methylierten Allele wurde in Prozent errechnet. Dieser belief sich bei H1975 und H358 auf Werte von nur < 5 %, bei H1650 auf etwa 10 – 15 %, sodass die relativen Veränderungen der Methylierung hier bisweilen sehr kleine Veränderungen widerspiegeln. Insgesamt waren die Messungen der Methylierung von CDO1 zum Teil mit großer Standardabweichung behaftet.

4.4.1 Cisplatin-Behandlung der Zelllinie H1650

Veränderung der PMR von SEPT9

Bei H1650 waren keine Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen sichtbar. Die PMR von SEPT9 verblieb auf unverändertem Niveau in allen Gruppen (Tab. 8).

Veränderung der PMR von SHOX2

Für H1650 zeigte sich nach 24 h der Mittelwert der PMR unter Behandlung bei einer größeren Standardabweichung zunächst gegenüber den Kontrollen leicht erhöht, um im Verlauf bis nach 96 h leicht abzunehmen. Die PMR der Kontrollen nahm binnen 96 h gleichmäßig zu. Während in allen Gruppen der Anteil avitaler Zellen zunahm, nahm die PMR in den Kontrollen zu, unter der Behandlung mit Cisplatin jedoch ab (Abb. 9, Tab. 8).

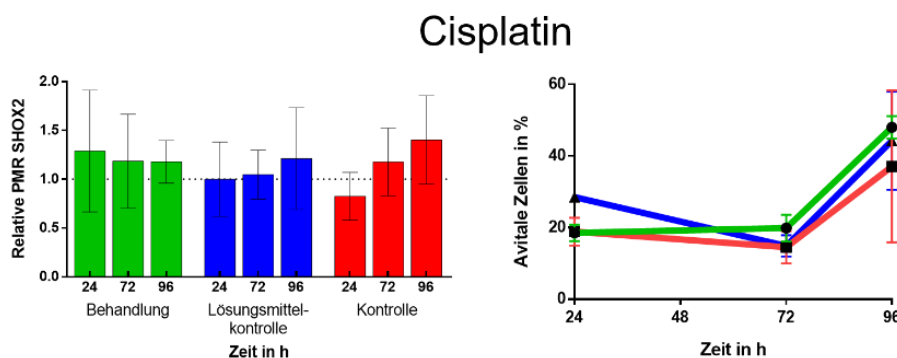


Abb. 9: Zelllinie H1650: Relative PMR SHOX2 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Cisplatin-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von SHOX2 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Cisplatin-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der PMR von PITX2

H1650 zeigte für Medikamentenbehandlung und Kontrollen keine Unterschiede hinsichtlich der PMR von PITX2. In allen Gruppen nahm die PMR von PITX2 gleichermaßen ab (Tab. 8).

Veränderung der Methylierung von CDO1

Bei H1650 gab es keine klaren Unterschiede bei der Methylierung von CDO1 zwischen Behandlung und Kontrollen. Die Methylierung blieb insgesamt nahezu unverändert (Tab. 8).

4.4.2 Cisplatin-Behandlung der Zelllinie H1975

Veränderung der PMR von SEPT9

Bei H1975 kam es nach 24 h Behandlung mit Cisplatin zu einer im Vergleich zu den Kontrollen leicht erniedrigten PMR von SEPT9, die sich im weiteren Verlauf auf dasselbe PMR-Niveau der Kontrollen einpendelte. Allerdings lag hier eine relativ große Standardabweichung in den Kontrollen vor. In der Tendenz nahm in allen Gruppen das PMR-Level geringfügig ab (Tab. 8).

Veränderung der PMR von SHOX2

Für H1975 war nach 24 h eine leicht erniedrigte PMR von SHOX2 im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen, die auch nach 72 h unter Behandlung noch geringer als in den Kontrollen war. Nach 96 h gab es zwischen Behandlung und Kontrollen keinen Unterschied mehr (Abb. 10, Tab. 8). Hier zeigte sich bei einer leicht erhöhten Menge avitaler Zellen unter Cisplatin-Behandlung eine ca. 0,85-fach erniedrigte PMR von SHOX2 nach 24 h. Nach 96 h war die PMR von SHOX2 im Vergleich zu den Kontrollen nicht wesentlich verändert, genau wie der Anteil avitaler Zellen.

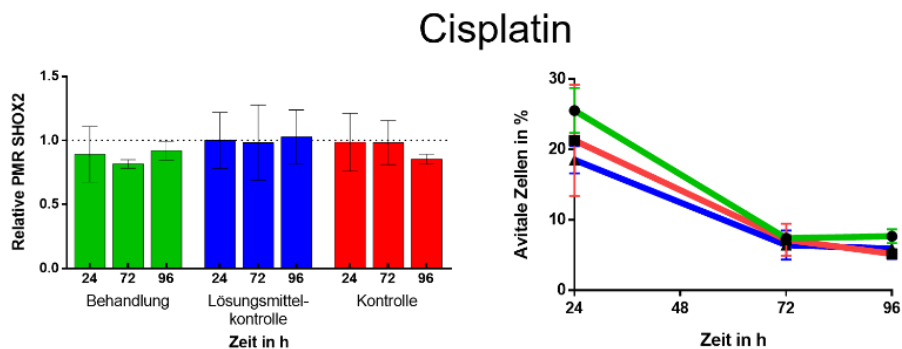


Abb. 10: Zelllinie H1975: Relative PMR SHOX2 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Cisplatin-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von SHOX2 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Cisplatin-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der PMR von PITX2

H1975 zeigte nach 96 h Cisplatin-Behandlung eine leichte Erhöhung der PMR von PITX2 im Vergleich zu den Kontrollen, während es nach 24 und 72 h keinen Unterschied der PMR von PITX2 zwischen Behandlung und Kontrollen gab. Das Niveau der PMR blieb in allen Gruppen annähernd gleich (Abb. 11, Tab. 8).

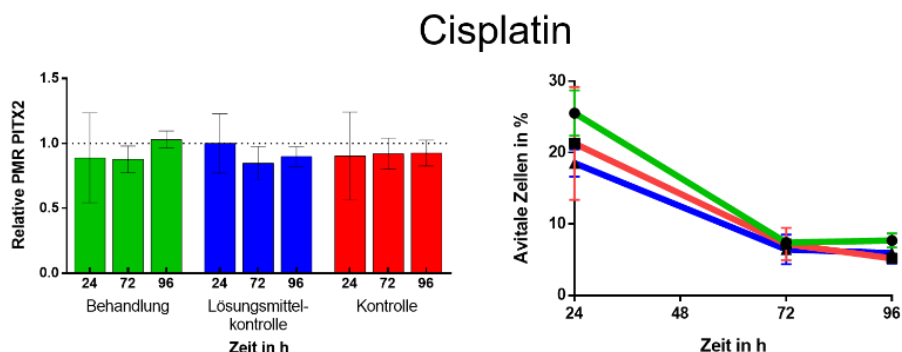


Abb. 11: Zelllinie H1975: Relative PMR PITX2 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Cisplatin-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von PITX2 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Cisplatin-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der Methylierung von CDO1

Bei H1975 gab es keine beobachtbaren Unterschiede der Methylierung von CDO1 zwischen Behandlung und Kontrollen. In allen Gruppen war annähernd eine Zunahme der Methylierung von CDO1 zu beobachten (Tab. 8).

4.4.3 Cisplatin-Behandlung der Zelllinie H358

Veränderung der PMR von SEPT9

Bei der Zelllinie H358 waren keine deutlichen Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen sichtbar. Über den Verlauf von 96 h waren die PMR von SEPT9 in allen Gruppen im ähnlichen Bereich auf gleichbleibendem Niveau, mit Ausnahme der Mittelwerte der PMR nach 24 h, die wegen einer großen Standardabweichung höhere PMR aufwiesen (Tab. 8).

Veränderung der PMR von SHOX2

Bei H358 zeigten sich hinsichtlich der PMR von SHOX2 unter Cisplatin-Behandlung keine eindeutigen Veränderungen zu den Kontrollen. Die PMR von SHOX2 blieb nahezu in allen Gruppen auf demselben Niveau (Tab. 8).

Veränderung der Methylierung von CDO1

Bei H358 betrug die Methylierung von CDO1 nach 24 h unter Cisplatin-Behandlung nur das ca. 0,3-fache der entsprechenden Kontrollen. Unter der Behandlung kam es dann zum Anstieg der Methylierung von CDO1, sodass sich im weiteren Zeitverlauf bei erhöhten Standardabweichungen in der Lösungsmittelkontrolle kein wegweisender Unterschied zwischen Behandlung und Kontrollen zeigte (Abb. 12, Tab. 8).

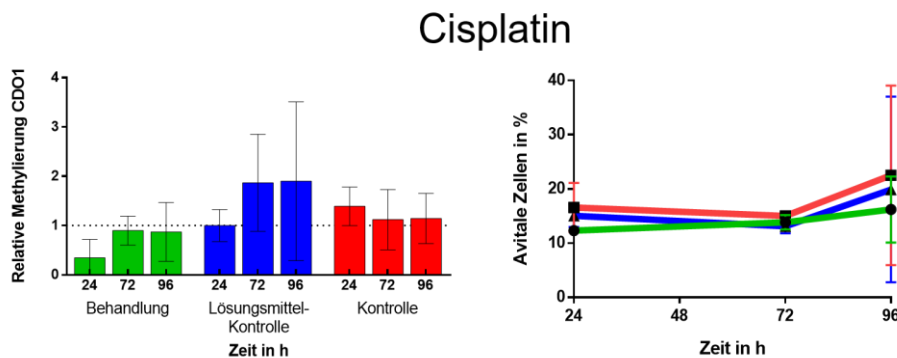


Abb. 12: Zelllinie H358: Relative Methylierung CDO1 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Cisplatin-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von CDO1 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Cisplatin-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Tab. 8: Relative PMR und Methylierung aller Biomarker und Zelllinien unter Cisplatin-Behandlung und Kontrollen. PMR der Biomarker SEPT9, SHOX2, PITX2 sowie Methylierung von CDO1 der Zelllinien H1650, H1975 und H358 unter Cisplatin-Behandlung und Kontrollbedingungen. (Die Daten sind normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle (24h) dargestellt; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite).

Zelllinie H1650						
	Cisplatin-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H1650 - SEPT9						
24 h	1,425	0,852	1,000	0,303	0,733	0,324
72 h	1,057	0,440	0,845	0,123	0,960	0,310
96 h	0,928	0,321	0,942	0,297	0,929	0,184
H1650 - SHOX2						
24 h	1,289	0,623	1,000	0,380	0,826	0,245
72 h	1,186	0,483	1,047	0,251	1,178	0,346
96 h	1,178	0,218	1,212	0,523	1,403	0,453
H1650 - PITX2						
24 h	1,169	0,688	1,000	0,167	1,178	0,648
72 h	0,698	0,178	0,738	0,332	0,455	0,097
96 h	0,579	0,136	0,549	0,189	0,581	0,128
H1650 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	1,355	0,768	1,000	0,321	0,945	0,515
72 h	1,062	0,348	1,038	0,223	0,889	0,174
96 h	0,784	0,260	0,928	0,253	1,024	0,166
Zelllinie H1975						
	Cisplatin-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H1975 - SEPT9						
24 h	0,844	0,312	1,000	0,535	1,009	0,619
72 h	0,957	0,215	1,144	0,377	0,925	0,252
96 h	0,843	0,184	0,949	0,274	0,768	0,167
H1975 - SHOX2						
24 h	0,892	0,218	1,000	0,218	0,986	0,226
72 h	0,817	0,033	0,982	0,294	0,983	0,173
96 h	0,920	0,074	1,028	0,210	0,854	0,039
H1975 - PITX2						
24 h	0,889	0,346	1,000	0,228	0,903	0,339
72 h	0,877	0,102	0,847	0,130	0,921	0,121
96 h	1,030	0,066	0,899	0,077	0,926	0,100
H1975 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	0,475	0,322	1,000	0,493	0,588	0,407
72 h	0,627	0,366	0,718	0,284	0,585	0,215
96 h	0,667	0,115	0,970	0,268	0,788	0,201

Zelllinie H358						
	Cisplatin-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H358 - SEPT9						
24 h	1,432	0,310	1,000	0,149	1,517	0,403
72 h	1,134	0,098	1,098	0,104	1,134	0,104
96 h	0,953	0,107	1,149	0,106	1,008	0,133
H358 - SHOX2						
24 h	1,301	0,159	1,000	0,299	1,398	0,188
72 h	1,286	0,176	1,329	0,198	1,330	0,150
96 h	1,457	0,278	1,494	0,122	1,195	0,218
H358 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	0,345	0,373	1,000	0,326	1,391	0,391
72 h	0,899	0,294	1,868	0,982	1,121	0,611
96 h	0,872	0,597	1,900	1,612	1,144	0,510

4.4.4 HCT-Behandlung der Zelllinie H1650

Veränderung der PMR von SEPT9

Es zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der PMR von SEPT9 im Vergleich zu den Kontrollen. Über 96 h Inkubation blieb sie jeweils auf dem Ausgangsniveau (Tab. 9).

Veränderung der PMR von SHOX2

Es gab hinsichtlich der PMR von SHOX2 keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen. Über 96 h Inkubation blieb sie jeweils auf dem Ausgangsniveau (Tab. 9).

Veränderung der PMR von PITX2

H1650 zeigte für Medikamentenbehandlung und Kontrollen keine Unterschiede hinsichtlich der PMR von PITX2. In allen Gruppen nahm die PMR von PITX2 gleichermaßen ab (Tab. 9).

Veränderung der Methylierung von CDO1

Es ergaben sich keine Veränderungen der Methylierung von CDO1 zwischen Behandlung und Kontrollen. Es zeigte sich hier eine gleichbleibende Methylierung von CDO1 (Tab. 9).

4.4.5 HCT-Behandlung der Zelllinie H1975

Veränderung der PMR von SEPT9

Es zeigten sich keine klaren Veränderungen der PMR von SEPT9 im Vergleich zu den Kontrollen. Bei H1975 lag die PMR von SEPT9 unter HCT-Behandlung sowie in der Kontrolle nach 24 h niedriger als in der Lösungsmittelkontrolle. Bei dieser lag jedoch eine relativ große Standardabweichung vor, weshalb hier von einem Artefakt ausgegangen werden kann. Im weiteren Verlauf hatten alle Gruppen ein ähnliches Niveau der PMR von SEPT9 (Tab. 9).

Veränderung der PMR von SHOX2

Bei H1975 lag die PMR von SHOX2 unter HCT-Behandlung nach 96 h leicht unterhalb des PMR-Niveaus der Kontrollen, bei erhöhten Standardabweichungen der Kontrollen (Abb. 13, Tab. 9). Die PMR war im Verlauf ansonsten bei allen Gruppen auf demselben Niveau.

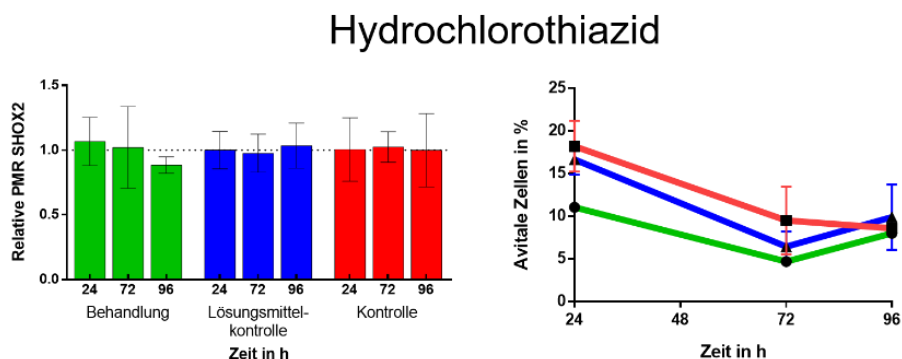


Abb. 13: Zelllinie H1975: Relative PMR SHOX2 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter HCT-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von SHOX2 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: HCT-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der PMR von PITX2

Bei H1975 ließen sich bei größerer Standardabweichung keine reproduzierbaren Unterschiede hinsichtlich der PMR von PITX2 zwischen Behandlung und Kontrollen beobachten. Sowohl unter Medikamentenbehandlung als auch in der Lösungsmittelkontrolle blieb sie auf einem gleichbleibenden Niveau, in der Kontrolle nahm sie über die Zeit eher zu, nach 96 h war sie in allen Gruppen auf einem ähnlichen Niveau (Tab. 9).

Veränderung der Methylierung von CDO1

Es ergaben sich keine Veränderungen der Methylierung von CDO1 zwischen Behandlung und Kontrollen. H1975 zeigte bei relativ großer Standardabweichung näherungsweise eine gleichbleibende Methylierung von CDO1 (Tab. 9).

4.4.6 HCT-Behandlung der Zelllinie H358

Veränderung der PMR von SEPT9

Es konnten keine Veränderungen der PMR von SEPT9 im Vergleich zwischen Behandlung und Kontrollen beobachtet werden, sie nahm über 96 h Inkubation gleichermaßen in allen Gruppen zu (Tab. 9).

Veränderung der PMR von SHOX2

Die PMR von SHOX2 zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen. Über 96 h Inkubation blieb sie jeweils auf dem Ausgangsniveau (Tab. 9).

Veränderung der Methylierung von CDO1

Bei H358 ergaben sich keine klaren Veränderungen der Methylierung von CDO1 im Vergleich zu den Kontrollen, bei relativ großer Standardabweichung ergab sich näherungsweise eine gleichbleibende Methylierung von CDO1 (Tab. 9).

Tab. 9: Relative PMR und Methylierung aller Biomarker und Zelllinien unter HCT-Behandlung und Kontrollen. PMR der Biomarker SEPT9, SHOX2, PITX2 sowie Methylierung von CDO1 der Zelllinien H1650, H1975 und H358 unter HCT-Behandlung und Kontrollbedingungen. (Die Daten sind normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle (24h) dargestellt; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite).

Zelllinie H1650						
	HCT-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H1650 - SEPT9						
24 h	1,615	1,034	1,000	0,097	1,163	0,288
72 h	1,102	0,574	1,017	0,396	1,107	0,446
96 h	1,051	0,309	1,021	0,452	1,054	0,487
H1650 - SHOX2						
24 h	0,894	0,583	1,000	0,130	0,824	0,246
72 h	0,940	0,326	0,854	0,170	0,907	0,149
96 h	0,928	0,035	0,902	0,277	0,934	0,169
H1650 - PITX2						
24 h	1,276	0,850	1,000	0,000	1,270	0,277
72 h	0,753	0,155	0,742	0,221	0,865	0,315
96 h	0,662	0,134	0,729	0,281	0,645	0,079
H1650 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	0,946	0,315	1,000	0,235	1,020	0,335
72 h	0,934	0,198	1,034	0,140	1,030	0,123
96 h	1,005	0,157	1,023	0,226	0,970	0,105
Zelllinie H1975						
	HCT-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H1975 - SEPT9						
24 h	0,721	0,173	1,000	0,108	0,820	0,254
72 h	0,754	0,094	0,746	0,080	0,813	0,075
96 h	0,741	0,055	0,759	0,103	0,793	0,152
H1975 - SHOX2						
24 h	1,067	0,186	1,000	0,144	1,005	0,246
72 h	1,021	0,315	0,976	0,148	1,025	0,118
96 h	0,885	0,063	1,035	0,174	0,999	0,284
H1975 - PITX2						
24 h	1,111	0,209	1,000	0,358	0,921	0,185
72 h	1,101	0,313	1,079	0,199	1,004	0,275
96 h	1,032	0,255	0,975	0,224	1,096	0,191
H1975 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	0,815	0,574	1,000	0,244	0,684	0,067
72 h	1,073	0,626	0,795	0,187	0,952	0,473
96 h	0,952	0,587	0,985	0,412	0,991	0,535

Zelllinie H358						
	HCT-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H358 - SEPT9						
24 h	0,981	0,395	1,000	0,185	1,103	0,446
72 h	1,126	0,343	1,242	0,475	1,231	0,516
96 h	1,246	0,320	1,363	0,594	1,234	0,347
H358 - SHOX2						
24 h	1,054	0,340	1,000	0,180	1,068	0,358
72 h	0,935	0,098	1,071	0,358	1,136	0,421
96 h	1,087	0,084	1,149	0,363	1,031	0,116
H358 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	0,767	0,568	1,000	0,203	0,754	0,208
72 h	0,998	0,795	1,254	0,555	1,117	0,410
96 h	0,668	0,848	1,312	0,220	1,183	0,597

4.4.7 Ibuprofen-Behandlung der Zelllinie H1975

Veränderung der PMR von SEPT9

Es zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der PMR von SEPT9 im Vergleich zwischen Behandlung und Kontrollen. Die PMR von SEPT9 war in allen Gruppen während der 96 h Inkubation auf gleichbleibendem Niveau (Tab. 10).

Veränderung der PMR von SHOX2

Bei H1975 ergab sich eine Erniedrigung der PMR von SHOX2 nach 24 h unter Medikamentenbehandlung. Allerdings wiesen die Werte hier eine größere Standardabweichung auf, weshalb hier eine artifizielle Veränderung nicht auszuschließen ist. Das Niveau der PMR von SHOX2 blieb ansonsten über 96 h Inkubation in allen Gruppen ähnlich (Tab. 10).

Veränderung der PMR von PITX2

Unter Ibuprofen-Behandlung zeigte sich bei H1975 nach 24 h eine etwa 0,75-fach verminderte PMR gegenüber den Kontrollen, die sich im Verlauf demselben PMR-Niveau der Kontrollen näherte (Abb. 14, Tab. 10). In den Kontrollen lag im gesamten Zeitraum eine unveränderte PMR vor.

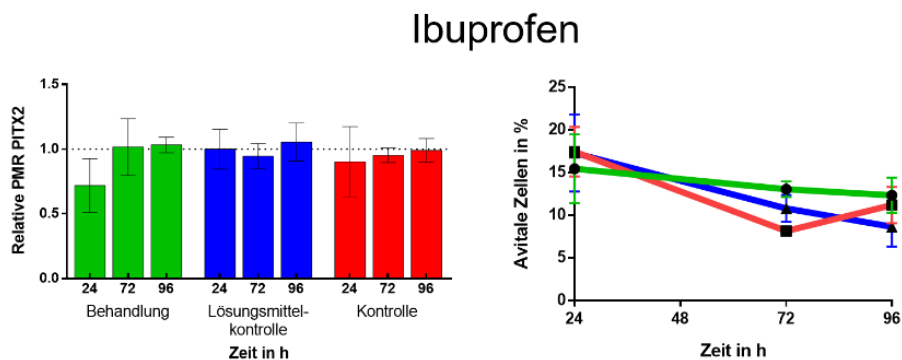


Abb. 14: Zelllinie H1975: Relative PMR PITX2 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Ibuprofen-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von PITX2 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Ibuprofen-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der Methylierung von CDO1

Bei H1975 blieb die Methylierung unter Behandlung und in den Kontrollen ohne reproduzierbaren Unterschied, im Zeitverlauf war die Methylierung in allen Gruppen zunehmend (Tab. 10).

4.4.8 Ibuprofen-Behandlung der Zelllinie H358

Veränderung der PMR von SEPT9

Es zeigten sich keine Veränderungen der PMR von SEPT9 im Vergleich zu den Kontrollen. In allen Gruppen lag eine annähernd gleichbleibende PMR vor (Tab. 10).

Veränderung der PMR von SHOX2

Die Zelllinie H358 zeigte nach 96 h unter Medikamentenbehandlung eine Erniedrigung der PMR von SHOX2 gegenüber den Kontrollen (Abb. 15, Tab. 10). Im gesamten Zeitverlauf nahm die PMR unter Behandlung ab, die Lösungsmittelkontrolle zeigte eine Zunahme, die Kontrolle eine Stagnation. Bei nicht übereinstimmenden Kontrollen bleibt eine tiefere Interpretation erschwert.

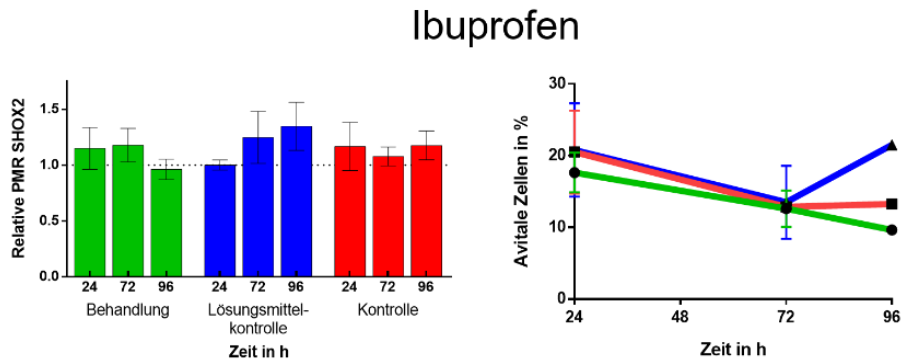


Abb. 15: Zelllinie H358: Relative PMR SHOX2 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Ibuprofen-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von SHOX2 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Ibuprofen-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der Methylierung von CDO1

Bei H358 gab es nach 96 h Behandlung in der Tendenz eine Verminderung der Methylierung von CDO1 im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten, allerdings bei größerer Standardabweichung. Es kam in den Kontrollen im Zeitverlauf eher zu einer Zunahme der Methylierung von CDO1, unter Behandlung eher zu einer Abnahme (Tab. 10).

Tab. 10: Relative PMR und Methylierung aller Biomarker der Zelllinien H1975 und H358 unter Ibuprofen-Behandlung und Kontrollen. PMR der Biomarker SEPT9, SHOX2, PITX2 sowie Methylierung von CDO1 der Zelllinien H1975 und H358 unter Ibuprofen-Behandlung und Kontrollbedingungen. (Die Daten sind normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle (24h) dargestellt; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung).

Zelllinie H1975						
	Ibuprofen-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H1975 - SEPT9						
24 h	0,873	0,341	1,000	0,200	0,926	0,230
72 h	1,057	0,170	0,999	0,172	0,996	0,125
96 h	1,023	0,239	1,061	0,079	0,970	0,049
H1975 - SHOX2						
24 h	0,836	0,524	1,000	0,179	0,949	0,355
72 h	1,143	0,299	0,935	0,233	1,081	0,409
96 h	0,981	0,120	1,050	0,321	1,087	0,278
H1975 - PITX2						
24 h	0,719	0,208	1,000	0,154	0,904	0,271
72 h	1,016	0,220	0,946	0,098	0,952	0,057
96 h	1,033	0,060	1,055	0,147	0,991	0,091
H1975 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	0,714	0,212	1,000	0,190	0,707	0,294
72 h	0,633	0,201	0,952	0,253	0,858	0,116
96 h	0,881	0,369	1,112	0,499	0,957	0,258
Zelllinie H358						
	Ibuprofen-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H358 - SEPT9						
24 h	0,939	0,179	1,000	0,075	0,955	0,130
72 h	1,093	0,150	1,037	0,153	1,024	0,064
96 h	1,089	0,054	1,199	0,136	0,995	0,080
H358 - SHOX2						
24 h	1,149	0,187	1,000	0,045	1,166	0,216
72 h	1,177	0,150	1,247	0,232	1,077	0,085
96 h	0,961	0,091	1,346	0,215	1,175	0,129
H358 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	1,165	0,550	1,000	0,111	0,726	0,239
72 h	1,126	0,314	0,956	0,272	1,178	0,353
96 h	0,889	0,151	1,056	0,190	1,234	0,321

4.4.9 Prednisolon-Behandlung der Zelllinie H1650

Veränderung der PMR von SEPT9

Bei H1650 gab es keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen hinsichtlich der PMR von SEPT9, diese bewegte sich über die 96 h Inkubation annähernd in einem ähnlichen Bereich (Tab. 11).

Veränderung der PMR von SHOX2

Bei H1650 zeigte sich nach 24 h Prednisolon-Behandlung die PMR von SHOX2 gegenüber den Kontrollen erniedrigt und wies im weiteren Verlauf keinen deutlichen Unterschied auf, bei ebenfalls größerer Standardabweichung (Abb. 16, Tab. 11). Sowohl unter Behandlung als auch in den Kontrollen kam es während 96 h Inkubation zu einer leichten Zunahme der PMR von SHOX2.

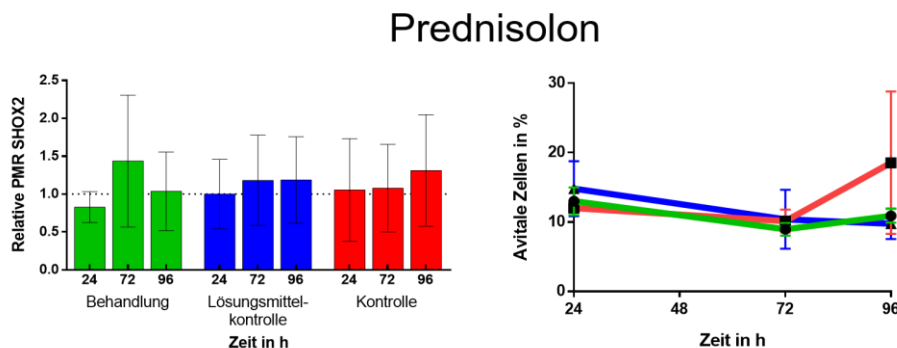


Abb. 16: Zelllinie H1650: Relative PMR SHOX2 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Prednisolon-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von SHOX2 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Prednisolon-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der PMR von PITX2

Es traten bei keiner Zelllinie beobachtbare Veränderungen der PMR von PITX2 zwischen Behandlung und Kontrollen auf. Das Niveau der PMR von PITX2 blieb in allen Gruppen nahezu unverändert (Tab. 11).

Veränderung der Methylierung von CDO1

H1650 zeigte nach 96 h unter Behandlung mit Prednisolon tendenziell eine niedrigere Methylierung von CDO1 im Vergleich mit den Kontrollen. Die Methylierung nahm insgesamt über die 96 h Inkubationszeit leicht ab (Abb. 17, Tab. 11).

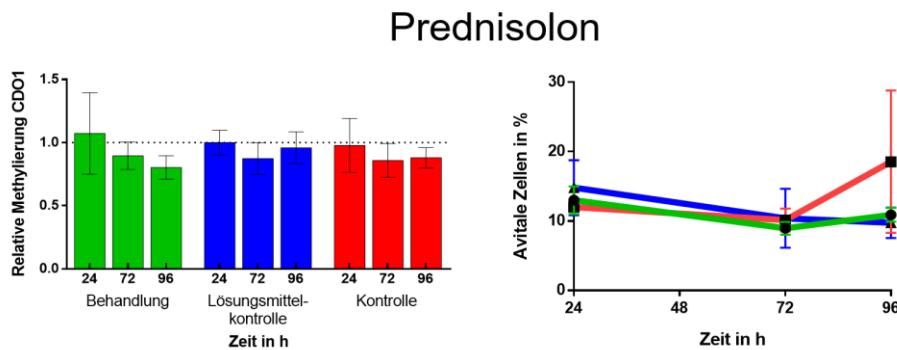


Abb. 17: Zelllinie H1650: Relative Methylierung von CDO1 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Prednisolon-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR von CDO1 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Prednisolon-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

4.4.10 Prednisolon-Behandlung der Zelllinie H1975

Veränderung der PMR von SEPT9

Bei H1975 war eine Veränderung in der PMR von SEPT9 zu beobachten: Während nach 24 h Prednisolon-Behandlung die PMR von SEPT9 höher lag als in den Kontrollen, nahm sie über die 96 h Inkubationszeit ab (Abb. 18, Tab. 11). In den Kontrollen war ein Anstieg der PMR zu beobachten. Nach 96 h lag die PMR von SEPT9 unter Prednisolon-Behandlung schließlich niedriger als in den Kontrollen.

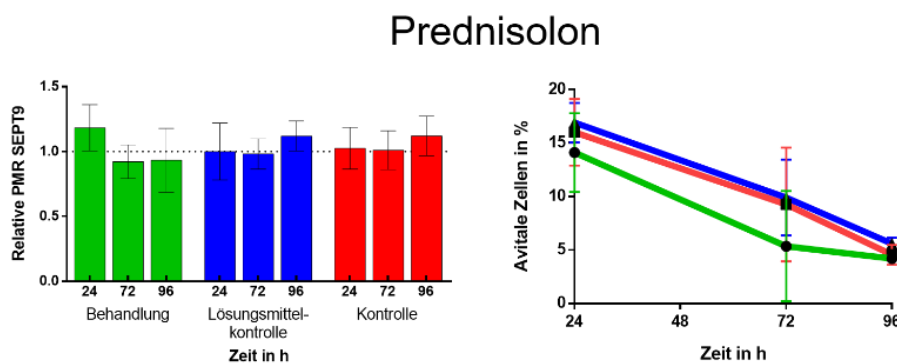


Abb. 18: Zelllinie H1975: Relative PMR SEPT9 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Prednisolon-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR SEPT9 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Prednisolon-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der PMR von SHOX2

Auffällig war hier für die Zelllinie H1975 unter Medikamentenbehandlung eine über 72 h kontinuierlich erhöhte PMR im Vergleich zu den Kontrollen. Nach 24 h lag sie ca. um das 0,3-fache höher, nach 72 h noch um das ca. 0,1 – 0,25-fache (Abb. 19, Tab. 11). Nach 96 h Inkubation näherten sich die PMR von SHOX2 in Behandlungs- und Kontrollgruppen einander an. Insgesamt nahm die PMR von SHOX2 im Zeitverlauf in allen Gruppen zu.

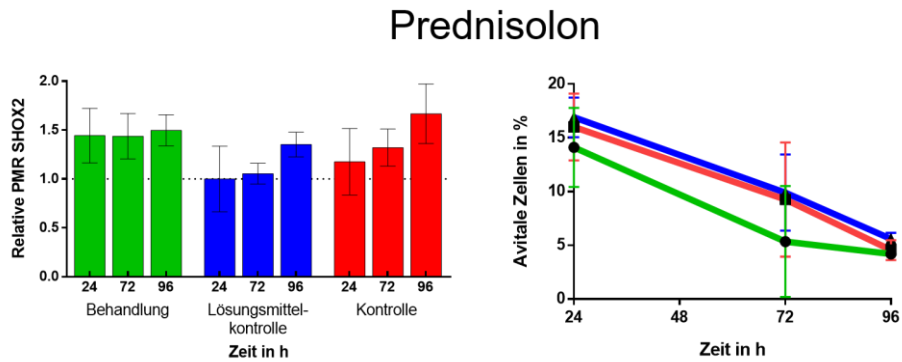


Abb. 19: Zelllinie H1975: Relative PMR SHOX2 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Prednisolon-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative PMR SHOX2 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Prednisolon-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

Veränderung der PMR von PITX2

Es traten bei keiner Zelllinie reproduzierbare Veränderungen der PMR von PITX2 zwischen Behandlung und Kontrollen auf. Das Niveau der PMR von PITX2 blieb nahezu unverändert (Tab. 11).

Veränderung der Methylierung von CDO1

Bei H1975 lag nach 24 h der Mittelwert der Methylierung von CDO1 unter Prednisolon-Behandlung bei insgesamt erhöhter Standardabweichung niedriger als in den Kontrollen (Abb. 20, Tab. 11). Im Verlauf zeigte sich unter Prednisolon-Behandlung eine zunehmende Methylierung von CDO1, während sich in den Kontrollen eher eine gleichbleibende Methylierung zeigte.

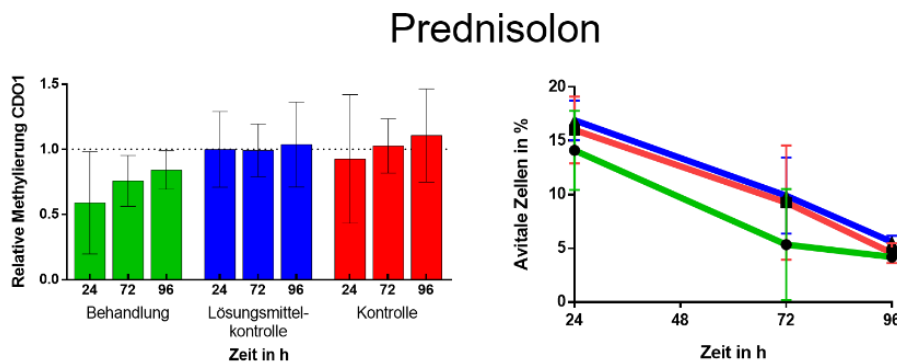


Abb. 20: Zelllinie H1975: Relative Methylierung CDO1 und Anteile avitaler Zellen über 96 h Inkubationszeit unter Prednisolon-Behandlung und Kontrollen. Dargestellt sind die relative Methylierung von CDO1 normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle nach 24 h (links) und der Anteil avitaler Zellen (rechts). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Grün: Prednisolon-Behandlung, Blau: Lösungsmittelkontrolle, Rot: Kontrolle.

4.4.11 Prednisolon-Behandlung der Zelllinie H358

Veränderung der PMR von SEPT9

Bei H358 gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen. Über den Verlauf von 96 h waren die PMR von SEPT9 in allen Gruppen auf demselben gleichbleibenden Niveau, mit Ausnahme der PMR-Werte der Lösungsmittelkontrolle, die im Vergleich nach 24 h leicht erniedrigt und 96 h erhöht waren (Tab. 11).

Veränderung der PMR von SHOX2

Bei H358 ergaben sich keine reproduzierbaren Veränderungen der PMR von SHOX2 unter Prednisolon-Behandlung gegenüber den Kontrollen. Im Verlauf zeigten die behandelten Zellen und die Kontrollzellen eine gleichbleibende PMR über 96 h, die Lösungsmittelkontrolle zeigte eine Zunahme. Eine Interpretation ist hier aufgrund größerer Standardabweichungen erschwert (Tab. 11).

Veränderung der Methylierung von CDO1

Bei H358 war die Methylierung von CDO1 nach 96 h in der Kontrolle bei erhöhter Standardabweichung erhöht. Der Verlauf der Methylierung zeigte in allen Gruppen eine leicht zunehmende Tendenz (Tab. 11).

Tab. 11: Relative PMR und Methylierung aller Biomarker und Zelllinien unter Prednisolon-Behandlung und Kontrollen. PMR der Biomarker SEPT9, SHOX2, PITX2 sowie Methylierung von CDO1 der Zelllinien H1650, H1975 und H358 unter Prednisolon-Behandlung und Kontrollbedingungen. (Die Daten sind normalisiert auf die Lösungsmittelkontrolle (24h) dargestellt; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite).

Zelllinie H1650						
	Prednisolon-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H1650 - SEPT9						
24 h	0,801	0,128	1,000	0,292	0,593	0,088
72 h	0,643	0,140	0,797	0,066	0,705	0,025
96 h	0,783	0,116	0,715	0,028	0,807	0,023
H1650 - SHOX2						
24 h	0,828	0,205	1,000	0,460	1,055	0,677
72 h	1,436	0,871	1,181	0,597	1,078	0,579
96 h	1,036	0,518	1,186	0,570	1,312	0,736
H1650 - PITX2						
24 h	1,156	0,430	1,000	0,377	0,952	0,296
72 h	0,961	0,047	0,876	0,119	0,883	0,079
96 h	0,907	0,106	0,961	0,046	0,968	0,068
H1650 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	1,073	0,323	1,000	0,098	0,978	0,214
72 h	0,896	0,108	0,874	0,126	0,859	0,134
96 h	0,803	0,093	0,960	0,126	0,880	0,081
Zelllinie H1975						
	Prednisolon-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H1975 - SEPT9						
24 h	1,184	0,178	1,000	0,219	1,026	0,161
72 h	0,922	0,130	0,981	0,117	1,010	0,150
96 h	0,933	0,247	1,120	0,116	1,121	0,152
H1975 - SHOX2						
24 h	1,443	0,280	1,000	0,336	1,176	0,340
72 h	1,437	0,231	1,054	0,107	1,321	0,190
96 h	1,498	0,159	1,352	0,126	1,667	0,305
H1975 - PITX2						
24 h	1,394	0,224	1,000	0,501	1,268	0,420
72 h	1,285	0,283	1,154	0,065	1,257	0,181
96 h	1,259	0,077	1,274	0,166	1,332	0,059
H1975 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	0,590	0,393	1,000	0,291	0,927	0,494
72 h	0,758	0,195	0,993	0,202	1,027	0,208
96 h	0,842	0,149	1,037	0,327	1,107	0,358

Zelllinie H358						
	Prednisolon-Behandlung		Lösungsmittelkontrolle		Kontrolle	
Zeit	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.	normalisierte PMR	Std.-Abw.
H358 - SEPT9						
24 h	1,364	0,404	1,000	0,080	1,259	0,138
72 h	1,271	0,174	1,240	0,113	1,154	0,142
96 h	1,275	0,077	1,497	0,257	1,203	0,089
H358 - SHOX2						
24 h	1,114	0,130	1,000	0,090	0,946	0,289
72 h	1,011	0,591	1,646	0,311	1,249	0,168
96 h	0,954	0,167	1,312	0,355	1,071	0,112
H358 - CDO1						
	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.	normalisierte Methylierung	Std.-Abw.
24 h	1,019	0,264	1,000	0,134	0,818	0,118
72 h	1,321	0,256	0,954	0,192	1,426	0,142
96 h	1,132	0,287	1,029	0,099	1,446	0,225

5 Diskussion

Extrazelluläre Nukleinsäuren lassen sich im Überstand von in vitro kultivierten Zellen sowie in verschiedensten Körperflüssigkeiten nachweisen und können hinsichtlich ihres Methylierungsstatus analysiert werden (Fleischhacker und Schmidt 2007; Bronkhorst et al. 2016). Sie dienen damit als vielversprechende Biomarker in der Diagnostik und Therapieüberwachung (Paska und Hudler 2015). Weitestgehend unbekannt ist jedoch, ob und welche Zusammenhänge zwischen Pharmakotherapie und dem Methylierungsstatus der extrazellulären Nukleinsäuren bestehen.

In dieser Arbeit wurde mithilfe eines in vitro Modells unter Verwendung drei humaner Zelllinien untersucht, inwiefern sich der Methylierungsstatus der cfDNA vier verschiedener Gene (SHOX2, SEPT9, PITX2, CDO1) unter Medikamentenbehandlung (Cisplatin, HCT, Ibuprofen und Prednisolon) verhält. Neben dem Chemotherapeutikum Cisplatin wurden exemplarisch Medikamente der alltäglichen Pharmakotherapie zum Beispiel zur Linderung von Übelkeit oder Schmerzen bei Tumorpatienten oder zur Therapie der arteriellen Hypertonie gewählt. Anhand einer Zellzählung wurden zudem Effekte auf die Proliferation und durch eine Apoptose-Messung Effekte auf den Zelluntergang analysiert. Die Untersuchung des Methylierungsstatus der Biomarker erfolgte nach einer Bisulfit-Konversion von cfDNA mittels qPCR.

5.1 Proliferation und Zelluntergang

Unter Cisplatin- und Ibuprofen-Behandlung wurde bei allen Zelllinien eine Wachstumshemmung beobachtet, wohingegen sich bei HCT- und Prednisolon-Behandlung keine Unterschiede in der Proliferation (verglichen mit den Kontrollen) zeigten.

Die Beobachtung, dass die Wachstumshemmung bei Behandlung mit Ibuprofen stärker ausfiel als mit Cisplatin war überraschend, da Cisplatin ein gängiges Chemotherapeutikum ist, das durch Bindung an Nukleinsäuren-Untereinheiten und Hemmung des DNA-Stoffwechsels vor allem auf stark proliferierende Zellen zytotoxisch wirkt (Lüllmann et al. 2010). Zu berücksichtigen bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch, dass, bezogen auf die in der Praxis verwendeten therapeutischen Plasmakonzentrationen dieser Medikamente, für die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum (Cisplatin) in den Versuchen dieser Arbeit eine deutlich geringere Konzentration (0,1-fache Plasmakonzentration) als für die anderen drei Medikamente (jeweils 10-fache Plasmakonzentrationen) verwendet wurde. Eine geringere Cisplatin-Konzentration war notwendig, um sowohl für die durchflusszytometrische Analyse als auch für die Freisetzung extrazellulärer Nukleinsäuren in den Überstand genügend Zellen zur Verfügung zu haben, was wiederum bei 10-facher sowie bei 1-facher Cisplatin-Konzentration nicht der Fall war. Die 10-fach erhöhte Konzentration an Ibuprofen hatte offensichtlich einen stärker inhibierenden Einfluss auf das Wachstum der kultivierten Lungenkrebszellen als Cisplatin in der 0,1-fachen Konzentration. Auch Lichtenberger et al.

beschrieben einen inhibierenden Effekt von non-steroidal-anti-inflammatory-drugs (NSAID), zu denen auch Ibuprofen gehört, auf das Wachstum von kultivierten murinen Kolonkrebiszellen (Lichtenberger et al. 2018). Ebenso konnte ein inhibierender Effekt durch NSAID (Aspirin und Indometacin) auf das Zellwachstum bei Brustkrebiszellen beobachtet werden (Burge und Lichtenberger 2019). Die Beobachtungen hinsichtlich der Wachstumsinhibition in Zusammenhang mit NSAID-Behandlung im Rahmen dieser Arbeit decken sich insofern mit der Literatur. Zudem wurde zuvor in verschiedenen Studien ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von NSAID und einer Risikoreduktion an Krebs zu erkranken beobachtet. Insbesondere wurde dies bei der Entwicklung von Darm-, Brust-, Lungen- oder Prostatakrebs beschrieben (Harris et al. 2005).

In den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit zeigte die Zelllinie H1975 unter Cisplatin-Behandlung eine schnellere und deutlichere Wachstumshemmung als die Zelllinien H1650 und H358 (allerdings war diese immer noch schwächer als unter Ibuprofen-Behandlung). Neben der niedrigeren Konzentration des Chemotherapeutikums Cisplatin und des wachstumsinhibierenden Effektes von NSAID stellt sich außerdem die Frage, ob eventuell Wachstum-stimulierende Mutationen der Tumorzellen eine Rolle spielen könnten. Frühere Studien konnten zeigen, dass unter anderem verschiedene aktivierende Mutationen des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Einfluss auf das Therapieansprechen und die Tumorprogression bei Lungenkrebs haben (Jänne und Johnson 2006). Der EGFR ist ein Transmembran-Protein mit zytoplasmatischer Kinase-Aktivität, welches wichtige Signale des Wachstumsfaktor-Signalweges aus dem extrazellulären Milieu in die Zelle weiterleitet. Manche Tumore besitzen aktivierende Mutationen in der Tyrosin-Kinase-Domäne des EGFR-Gens. Als Ergänzung oder Alternative zur Platin-basierten Chemotherapie zeigte die Gabe von Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) signifikante Vorteile bei Patienten mit diesen aktivierenden Mutationen im Vergleich zu denjenigen ohne (Jänne und Johnson 2006; da Cunha Santos et al. 2011). In der Literatur findet sich für den EGFR-Mutationsstatus für die in diesem Experiment verwendeten Zelllinien bei H1650 eine Deletionsmutation im Exon 19, bei H1975 Mutationen im Exon 20 und 21, bei H358 ein EGFR-Wildtyp (Chen et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen insofern keinen Zusammenhang mit den aktivierenden EGFR-Mutationen (H1650 und H1975) erkennen. Primär scheint hier daher die niedrigere Konzentration von Cisplatin Ursache der unterschiedlichen Proliferation nach Cisplatin- und Ibuprofen-Behandlung zu sein.

Hinsichtlich der Anteile avitaler Zellen zeigten sich Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen vor allem bei der Zelllinie H1975: Die Cisplatin-Behandlung ging mit einem leicht erhöhten Anteil avitaler Zellen einher, die Prednisolon- und HCT-Behandlung hingegen mit einem leicht verringertem Anteil avitaler Zellen. Bei Ibuprofen gab es keine Unterschiede. Bei

den anderen beiden Zelllinien zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede im Zelluntergang im Vergleich zu den Kontrollen.

Zum Teil waren auch bei den Apoptose-Messungen zum Zelluntergang Ausreißer und dadurch bedingt große Standardabweichungen zu beobachten. So lag bei H358 sowohl bei Prednisolon- und HCT-Behandlung als auch in den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen der Anteil avitaler Zellen nach 72 h höher als in der Kontrolle (Medium ohne weitere Zusätze). Es gilt jedoch als äußerst unwahrscheinlich, dass dieser Effekt auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist, da alle drei Medikamente (HCT, Ibuprofen und Prednisolon) in Ethanol gelöst wurden. Bei der Ibuprofen-Behandlung wurden allerdings keine einheitlichen Unterschiede zwischen Medikamentenbehandlung und Lösungsmittelkontrolle im Vergleich zur Kontrolle (Medium ohne weitere Zusätze) beobachtet, obwohl im Versuch für Ibuprofen absolut eine deutlich größere Ethanolmenge verwendet wurde (Tab. 2).

5.2 cfDNA im Überstand

Durch die Messung des Referenzgens ACTB mittels qPCR wurde die Menge an cfDNA im Kulturüberstand bestimmt. Es konnte im Zeitverlauf eine ansteigende Konzentration der cfDNA detektiert werden, welche interessanterweise für alle Zelllinien unabhängig vom Anteil avitaler Zellen war. Hier konnte also kein direkter Zusammenhang zwischen der Freisetzung von cfDNA und dem Zelluntergang beobachtet werden. Der Freisetzung von cfDNA liegen demzufolge größtenteils andere Ursachen zugrunde, wie möglicherweise eine in der Literatur oft diskutierte aktive Freisetzung (Stroun und Anker 1971; Bronkhorst et al. 2016; Wang et al. 2017; Aucamp et al. 2018). Anhand von in vitro Untersuchungen an humanen Osteosarkomzellen (143B) konnten Bronkhorst et al. mithilfe von Next-Generation-Sequencing beobachten, dass ein Großteil der im Zellüberstand nachgewiesenen cfDNA vermutlich aus sekundären nukleären Strukturen, sogenannten Mikronuklei, stammt (Bronkhorst et al. 2018): Über eine fehlerhafte Chromosomenteilung, die durch Hypomethylierungen und daraus resultierender Transposon-Aktivierung mit DNA-Doppelstrangbrüchen oder strukturellen Veränderungen entsteht, kommt es zur Bildung von DNA-Fragmenten in Form von Mikronuklei. Diese werden schließlich als nukleärer „envelope“ aus der Zelle geschleust. Des Weiteren gibt es Berichte über die Detektion von extrazellulären extrachromosomalen Nukleinsäuren in Form von zirkulärer DNA im Blutplasma von Mäusen und Menschen. Analysen dieser heterogenen Gruppe von zirkulärer DNA wiesen auf Sequenzlängen von 30-20000 bp hin, welche damit größer sind als die typischerweise bei Apoptose freiwerdenden Sequenzen (Kumar et al. 2017; Wang et al. 2017). Dies zeigt, dass die Annahme extrazelluläre Nukleinsäuren würden vor allem aus der Apoptose stammen kritisch hinterfragt werden muss (Bronkhorst et al. 2018).

Bei der Behandlung mit Cisplatin und Ibuprofen wurde eine stärkere Zunahme der Freisetzung von cfDNA pro 10^5 Zellen beobachtet, vor allem nach 72 - 96 h Inkubation, obwohl der Anteil avitaler Zellen in den Behandlungs- und Kontrollgruppen in diesem Zeitraum keinen Unterschied aufwies. Der Effekt dieser beiden Medikamente könnte hier möglicherweise durch Wachstumshemmung bedingt sein, da sich auch in den Wachstumskurven der Zelllinien unter diesen Behandlungen ein geringerer Anstieg der Zellzahl über die Zeit beobachten ließ. In vitro Untersuchungen zur Freisetzung von cfDNA an Brustkrebszellen haben gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der cfDNA-Konzentration und dem Anteil von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus besteht. Je mehr Zellen in der G₁-Phase detektiert wurden, desto mehr cfDNA wurde im Überstand gemessen. Eine zunehmende cfDNA-Konzentration ist demnach nicht mit dem Prozess der DNA-Replikation assoziiert, sondern Folge einer aktiven Freisetzung durch differenzierte Zellen, da diese vermehrt in der G₁-Phase verharren (Wang et al. 2017). Auch wenn in diesen Experimenten die Zellwachstumshemmung nicht einer bestimmten Veränderung des Zellzyklus zugeordnet werden kann, unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit dennoch die Hypothese, dass es neben der Apoptose andere Mechanismen gibt, die zur Freisetzung von cfDNA beitragen. Auch Rostami et al. postulierten aufgrund von Untersuchungen zur Kinetik der cfDNA-Freisetzung, dass dieser keine einheitlichen Signalwege zugrunde liegen. Sie vermuten, dass unterschiedliche exogene Stimuli (zum Beispiel Chemotherapie oder Bestrahlung) verschiedenartige Mechanismen der cfDNA-Freisetzung aktivieren können, die zu einer frühen oder späten cfDNA-Freisetzung führen. Diese verschiedenartigen Mechanismen als Antworten auf exogene Stimuli spielen damit eine wichtige Rolle hinsichtlich des Zeitpunktes der cfDNA-Freisetzung (Rostami et al. 2020). Insgesamt gibt es laut einer detaillierten Übersichtsarbeit von Aucamp et al. keinen einheitlichen Mechanismus oder eine alleinige Quelle, die für cfDNA bei Säugetieren als hauptverantwortlich angesehen werden kann. Vielmehr wurde eine Vielzahl verschiedener potentieller Quellen und Ursachen von cfDNA ausgemacht, die letztlich cfDNA sowohl über zellulären Untergang als auch über aktive Mechanismen freisetzen können und sich darüber hinaus gegenseitig beeinflussen (Aucamp et al. 2018).

5.3 Einfluss der Medikamentenbehandlung und des Zellunterganges auf die Methylierung cfDNA der untersuchten Gene

Vor allem die hier untersuchten Medikamente, die auf Ebene der DNA agieren (Cisplatin, Prednisolon), scheinen einen Einfluss auf den Methylierungsstatus der cfDNA im Überstand der kultivierten Zellen zu haben. Hier zeigten sich am häufigsten Veränderungen der prozentualen Methylierung. Zusammengefasst wirkt Cisplatin zytotoxisch durch Bindung an Nukleinsäuren-Untereinheiten und Hemmung des DNA-Stoffwechsels (Lüllmann et al. 2010). Glukokortikoide wie Prednisolon haben mannigfaltige Wirkungen, unter anderem bei der

Förderung der Glukoneogenese oder der Modulation antiinflammatorischer Prozesse. Es werden nicht-genomische von genomischen Effekten unterschieden. Zum genomischen Effekt der Glukokortikoide zählt die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, die eine verminderte Expression zahlreicher relevanter Gene, zum Beispiel für Entzündungsvorgänge, bewirkt (Lüllmann et al. 2010).

Die Behandlung mit HCT ließ insgesamt bei keinem der vier untersuchten Gene deutliche Veränderungen der prozentualen Methylierung beobachten, sodass hier davon ausgegangen werden kann, dass eine HCT-Behandlung den Methylierungsstatus von humanen Lungenkrebszellen nicht wesentlich beeinflusst. Der Wirkmechanismus des Diuretikums HCT besteht in der Inhibition des luminalen Natrium-Chlorid-Cotransporters (NCC) im distalen Tubulus, in hohen Dosen auch in der Inhibition der Carboanhydrase im proximalen Tubulus der Niere. Beide Transporter spielen eine Rolle in der Regulierung des Elektrolythaushaltes (Lüllmann et al. 2010). Das Vorkommen des NCC ist bislang nur in der Niere beschrieben (McCormick und Ellison 2015), die Carboanhydrase kommt unter anderem auch in Lungengewebe vor (Waheed und Sly 2014). Eine HCT-Wirkung an Lungenkrebszellen wäre demzufolge über die Carboanhydrase möglich.

Unter Ibuprofen Behandlung kam es nur bei einzelnen Zelllinien bei einem der vier untersuchten Gene zu Veränderungen der Methylierung. Der zentrale Wirkmechanismus von NSAID, wie Ibuprofen, besteht in einer Hemmung der Cyclooxygenase (COX) 1 und 2, welche Schlüsselenzyme der Prostaglandin-Synthese sind (Hirata et al. 1997). Die unter Ibuprofen-Behandlung nur isoliert an einzelnen Zelllinien beobachteten Phänomene lassen offen, ob es sich um generelle Veränderungen oder vielmehr um zelllinienspezifische Effekte handelt.

Zu den Limitationen dieser Experimente zählt, dass es bei den Messungen des Methylierungsstatus generell hohe Standardabweichungen gab. Die qPCR-Messungen waren aufgrund teilweise geringer Mengen an cfDNA störanfällig. Dies galt besonders für die Messungen des Gens CDO1, dessen cfDNA-Methylierung bei den Zelllinien H1975 und H358 generell < 5 % betrug, sodass nur sehr geringe absolute Veränderungen der Methylierung dargelegt wurden. Es sind insgesamt zwar Trends zu beobachten, die jedoch teils durch Ausreißer bedingt waren. Die Anzahl der biologischen Replikate zu diesem Experiment ist mit $n = 2$ für eine statistische Analyse nicht ausreichend.

Der Zelluntergang scheint in den Versuchen zumindest für die Zelllinien H1650 und H358 keinen eindeutigen Zusammenhang mit einer Veränderung der Methylierung zu haben. Die Zelllinie H1975 zeigte am häufigsten Assoziationen zwischen veränderten Mengen avitaler Zellen und einem veränderten Methylierungsstatus der vier Gene im Überstand. Es lässt sich daher vermuten, dass es bei verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Tendenzen zur

Freisetzung extrazellulärer Nukleinsäuren gibt: Während wir für zwei Zelllinien (H1650, H358) keinen Zusammenhang zwischen Zelluntergang und Veränderungen der prozentualen Methylierung beobachten konnten, lassen die Beobachtungen der dritten Zelllinie (H1975) vermuten, dass ein vermehrter Zelluntergang einen Einfluss auf den Methylierungsstatus haben könnte.

Die drei hier untersuchten Zelllinien stammen von unterschiedlichen Individuen. Auch zuvor zeigten verschiedene Untersuchungen erhebliche interindividuelle Schwankungen der cfDNA-Konzentrationen im Plasma von Tumorpatienten, sowie auch im Plasma von gesunden Probanden oder schwangeren Patientinnen (Zhong et al. 2000; Jahr et al. 2001). Insgesamt sind Untersuchungen extrazellulärer Nukleinsäuren durchaus komplex, da selbst bei in vitro Experimenten, welche ein stark vereinfachtes zelluläres System darstellen, bei verschiedenen Zelllinien grundlegende Unterschiede in der Freisetzung der cfDNA beobachtet werden.

Ob die in diesen Experimenten gemessene Mengenänderung der Methylierung der cfDNA, die vorwiegend in der Zelllinie H1975 beobachtet wurde, primär durch Cisplatin- oder Prednisolon-Behandlung hervorgerufen wurde oder durch sekundäre Effekte, durch Veränderungen in Proliferation und/oder Zelluntergang, lässt sich anhand der hier durchgeführten Experimente nicht ursächlich klären.

5.3.1 Methylierung von SHOX2

Für den Methylierungsstatus von SHOX2 zeigten sich vor allem unter Behandlung mit den Medikamenten Cisplatin und Prednisolon Veränderungen in der PMR über verschiedene Zelllinien hinweg. So konnten für die Behandlung mit diesen Medikamenten Veränderungen bei zwei Zelllinien (H1650, H1975) beobachtet werden.

Der veränderte Methylierungsstatus von SHOX2 schien für H1650 unabhängig vom Zelluntergang, aber mit der Medikamentenbehandlung durch Cisplatin und Prednisolon assoziiert zu sein. So führte eine Cisplatin-Behandlung nach 24 h zu einer Erhöhung der PMR von SHOX2, eine Prednisolon-Behandlung nach 24 h zu einer Verminderung. Bei H1975 gab es ebenfalls Veränderungen der PMR von SHOX2 unter Cisplatin- und Prednisolon-Behandlung zu beobachten, diese schienen jedoch gleichzeitig mit dem Zelluntergang assoziiert zu sein. Bei H1975 kam es unter der Behandlung mit Cisplatin zu einer verminderten PMR von SHOX2 sowie einem geringfügig erhöhten Anteil avitaler Zellen. Unter der Behandlung mit Prednisolon schien es einen Zusammenhang zu einer erhöhten PMR von SHOX2 sowie einem erniedrigten Anteil avitaler Zellen zu geben.

In einer klinischen Pilotstudie wurde beobachtet, dass sich bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom (NSCLC und SCLC), die eine standardmäßige Platin-basierte Kombinationschemotherapie erhielten, die Plasmaspiegel von methyliertem SHOX2 verringerten, wenn die Patienten im Verlauf ein Therapieansprechen zeigten (Schmidt et al. 2015). In dieser Arbeit

wurden die Lungenkrebszellen mit Cisplatin, einem Teil der Standardtherapie, behandelt. Aufgrund verminderter Wachstumsrate sowie erhöhter Rate avitaler Zellen ist hier übertragbar von einem „Therapieansprechen“ auszugehen. Die Resultate der Zelllinie H1975 stützen daher die Beobachtung der klinischen Daten (einer Abnahme der PMR von SHOX2 unter Cisplatin-Therapie). Bei der Zelllinie H1650 wurde hingegen ein leichter Anstieg der PMR von SHOX2 beobachtet. Im Einklang dazu wurde bei dieser Zelllinie jedoch auch kein „Therapieansprechen“ im Sinne einer deutlich verminderten Proliferation und erhöhtem Anteil avitaler Zellen beobachtet. Li et al. beschrieben im Rahmen von in vitro Untersuchungen zur Cisplatin-Resistenz bei Lungenkrebszellen (NSCLC) und ovariellen Krebszellen, dass es durch eine langfristige Cisplatin-Exposition zur Hypermethylierung der Promotorregion des SOX1-Gens und daraus resultierender Geninaktivierung kommt, was zum Teil eine Cisplatin-Resistenz erklären könne (Li et al. 2013). Dies unterstützt die Hypothese dieser Arbeit, dass eine Cisplatin-Behandlung zu einer Veränderung der Methylierung von Genen führen kann. Zusammenfassend scheint eine Beeinflussung des Methylierungsstatus der cfDNA von SHOX2 bei kultivierten Lungenkrebszellen durch die Medikamente Cisplatin und Prednisolon möglich. Hingegen kann durch die Behandlung mit HCT und Ibuprofen kein eindeutiger Effekt auf die PMR von SHOX2 nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei den unter HCT- und Ibuprofen-Behandlung vereinzelt aufgetretenen Veränderungen bei H1975 und H358 eher um zelllinienspezifische Phänomene handelt, die in den anderen untersuchten Zelllinien nicht nachweisbar waren.

5.3.2 Methylierung von SEPT9

Die Untersuchungen zur Veränderung der Methylierung des Gens SEPT9 ergaben nur bei der Zelllinie H1975 und Behandlung mit Cisplatin und Prednisolon relevante Veränderungen der PMR. Die veränderte PMR war hier ebenfalls mit einer veränderten Menge avitaler Zellen assoziiert. In Einklang mit den Methylierungsveränderungen der cfDNA des Gens SHOX2 wurde auch hier nach Cisplatin-Behandlung eine verminderte PMR von SEPT9 und ein erhöhter Zelluntergang gemessen, wohingegen nach Prednisolon-Behandlung eine erhöhte PMR von SEPT9 und ein geringerer Zelluntergang beobachtet wurde.

Bislang konnten Untersuchungen verschiedener Gene im Zusammenhang mit einer Prednisolon-Behandlung keine Veränderungen des Methylierungsstatus zeigen. Trotz der Tatsache, dass Prednisolon eine Veränderung der Expression einzelner Gene (u.a. MDR1, BAX, BCL2) bewirkt, zeigten sich keine Veränderungen der Methylierung der zellulären DNA dieser Gene (Zadi Heydarabad et al. 2018; Ganbarjeddi et al. 2020). Lee et al. untersuchten das globale Methylierungsmuster des Genoms mononukleärer peripherer Blutzellen von Patienten mit einer akuten Exazerbation einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und verglichen dabei Patienten mit einem guten und schlechten Therapieansprechen unter

standardmäßiger Prednisolon-Therapie miteinander. Es zeigten sich zwischen den beiden Gruppen signifikant unterschiedliche Methylierungsmuster (Lee et al. 2018). Dies könnte darauf hinweisen, dass auch bei verschiedenen Zelllinien, die von verschiedenen Individuen stammen, generell unterschiedliche Methylierungsmuster des Genoms vorliegen, die per se ein unterschiedliches Verhalten auf äußere Stimuli (zum Beispiel eine Medikamentenbehandlung) aufweisen. Annahmen zu Methylierungsmustern, die im zellulären Genom festgestellt wurden, werden vermutlich ebenfalls für freigesetzte extrazelluläre Nukleinsäuren gelten. Es konnte hierzu gezeigt werden, dass bei in vitro kultivierten Tumorzellen das Methylierungsmuster ausgewählter Gene der cfDNA identisch zur korrespondierenden genomischen DNA war. Ebenso konnten medikamentös (durch 5-azacytidine) herbeigeführte Veränderungen der DNA-Methylierung sowohl auf genomischer Ebene als auch in der cfDNA nachgewiesen werden (Panagopoulou et al. 2019).

In Summe zeigte sich in diesen Experimenten jedoch, dass mit großer Wahrscheinlichkeit die Behandlung mit HCT und Ibuprofen keine Veränderungen der Methylierung der cfDNA von SEPT9 bei Lungenkrebszellen zur Folge hat, da bei keiner der untersuchten Zelllinien Veränderungen des Methylierungsstatus festgestellt wurden. Da sich die Effekte unter Cisplatin und Prednisolon nur bei einer Zelllinie zeigen ließen, ist es auch möglich, dass es sich dabei lediglich um Effekte der Zelllinie H1975 handelt, dennoch ist ein Effekt auf eine veränderte Methylierung der cfDNA von SEPT9 durch diese beiden Medikamente möglich.

5.3.3 Methylierung von PITX2

Das Gen PITX2 lag wie in Kap. 4.4 erwähnt nur bei den Zelllinien H1650 und H1975 methyliert vor. Bezüglich des Methylierungsstatus von PITX2 hat eine Behandlung mit HCT und Prednisolon keinen Einfluss auf die PMR von PITX2 in humanen Lungenkrebszellen, da sich bei den untersuchten Zelllinien zwischen Behandlung und Kontrollen keine wesentlichen Veränderungen der PMR von PITX2 zeigten. Eine Cisplatin- und Ibuprofen-Behandlung könnte jedoch den Methylierungsstatus der cfDNA von PITX2 bei Lungenkrebszellen beeinflussen, da eine Behandlung mit Cisplatin und Ibuprofen in diesen Experimenten mit Veränderungen des Methylierungsstatus von PITX2 assoziiert war. Bei H1975 war unter Cisplatin-Behandlung die PMR von PITX2 erhöht, unter Ibuprofen-Behandlung war sie vermindert.

Wie zuvor genannt wirken NSAID, wie Ibuprofen, über eine Hemmung der Schlüsselenzyme (COX 1 und 2) der Prostaglandin-Synthese. In einer früheren Studie wurde ein Kontext zwischen einem Effekt von Prostaglandin-E₂ (PGE₂) auf eine zunehmende DNA-Methylierung bei Lungenfibroblasten beschrieben (Huang et al. 2012). Ähnliches konnte in Untersuchungen an humanen malignen embryonalen Karzinomzellen gezeigt werden: Durch Analgetika oder PGE₂-Antagonismus kam es zu einer Verminderung der Genexpression von DNA-

Methyltransferasen, der Schlüsselenzyme für epigenetische Veränderungen, und somit zur Änderung der DNA- und Histonmethylierung (Hurtado-Gonzalez et al. 2018).

Insofern scheint eine Verminderung der Methylierung der cfDNA von PITX2 bei Lungenkrebszellen unter Ibuprofen-Behandlung durchaus denkbar. Da die Veränderungen allerdings nur in einer Zelllinie gezeigt werden konnten, ist eine Interpretation, inwiefern es sich hier um einen verallgemeinerbaren Effekt und nicht nur um einen zelllinienspezifischen handelt, nicht möglich.

5.3.4 Methylierung von CDO1

Die Untersuchungen zur Methylierung von CDO1 lassen vermuten, dass unter HCT- und Ibuprofen-Behandlung keine Veränderungen hinsichtlich des Methylierungsstatus der cfDNA von CDO1 bei humanen Lungenkrebszellen zu erwarten sind. Unter der Behandlung mit Prednisolon zeigten die Zelllinien H1650 und H1975 in der Tendenz Veränderungen der Methylierung von CDO1, unter Cisplatin-Behandlung zeigte lediglich die Zelllinie H358 Veränderungen. Allerdings ließen sich die unterschiedlichen Veränderungen nicht einheitlich über die verschiedenen Zelllinien hinweg beobachten. Daher lassen die hier nur isoliert an einzelnen Zelllinien beobachteten Phänomene unter Prednisolon- und Cisplatin-Behandlung offen, ob es sich um generelle Veränderungen handelt oder vielmehr um nur bei diesen Zelllinien aufgetretene Effekte. Weitere Experimente mit anderen Zelllinien, die einen höheren Methylierungsgrad von CDO1 aufweisen, sind erforderlich um Veränderungen der Methylierung von CDO1 durch Medikamente oder Zelluntergang zu belegen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei allen untersuchten Medikamenten über alle Lungenkrebszelllinien hinweg unterschiedliche Veränderungen im Methylierungsstatus der cfDNA zu beobachten waren. Ein einheitliches Muster ließ sich hieraus nicht ableiten. Es zeigten sich jedoch unter der Behandlung mit den Medikamenten Cisplatin und Prednisolon bei zwei Zelllinien (H1650, H1975) Trends, die eine quantitative Veränderung der Methylierung der cfDNA von SHOX2 nahelegen. Der Zelluntergang schien hierbei für die Zelllinien H1650 keine Rolle zu spielen. Eine HCT-Behandlung der untersuchten Zelllinien führte zu keiner deutlichen Veränderung der Methylierung der cfDNA der untersuchten Gene. Die Ibuprofen-Behandlung zeigte nur bei einzelnen Zelllinien Effekte, die durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müssen.

Über den Ursprung, die biologische Funktion und Zusammensetzung cfDNA ist bisher wenig bekannt (Bronkhorst et al. 2018; Grabuschig et al. 2020). Obwohl es verschiedene Studien

zu qualitativen und quantitativen Veränderungen der Methylierung genomischer DNA durch eine Pharmakotherapie gibt, sind Methylierungsmuster von cfDNA im Kontext einer Pharmakotherapie bisher kaum Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Auch wenn es insbesondere in Bezug auf die hier untersuchten Biomarker kaum Daten dazu gibt, unterstützen die Resultate dieser Arbeit die Hypothese, dass eine Pharmakotherapie möglicherweise auch die Methylierungsmuster von cfDNA beeinflussen kann. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen um sichere Aussagen darüber treffen zu können und die komplexen Zusammenhänge zu verstehen. Diese Untersuchungen zu Effekten einer medikamentösen (Begleit-) Therapie auf den Methylierungsgrad und die Freisetzung von cfDNA könnten einen wichtigen Beitrag dazu leisten, die Aussagekraft von cfDNA als Biomarker in der klinischen Diagnostik und Therapieüberwachung zu präzisieren. Da (Tumor-) Patienten, bei denen diese Biomarker eingesetzt werden sollen, in aller Regel eine begleitende Pharmakotherapie erhalten, könnte diese als potentielle Störgröße einkalkuliert werden.

6 Zusammenfassung

Extrazelluläre Nukleinsäuren aus dem Überstand von in vitro kultivierten Zellen und aus Körperflüssigkeiten können hinsichtlich ihres Methylierungsstatus untersucht werden und dienen als vielversprechende Biomarker in der Diagnostik und Therapieüberwachung von Tumorerkrankungen. Allerdings sind die Mechanismen der Freisetzung von cfDNA immer noch nicht umfassend untersucht. Tumorpatienten erhalten in aller Regel neben der Tumorthherapie eine zusätzliche Pharmakotherapie zur Behandlung von Komorbiditäten. Der Einfluss dieser zusätzlichen Therapie auf die Methylierung von Biomarkern ist derzeit unklar. Daher wurde in dieser Arbeit die Frage untersucht, ob eine Pharmakotherapie Einfluss auf die Methylierung von cfDNA haben kann. Hierzu wurden drei humane Lungenkrebszelllinien (H1650, H1975 und H358) mit ausgewählten Medikamenten (Cisplatin, HCT, Ibuprofen und Prednisolon), welche häufig in dieser Patientengruppe eingesetzt werden, behandelt. Die Proliferation wurde mittels Zellzählung quantifiziert, der prozentuale Anteil avitaler Zellen durch eine FACS-Analyse bestimmt und der Methylierungsstatus cfDNA ausgewählter Gene (SEPT9, SHOX2, PITX2 und CDO1) im Kulturüberstand wurde nach Bisulfit-Konversion mittels qPCR gemessen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei allen untersuchten Medikamenten über alle Lungenkrebszelllinien hinweg verschiedene Veränderungen im Methylierungsstatus der cfDNA der untersuchten Gene im Kulturüberstand auftraten. Ein einheitliches Muster ließ sich aus den Ergebnissen nicht ableiten. Es zeigten sich jedoch unter der Behandlung mit den Medikamenten Cisplatin und Prednisolon bei zwei Zelllinien (1650, H1975) ähnliche Trends hinsichtlich einer quantitativen Veränderung der Methylierung des Gens SHOX2, was einen möglichen Zusammenhang zwischen der Methylierung von SHOX2 und der Behandlung mit diesen Medikamenten nahelegt. Effekte in Bezug auf eine Veränderung der Methylierung der Gene SEPT9, PITX2 und CDO1 ließen sich hier nur an einzelnen Zelllinien und mit unterschiedlicher Medikamentenbehandlung (vor allem Cisplatin und Prednisolon) zeigen, ein einheitliches Muster stellte sich auch hier nicht dar. Eine HCT-Behandlung der vier verwendeten Zelllinien zeigte bei keinem der untersuchten Gene einen deutlichen Einfluss auf die Methylierung, was vermuten lässt, dass eine Behandlung mit HCT generell keinen Einfluss auf die Methylierung von cfDNA in humanen Lungenkrebszellen hat. Grundsätzlich weisen die erzielten Ergebnisse darauf hin, dass die verwendeten Zelllinien unterschiedliches Verhalten in Bezug auf eine Veränderung der Methylierung unter Pharmakotherapie zeigen. Unter Berücksichtigung des Zellunterganges konnte nur bei der Zelllinie H1975 ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der Methylierung und verändertem Zelluntergang beobachtet werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es im Zeitverlauf der Zellkultivierung zu einer generellen Zunahme der cfDNA-Konzentration im Überstand der kultivierten Lungenkrebszellen kam, insbesondere für wachstumshemmende Medikamente wie Cisplatin und Ibuprofen. Es schien hier aber kein Zusammenhang zwischen vermehrter Freisetzung von cfDNA und vermehrtem Zelluntergang zu bestehen, was darauf hindeutet, dass neben dem Zelluntergang andere Mechanismen, wie eine aktive Freisetzung, zum Anstieg der cfDNA-Konzentration beitragen könnten.

Über die ursächlichen Mechanismen der Freisetzung von cfDNA, ihre biologische Funktion, sowie einen möglichen Zusammenhang einer Pharmakotherapie mit epigenetischen Veränderungen der cfDNA ist bislang wenig bekannt. Obwohl es Untersuchungen zu Veränderungen von Methylierungsmustern unterschiedlicher Gene auf genomischer DNA-Ebene im Kontext einer Pharmakotherapie gibt, sind aktuell wenige Daten hinsichtlich der Veränderung der Methylierung von cfDNA bekannt. Auch wenn es mit Blick auf die hier untersuchten Biomarker nur wenige publizierte Daten gibt, unterstützen die Resultate dieser Arbeit die Hypothese, dass eine Pharmakotherapie vor allem mit Cisplatin und Prednisolon möglicherweise die Methylierung von cfDNA beeinflussen kann. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen mit zusätzlichen Medikamenten, anderen Zelllinien und einer größeren Anzahl biologischer Replikate um sichere Aussagen darüber treffen zu können. Dies würde dazu beitragen die Aussagekraft von Biomarkern, die auf den Nachweis von extrazellulären Nukleinsäuren in Körperflüssigkeiten zielen („liquid biopsy“), in der klinischen Diagnostik und Therapieüberwachung zu verbessern. So könnte dann eine Pharmakotherapie als potentielle Störgröße mit berücksichtigt werden.

7 Literaturverzeichnis

Adams, D. H.; Diaz, N.; Gahan, P. B. (1997): In vitro stimulation by tumour cell media of 3H-thymidine incorporation by mouse spleen lymphocytes. In: *Cell biochemistry and function* 15 (2), S. 119–126. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0844(19970601)15:2<119::AID-CBF731>3.0.CO;2-C.

Anker, Philippe; Stroun, Maurice; Jachertz, D.; Maurice, Pierre A. (1980): Transfert d'information de lymphocytes T à B au cours d'une réponse immune. Rôle de l'ADN extracellulaire. In: *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 110 (40), S. 1444–1446.

Anker, Philippe; Stroun, Maurice; Maurice, Pierre A. (1975): Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. In: *Cancer research* 35 (9), S. 2375–2382.

ATCC (Hg.) (2021a): NCI-H1650 [H-1650, H1650] (ATCC® CRL-5883™). American Type Culture Collection. Online verfügbar unter <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-5883.aspx>, zuletzt geprüft am 16.04.2021.

ATCC (Hg.) (2021b): NCI-H1975 [H-1975, H1975] (ATCC® CRL-5908™). American Type Culture Collection. Online verfügbar unter <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-5908.aspx>, zuletzt geprüft am 16.04.2021.

ATCC (Hg.) (2021c): NCI-H358 [H-358, H358] (ATCC® CRL-5807™). American Type Culture Collection. Online verfügbar unter <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-5807.aspx>, zuletzt geprüft am 16.04.2021.

Aubele, Michaela; Schmitt, Manfred; Napieralski, Rudolf; Paepke, Stefan; Ettl, Johannes; Absmaier, Magdalena et al. (2017): The Predictive Value of PITX2 DNA Methylation for High-Risk Breast Cancer Therapy. Current Guidelines, Medical Needs, and Challenges. In: *Disease markers* 2017, S. 4934608. DOI: 10.1155/2017/4934608.

Aucamp, Janine; Bronkhorst, Abel J.; Badenhorst, Christoffel P. S.; Pretorius, Piet J. (2018): The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. In: *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 93 (3), S. 1649–1683. DOI: 10.1111/brv.12413.

Behrouz Sharif, Shahin; Hashemzadeh, Shahriar; Mousavi Ardehaie, Reza; Eftekharsadat, Amirtaher; Ghojzadeh, Mortaza; Mehrtash, Amir Hossein et al. (2016): Detection of aberrant methylated SEPT9 and NTRK3 genes in sporadic colorectal cancer patients as a potential diagnostic biomarker. In: *Oncology letters* 12 (6), S. 5335–5343. DOI: 10.3892/ol.2016.5327.

Bergheim, Julia; Semaan, Alexander; Gevensleben, Heidrun; Groening, Susanne; Knoblich, Andreas; Dietrich, Jörn et al. (2018): Potential of quantitative SEPT9 and SHOX2 methylation

in plasmatic circulating cell-free DNA as auxiliary staging parameter in colorectal cancer. A prospective observational cohort study. In: *British journal of cancer* 118 (9), S. 1217–1228. DOI: 10.1038/s41416-018-0035-8.

Berry, Fred B.; Lines, Matthew A.; Oas, J. Martin; Footz, Tim; Underhill, D. Alan; Gage, Philip J.; Walter, Michael A. (2006): Functional interactions between FOXC1 and PITX2 underlie the sensitivity to FOXC1 gene dose in Axenfeld-Rieger syndrome and anterior segment dysgenesis. In: *Human molecular genetics* 15 (6), S. 905–919. DOI: 10.1093/hmg/ddl008.

Blaschke, R. J.; Monaghan, A. P.; Schiller, S.; Schechinger, B.; Rao, E.; Padilla-Nash, H. et al. (1998): SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5), S. 2406–2411.

Bronkhorst, Abel J.; Ungerer, Vida; Diehl, Frank; Anker, Philippe; Dor, Yuval; Fleischhacker, Michael et al. (2021): Towards systematic nomenclature for cell-free DNA. In: *Human genetics* 140 (4), S. 565–578. DOI: 10.1007/s00439-020-02227-2.

Bronkhorst, Abel Jacobus; Wentzel, Johannes F.; Aucamp, Janine; van Dyk, Etresia; Du Plessis, Lissinda; Pretorius, Piet J. (2016): Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1863 (1), S. 157–165. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.022.

Bronkhorst, Abel Jacobus; Wentzel, Johannes F.; Ungerer, Vida; Peters, Dimetrie L.; Aucamp, Janine; Villiers, Etienne Pierre de et al. (2018): Sequence analysis of cell-free DNA derived from cultured human bone osteosarcoma (143B) cells. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 40 (9), 1010428318801190. DOI: 10.1177/1010428318801190.

Burge, Shelley; Lichtenberger, Lenard M. (2019): Growth inhibitory effects of PC-NSAIDs on human breast cancer subtypes in cell culture. In: *Oncology letters* 18 (6), S. 6243–6248. DOI: 10.3892/ol.2019.10951.

Chen, Gang; Kronenberger, Peter; Teugels, Erik; Umelo, Ijeoma Adaku; Grève, Jacques de (2012): Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells. The effect of combining RNA interference with tyrosine kinase inhibitors or cetuximab. In: *BMC medicine* 10, S. 28. DOI: 10.1186/1741-7015-10-28.

Choi, J-J; Reich, C. F.; Pisetsky, D. S. (2004): Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines in vitro. In: *Scandinavian journal of immunology* 60 (1-2), S. 159–166. DOI: 10.1111/j.0300-9475.2004.01470.x.

Church, Timothy Robert; Wandell, Michael; Lofton-Day, Catherine; Mongin, Steven J.; Burger, Matthias; Payne, Shannon R. et al. (2014): Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. In: *Gut* 63 (2), S. 317–325. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-304149.

Contreras-Naranjo, Jose C.; Wu, Hung-Jen; Ugaz, Victor M. (2017): Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. In: *Lab on a chip* 17 (21), S. 3558–3577. DOI: 10.1039/c7lc00592j.

da Cunha Santos, Gilda; Shepherd, Frances A.; Tsao, Ming Sound (2011): EGFR mutations and lung cancer. In: *Annual review of pathology* 6, S. 49–69. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130206.

Dehan, E.; Ben-Dor, A.; Liao, W.; Lipson, D.; Frimer, H.; Rienstein, S. et al. (2007): Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 56 (2), S. 175–184. DOI: 10.1016/j.lungcan.2006.12.010.

deVos, Theo; Tetzner, Reimo; Model, Fabian; Weiss, Gunter; Schuster, Matthias; Distler, Jürgen et al. (2009): Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. In: *Clinical chemistry* 55 (7), S. 1337–1346. DOI: 10.1373/clinchem.2008.115808.

Dietrich, Dimo; Hasinger, Oliver; Bañez, Lionel L.; Sun, Leon; van Leenders, Geert J.; Wheeler, Thomas M. et al. (2013a): Development and clinical validation of a real-time PCR assay for PITX2 DNA methylation to predict prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer patients following radical prostatectomy. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 15 (2), S. 270–279. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.11.002.

Dietrich, Dimo; Hasinger, Oliver; Liebenberg, Volker; Field, John K.; Kristiansen, Glen; Soltermann, Alex (2012a): DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. In: *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 21 (2), S. 93–104. DOI: 10.1097/PDM.0b013e318240503b.

Dietrich, Dimo; Jung, Maria; Puetzer, Svenja; Leisse, Annette; Holmes, Emily Eva; Meller, Sebastian et al. (2013b): Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. In: *PLoS one* 8 (12), e84225. DOI: 10.1371/journal.pone.0084225.

Dietrich, Dimo; Kneip, Christoph; Raji, Olaide; Liloglou, Triantafillos; Seegebarth, Anke; Schlegel, Thomas et al. (2012b): Performance evaluation of the DNA methylation biomarker

SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. In: *International journal of oncology* 40 (3), S. 825–832. DOI: 10.3892/ijo.2011.1264.

Dietrich, Dimo; Krispin, Manuel; Dietrich, Jörn; Fassbender, Anne; Lewin, Jörn; Harbeck, Nadia et al. (2010): CDO1 promoter methylation is a biomarker for outcome prediction of anthracycline treated, estrogen receptor-positive, lymph node-positive breast cancer patients. In: *BMC cancer* 10, S. 247. DOI: 10.1186/1471-2407-10-247.

Egger, Gerda; Liang, Gangning; Aparicio, Ana; Jones, Peter A. (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. In: *Nature* 429 (6990), S. 457–463. DOI: 10.1038/nature02625.

Fleischhacker, Michael; Dietrich, Dimo; Liebenberg, Volker; Field, John K.; Schmidt, Bernd (2013): The role of DNA methylation as biomarkers in the clinical management of lung cancer. In: *Expert review of respiratory medicine* 7 (4), S. 363–383. DOI: 10.1586/17476348.2013.814397.

Fleischhacker, Michael; Schmidt, Bernd (2007): Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer - A survey. In: *Biochimica et biophysica acta* 1775 (1), S. 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.

Ganbarjeddi, Saiedeh; Azimi, Ako; Zadi Heydarabad, Milad; Hemmatzadeh, Maryam; Mohammadi, Shahin; Mousavi Ardehaie, Reza et al. (2020): Apoptosis Induced by Prednisolone Occurs without Altering the Promoter Methylation of BAX and BCL-2 Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells CCRF-CEM. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 21 (2), S. 523–529. DOI: 10.31557/APJCP.2020.21.2.523.

García-Olmo, Dolores C.; Gutiérrez-González, Lydia; Ruiz-Piqueras, Rocío; Picazo, María G.; García-Olmo, Damián (2005): Detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma during tumor progression in rats. In: *Cancer letters* 217 (1), S. 115–123. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.06.043.

García-Olmo, Dolores C.; Gutiérrez-González, Lydia; Samos, Julia; Picazo, María G.; Atiénzar, Manuel; García-Olmo, Damián (2006): Surgery and hematogenous dissemination. Comparison between the detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma before and after tumor resection in rats. In: *Annals of surgical oncology* 13 (8), S. 1136–1144. DOI: 10.1245/ASO.2006.05.032.

Grabuschnig, Stefan; Bronkhorst, Abel Jacobus; Holdenrieder, Stefan; Rosales Rodriguez, Ingund; Schliep, Klaus Peter; Schwendenwein, Daniel et al. (2020): Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms. In: *International journal of molecular sciences* 21 (21). DOI: 10.3390/ijms21218062.

- Han, Yumiao; Garcia, Benjamin A. (2013): Combining genomic and proteomic approaches for epigenetics research. In: *Epigenomics* 5 (4), S. 439–452. DOI: 10.2217/epi.13.37.
- Harris, Randall E.; Beebe-Donk, Joanne; Doss, Hani; Burr Doss, Deborah (2005): Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention. A critical review of non-selective COX-2 blockade (review). In: *Oncology reports* 13 (4), S. 559–583.
- Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Löffler, Georg (Hg.) (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.
- Herman, J. G.; Graff, J. R.; Myöhänen, S.; Nelkin, B. D.; Baylin, S. B. (1996): Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18), S. 9821–9826. DOI: 10.1073/pnas.93.18.9821.
- Hirata, T.; Ukawa, H.; Yamakuni, H.; Kato, S.; Takeuchi, K. (1997): Cyclo-oxygenase isozymes in mucosal ulcerogenic and functional responses following barrier disruption in rat stomachs. In: *British journal of pharmacology* 122 (3), 447-454.
- Huang, Steven K.; Scruggs, Anne M.; Donaghy, Jake; McEachin, Richard C.; Fisher, Aaron S.; Richardson, Bruce C.; Peters-Golden, Marc (2012): Prostaglandin E₂ increases fibroblast gene-specific and global DNA methylation via increased DNA methyltransferase expression. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (9), S. 3703–3714. DOI: 10.1096/fj.11-203323.
- Huang, Yen-Tsung; Heist, Rebecca S.; Chirieac, Lucian R.; Lin, Xihong; Skaug, Vidar; Zienolddiny, Shanbeh et al. (2009): Genome-wide analysis of survival in early-stage non-small-cell lung cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (16), S. 2660–2667. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.7906.
- Hurtado-Gonzalez, Pablo; Anderson, Richard A.; Macdonald, Joni; van den Driesche, Sander; Kilcoyne, Karen; Jørgensen, Anne et al. (2018): Effects of Exposure to Acetaminophen and Ibuprofen on Fetal Germ Cell Development in Both Sexes in Rodent and Human Using Multiple Experimental Systems. In: *Environmental health perspectives* 126 (4), S. 47006. DOI: 10.1289/EHP2307.
- Inbar-Feigenberg, Michal; Choufani, Sanaa; Butcher, Darci T.; Roifman, Maian; Weksberg, Rosanna (2013): Basic concepts of epigenetics. In: *Fertility and sterility* 99 (3), S. 607–615. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.117.

Irvine, Ryan A.; Hsieh, Chih-Lin (2004): Q-PCR in combination with ChIP assays to detect changes in chromatin acetylation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 287, S. 45–52. DOI: 10.1385/1-59259-828-5:045.

Jahr, S.; Hentze, H.; Englisch, S.; Hardt, D.; Fackelmayer, F. O.; Hesch, R. D.; Knippers, R. (2001): DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. In: *Cancer research* 61 (4), S. 1659–1665.

Jänne, Pasi A.; Johnson, Bruce E. (2006): Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (14 Pt 2), 4416s–4420s. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0555.

Jeschke, Jana; O'Hagan, Heather M.; Zhang, Wei; Vatapalli, Rajita; Calmon, Marilia Freitas; Danilova, Ludmila et al. (2013): Frequent inactivation of cysteine dioxygenase type 1 contributes to survival of breast cancer cells and resistance to anthracyclines. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (12), S. 3201–3211. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3751.

Joseph, Crisjoe A.; Maroney, Michael J. (2007): Cysteine dioxygenase. Structure and mechanism. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* (32), S. 3338–3349.

Kawamura, M. T.; Paschoal, M. E.; da Costa Carvalho, M. D. (1999): In vitro interaction of serum protein with circulating DNA of lung cancer patient. In: *International journal of molecular medicine* 4 (2), S. 187–190. DOI: 10.3892/ijmm.4.2.187.

Kneip, Christoph; Schmidt, Bernd; Seegebarth, Anke; Weickmann, Sabine; Fleischhacker, Michael; Liebenberg, Volker et al. (2011): SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. In: *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (10), S. 1632–1638. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318220ef9a.

Korkmaz, Ahmet; Manchester, Lucien; Topal, Turgut; Ma, Shuran; Tan, Dun; Reiter, Russel (2011): Epigenetic mechanisms in human physiology and diseases. In: *J Exp Integr Med* 1 (3), S. 139. DOI: 10.5455/jeim.060611.rw.003.

Kulis, Marta; Esteller, Manel (2010): DNA methylation and cancer. In: *Advances in genetics* 70, S. 27–56. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.

Kumar, Pankaj; Dillon, Laura W.; Shibata, Yoshiyuki; Jazaeri, Amir A.; Jones, David R.; Dutta, Anindya (2017): Normal and Cancerous Tissues Release Extrachromosomal Circular

DNA (eccDNA) into the Circulation. In: *Molecular cancer research : MCR* 15 (9), S. 1197–1205. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0095.

Lee, Shih-Wei; Weng, Julia Tzu-Ya; Hsu, Paul Wei-Che; Chuang, Tzu-Yi; Liu, Chih-Wei; Chen, Chung-Hsuan; Wu, Lawrence Shih-Hsin (2018): Whole-genome methylation profiling of peripheral blood mononuclear cell for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease treated with corticosteroid. In: *Pharmacogenetics and genomics* 28 (3), S. 78–85. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000325.

Lehrbach, Dárcio Matenhauer; Nita, Marcelo Eidi; Cecconello, Ivan (2003): Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. In: *Arquivos de gastroenterologia* 40 (4), S. 256–261. DOI: 10.1590/s0004-28032003000400011.

Leng, Qixin; Tsou, Jen-Hui; Zhan, Min; Jiang, Feng (2018): Fucosylation genes as circulating biomarkers for lung cancer. In: *Journal of cancer research and clinical oncology*. DOI: 10.1007/s00432-018-2735-0.

Li, Ning; Li, Xiaobing; Li, Suyun; Zhou, Suzhen; Zhou, Qingwei (2013): Cisplatin-induced downregulation of SOX1 increases drug resistance by activating autophagy in non-small cell lung cancer cell. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 439 (2), S. 187–190. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.08.065.

Lichtenberger, Lenard M.; Phan, Tri; Fang, Dexing; Dial, Elizabeth J. (2018): Chemoprevention with phosphatidylcholine non-steroidal anti-inflammatory drugs in vivo and in vitro. In: *Oncology letters* 15 (5), S. 6688–6694. DOI: 10.3892/ol.2018.8098.

Lin, C. R.; Kioussi, C.; O'Connell, S.; Briata, P.; Szeto, D.; Liu, F. et al. (1999): Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. In: *Nature* 401 (6750), S. 279–282. DOI: 10.1038/45803.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

Lüllmann, Heinz; Mohr, Klaus; Hein, Lutz (2010): *Pharmakologie und Toxikologie*. 17. Auflage. Stuttgart: Thieme.

McCormick, James A.; Ellison, David H. (2015): Distal convoluted tubule. In: *Comprehensive Physiology* 5 (1), S. 45–98. DOI: 10.1002/cphy.c140002.

Meller, Sebastian; Zipfel, Lisa; Gevensleben, Heidrun; Dietrich, Jörn; Ellinger, Jörg; Majores, Michael et al. (2016): CDO1 promoter methylation is associated with gene silencing and is a prognostic biomarker for biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients. In: *Epigenetics* 11 (12), S. 871–880. DOI: 10.1080/15592294.2016.1241931.

Minatani, Naoko; Waraya, Mina; Yamashita, Keishi; Kikuchi, Mariko; Ushiku, Hideki; Kojo, Ken et al. (2016): Prognostic Significance of Promoter DNA Hypermethylation of cysteine dioxygenase 1 (CDO1) Gene in Primary Breast Cancer. In: *PLoS one* 11 (1), e0144862. DOI: 10.1371/journal.pone.0144862.

Nasim, Faria; Sabath, Bruce F.; Eapen, George A. (2019): Lung Cancer. In: *The Medical clinics of North America* 103 (3), S. 463–473. DOI: 10.1016/j.mcna.2018.12.006.

Panagopoulou, Maria; Karaglani, Makrina; Balgkouranidou, Ioanna; Pantazi, Chrisoula; Kolios, George; Kakolyris, Stylianos; Chatzaki, Ekaterini (2019): Circulating cell-free DNA release in vitro. Kinetics, size profiling, and cancer-related gene methylation. In: *Journal of cellular physiology* 234 (8), S. 14079–14089. DOI: 10.1002/jcp.28097.

Paska, Alja Videtic; Hudler, Petra (2015): Aberrant methylation patterns in cancer. A clinical view. In: *Biochemia medica* 25 (2), S. 161–176. DOI: 10.11613/BM.2015.017.

Pös, Ondrej; Biró, Orsolya; Szemes, Tomas; Nagy, Bálint (2018): Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. In: *European journal of human genetics : EJHG* 26 (7), S. 937–945. DOI: 10.1038/s41431-018-0132-4.

Qian, Jun; Massion, Pierre P. (2008): Role of chromosome 3q amplification in lung cancer. In: *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 3 (3), S. 212–215. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181663544.

Rauch, Tibor A.; Zhong, Xueyan; Wu, Xiwei; Wang, Melody; Kernstine, Kemp H.; Wang, Zunde et al. (2008): High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (1), S. 252–257. DOI: 10.1073/pnas.0710735105.

Risch, Angela; Plass, Christoph (2008): Lung cancer epigenetics and genetics. In: *International journal of cancer* 123 (1), S. 1–7. DOI: 10.1002/ijc.23605.

Rostami, Ariana; Lambie, Meghan; Yu, Caberry W.; Stambolic, Vuk; Waldron, John N.; Bratman, Scott V. (2020): Senescence, Necrosis, and Apoptosis Govern Circulating Cell-free DNA Release Kinetics. In: *Cell reports* 31 (13), S. 107830. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107830.

Rumore, P.; Muralidhar, B.; Lin, M.; Lai, C.; Steinman, C. R. (1992): Haemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA. Oligonucleosome-like structure and clearance. In: *Clinical and experimental immunology* 90 (1), S. 56–62.

Sailer, Verena; Gevensleben, Heidrun; Dietrich, Joern; Goltz, Diane; Kristiansen, Glen; Bootz, Friedrich; Dietrich, Dimo (2017): Clinical performance validation of PITX2 DNA

methylation as prognostic biomarker in patients with head and neck squamous cell carcinoma. In: *PloS one* 12 (6), e0179412. DOI: 10.1371/journal.pone.0179412.

Satsu, Hideo; Terasawa, Eriko; Hosokawa, Yu; Shimizu, Makoto (2003): Functional characterization and regulation of the taurine transporter and cysteine dioxygenase in human hepatoblastoma HepG2 cells. In: *The Biochemical journal* 375 (Pt 2), S. 441–447. DOI: 10.1042/BJ20030535.

Schmidt, Bernd; Beyer, Julia; Dietrich, Dimo; Bork, Ines; Liebenberg, Volker; Fleischhacker, Michael (2015): Quantification of cell-free mSHOX2 Plasma DNA for therapy monitoring in advanced stage non-small cell (NSCLC) and small-cell lung cancer (SCLC) patients. In: *PloS one* 10 (2), e0118195. DOI: 10.1371/journal.pone.0118195.

Schmidt, Bernd; Liebenberg, Volker; Dietrich, Dimo; Schlegel, Thomas; Kneip, Christoph; Seegebarth, Anke et al. (2010): SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. In: *BMC cancer* 10, S. 600. DOI: 10.1186/1471-2407-10-600.

Schneider, Katja U.; Dietrich, Dimo; Fleischhacker, Michael; Leschber, Gunda; Merk, Johannes; Schäper, Frank et al. (2011): Correlation of SHOX2 gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors. In: *BMC cancer* 11, S. 102. DOI: 10.1186/1471-2407-11-102.

Shen, Hua; Gao, Wen; Wu, Yu-jie; Qiu, Hai-rong; Shu, Yong-qian (2009): Multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization reveal molecular events in lung adenocarcinomas and squamous cell lung carcinomas. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 63 (6), S. 396–403. DOI: 10.1016/j.biopha.2008.08.010.

Sozzi, G.; Conte, D.; Mariani, L.; Lo Vullo, S.; Roz, L.; Lombardo, C. et al. (2001): Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. In: *Cancer research* 61 (12), S. 4675–4678.

Sozzi, Gabriella; Conte, Davide; Leon, MariaElena; Ciricione, Rosalia; Roz, Luca; Ratcliffe, Cathy et al. (2003): Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (21), S. 3902–3908. DOI: 10.1200/JCO.2003.02.006.

Statistisches Bundesamt (2020): Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs. Sterbefälle durch Krebs insgesamt 2018. Hg. v. 2020 Statistisches Bundesamt (Destatis). Statistisches Bundesamt, Gustav-Stresemann-Ring 11, 65189 Wiesbaden. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft->

Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html, zuletzt aktualisiert am 30.11.2020, zuletzt geprüft am 16.04.2021.

Stroun, M.; Anker, P.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Maurice, P. A. (1987): Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. In: *European journal of cancer & clinical oncology* 23 (6), S. 707–712.

Stroun, M.; Anker, P.; Maurice, P.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Beljanski, M. (1989): Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. In: *Oncology* 46 (5), S. 318–322. DOI: 10.1159/000226740.

Stroun, M.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Mulcahy, H. E.; Anker, P. (2001a): Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA. Evidence for a preferential release from viable cells? In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 945, S. 258–264.

Stroun, M.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Olson-Sand, A.; Anker, P. (2001b): About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 313 (1-2), S. 139–142.

Stroun, Maurice; Anker, Philippe (1971): Nucleic Acids Spontaneously Released by Living Frog Auricles. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, S. 100–101.

Taby, Rodolphe; Issa, Jean-Pierre J. (2010): Cancer epigenetics. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 60 (6), S. 376–392. DOI: 10.3322/caac.20085.

Tamkovich, Svetlana N.; Bryzgunova, Olga E.; Rykova, Elena Yu; Permyakova, Valentina I.; Vlassov, Valentin V.; Laktionov, Pavel P. (2005): Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. In: *Clinical chemistry* 51 (7), S. 1317–1319. DOI: 10.1373/clinchem.2004.045062.

Waheed, Abdul; Sly, William S. (2014): Membrane associated carbonic anhydrase IV (CA IV): a personal and historical perspective. In: *Sub-cellular biochemistry* 75, S. 157–179. DOI: 10.1007/978-94-007-7359-2_9.

Wang, Wei; Kong, Peng; Ma, Ge; Li, Li; Zhu, Jin; Xia, Tiansong et al. (2017): Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. In: *Oncotarget* 8 (26), S. 43180–43191. DOI: 10.18632/oncotarget.17858.

Weirich, Christine S.; Erzberger, Jan P.; Barral, Yves (2008): The septin family of GTPases. Architecture and dynamics. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (6), S. 478–489. DOI: 10.1038/nrm2407.

Wieczorek, A. J.; Rhyner, C.; Block, L. H. (1985): Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (10), S. 3455–3459. DOI: 10.1073/pnas.82.10.3455.

Yen, Chueh-Chuan; Liang, Shu-Ching; Jong, Yiin-Jeng; Chen, Yann-Jang; Lin, Chi-Hung; Chen, Yuh-Min et al. (2007): Chromosomal aberrations of malignant pleural effusions of lung adenocarcinoma. Different cytogenetic changes are correlated with genders and smoking habits. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 57 (3), S. 292–301. DOI: 10.1016/j.lungcan.2007.04.007.

Zadi Heydarabad, Milad; Nikasa, Mina; Vatanmakanian, Mousa; Azimi, Ako; Farshdousti Hagh, Majid (2018): Regulatory effect of resveratrol and prednisolone on MDR1 gene expression in acute lymphoblastic leukemia cell line (CCRF-CEM): An epigenetic perspective. In: *Journal of cellular biochemistry* 119 (6), S. 4890–4896. DOI: 10.1002/jcb.26709.

Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Epidemiologie von Krebserkrankungen 2. Hg. v. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). Robert-Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin. Berlin. Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Epidemiologie_node.html, zuletzt aktualisiert am 29.11.2016, zuletzt geprüft am 16.04.2021.

Zhong, X. Y.; Bürk, M. R.; Troeger, C.; Kang, A.; Holzgreve, W.; Hahn, S. (2000): Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. In: *Obstetrics and gynecology* 96 (6), S. 991–996.

8 Thesen

1. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der kultivierten Lungenkrebszelllinien mit Cisplatin und Prednisolon bei den Zelllinien H1650 und H1975 Veränderungen der Methylierung des Gens SHOX2 im Kulturüberstand induzierte.
2. Die Untersuchungen zeigten bei allen eingesetzten Medikamenten (Cisplatin, HCT, Ibuprofen, Prednisolon) über alle Lungenkrebszelllinien hinweg einen unterschiedlichen Einfluss auf die Methylierung der verschiedenen Gene (SEPT9, SHOX2, PITX2, CDO1) der in den Kulturüberstand freigesetzten cfDNA. Ein einheitliches Muster ließ sich aus den erhaltenen Ergebnissen nicht ableiten.
3. Die verwendeten Zelllinien unterschieden sich in ihrem Verhalten in Bezug auf eine Veränderung der Methylierung unter Pharmakotherapie.
4. Eine Behandlung mit HCT scheint keinen Einfluss auf die Methylierung der von Lungenkrebszellen freigesetzten cfDNA der untersuchten Gene zu haben.
5. Lediglich bei der Zelllinie H1975 bestand ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der Methylierung der cfDNA und verändertem Zelluntergang.
6. Im Zeitverlauf der Inkubation konnte eine steigende Konzentration an cfDNA im Kulturüberstand beobachtet werden, die bei allen untersuchten Zelllinien unabhängig vom Zelluntergang war.
7. Neben dem Zelluntergang haben vermutlich andere Mechanismen, wie zum Beispiel eine aktive Freisetzung, Einfluss auf die Konzentration an cfDNA in Zellkulturüberständen.

9 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hannover, den _____

Unterschrift

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Florian Rode, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind.

Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Hannover, den _____

Unterschrift

11 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Betreuer Herrn Prof. Bernd Schmidt für die Möglichkeit das Projekt in seiner Klinik zu erarbeiten und auch für die Unterstützung zur Zeit der Erstellung der Dissertationsschrift. Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Michael Fleischhacker für die herausragende Unterstützung und Beratung zur Planung und Durchführung des Projektes. Sie hatten zu jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Fragen und immer ein Lösungsvorschlag parat. Herzlichen Dank Ihnen beiden. Ebenso danke ich Herrn Prof. Michl, der wohlwollend die Rahmenbedingung zur Fortführung meiner Promotion schaffte, als er im Jahr 2015 die Leitung der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I übernahm.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Frau Dana Reinicke, die mir bei den Probenanalysen unterstützend zur Seite stand und immer ein verlässlicher Ansprechpartner war. Genauso danke ich Frau Lisa Leibnitz und Herrn Silas Enhardt für die fruchtbare Zusammenarbeit im Labor.

Ferner bedanke ich mich bei Ihnen, meinen Gutachtern, dafür, dass Sie sich die Zeit zur Bewertung dieser Arbeit nehmen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Frau Laura für ihre unermüdliche Unterstützung und dafür, dass ihr mir zu jeder Zeit motivierend und geduldig zur Seite standet.