

2. Material und Methoden

Die prospektive, monozentrische Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin zugelassen. Patientinnen mit histologisch gesichertem Ovarialkarzinom und benignen, sonstigen gynäkologischen Erkrankungen bzw. gesunden Frauen, ohne Zweitkarzinome und Salpingoophorektomie (als Kontrollgruppe) wurden nach ihrer schriftlicher Einwilligung in die Studie im Rahmen von TOC-„Tumorbank Ovarian Cancer“ eingeschlossen.

2.1 Material (Aszites, Serum und DNA Proben)

Die Serum-, Aszitesproben und die Vollblutproben stammten von insgesamt 168 Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom und 177 Patientinnen mit einer gutartigen gynäkologischen Erkrankung und gesunden Frauen, die zwischen 2001 und 2003 in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Campus Virchow Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin behandelt wurden.

Bei 53 Patientinnen mit OC und 50 Patientinnen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen wurden intraoperativ Serum-, Aszites- (bzw. intraperitoneale Flüssigkeit) und Vollblutproben entnommen. Die Aszitesproben wurden nach ihrer Gewinnung bei 1500 Umdrehungen/Min (U/min) für 15 Minuten in einer Heraeus Zentrifuge zentrifugiert. Die Serumproben wurden bei 3000 U/min. für 10 Minuten zentrifugiert. Die gewonnenen Serum- und Aszitesproben wurden mit Eppendorf Pipetten abgetrennt, in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße umgefüllt und bis zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen bei -80 °C in einem Gefrierschrank (Ultra low freezer U 57085 New Brunswick Scientific) gelagert.

Von den Vollblutproben wurde DNA nach einem Protokoll von QIAamp DNA Blut Midi Kit extrahiert. Es werden 200 μl QIAGEN Protease mit 2 ml Vollblut in einem 15 ml Röhrchen vermischt. Nach Zugabe von 2,4 ml AL Puffer und 3-maligen Vortexen werden die Proben bei 70 °C im Wasserbad für 10 Minuten inkubiert. Dann werden jeder Probe 2 ml Ethanol zugeführt und gemischt. Eine Hälfte von der Probe wird in einem QIAamp Midi-Säule,

die sich in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen befindet, gegeben und bei 3000 U/min (1850xg) für 3 Minuten zentrifugiert. Die Restlösung wird verworfen und die andere Hälfte der Probe wird in derselben Säule bei 3000 U/min (1850xg) für 3 Minuten zentrifugiert. Die Restlösung wird verworfen und nach der Zugabe von 2 ml AW1 Puffer in der Säule wird bei 5000 U/min (4500xg) für 1 Minute zentrifugiert. Es werden noch 2 ml AW2 Puffer in der Säule zugegeben und nochmals bei 5000 U/min (4500xg) für 15 Minuten zentrifugiert. Die Säule wird in einem sauberen 15 ml Röhrchen überführt. 300 µl AE Puffer werden in die Säule gegeben und nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben bei 5000 U/min (4500xg) für 5 Minuten zentrifugiert. Um eine hohe DNA Konzentration zu gewinnen wird das Zentrifugat nochmals in die Säule gegeben und der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt. Die DNA Konzentration wurde mittels UV-Spektrophotometer (λ 260-280 nm) geprüft. Die Ergebnisse haben ein kontaminationsfreies DNA nachgewiesen.

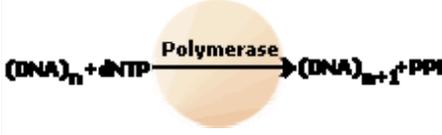
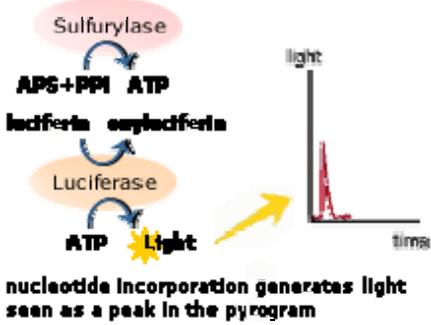
Die gewonnenen DNA Proben wurden mit Eppendorf Pipetten abgetrennt, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße umgefüllt und bis zur Bestimmung des Polymorphismus bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert.

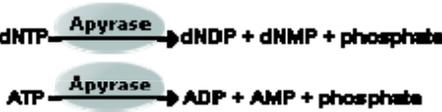
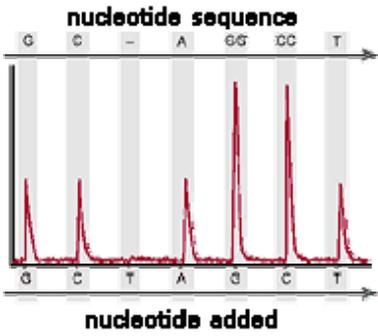
2.2 Pyrosequencing

Pyrosequencing ist eine etablierte Technologie für DNA-Analysen, mit Schwerpunkt auf SNP-Analyse. Die Pyrosequencing-Methode ist ein leistungsfähiges Werkzeug für Studien der Genotypuswechselbeziehung mit Krankheiten und anderen Phänotypen geworden. Die Masseinheit Neurogenetics hat die Methode Pyrosequencing und das Instrument PSQ96 für die Analyse der genetischen Veränderungen ausgewertet (Nordfors et al. 2002. Summen Mut).

Die Methode Pyrosequencing basiert sich auf das Ordnen der Reihe nach Durchsynthese und auf Realzeitabfragung des Pyrophosphats (Nyrén et al. 1993, 1997) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Prinzipien des Pyrosequencing

GRUNDREGEL VON PYROSEQUENCING	
<p>Schritt1</p> <p>Eine der Reihe nach ordnende Zündkapsel wird einzelnem zu angeschwemmt hybridisiert, zu PCR verstärkt, DNA-Schablone und mit den Enzymen, DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase und den Substraten, dem Phosphosulfate des Adenosins 5' (APS) und dem Luciferin ausgebrütet.</p>	
<p>Schritt2</p> <p>Das erste von vier Deoxynucleotidetriphosphaten (dNTP) wird der Reaktion hinzugefügt. DNA-Polymerase katalysiert die Gesellschaftsgründung des Deoxynucleotidetriphosphats in die DNA-Faser, wenn sie zur Unterseite in der Schablonenfaser ergänzend ist. Jeder Gesellschaftsgründungfall wird von der Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) in einer Quantität begleitet, die zur Menge des enthaltenen Nucleotids Equimolar ist.</p>	 <p>The diagram shows a horizontal reaction arrow. On the left, the text is $(DNA)_n + dNTP$. Above the arrow is the word "Polymerase". On the right, the text is $(DNA)_{n+1} + PPi$. A large orange circle is positioned behind the arrow.</p>
<p>Schritt3</p> <p>ATP-Sulfurylase wandelt quantitativ PPi in ATP in Anwesenheit des Phosphosulfates des Adenosins 5' um. Dieses ATP fährt die Luciferase-vermittelte Umwandlung von Luciferin zum Oxyluciferin, das sichtbare Licht in den Mengen erzeugt, die zur Menge von ATP proportional sind. Das Licht, das in der Luciferase-katalysierten Reaktion produziert wird, wird durch eine Aufladung verbundene Kamera der Vorrichtung (CCD) ermittelt und gesehen als Spitze in einem Pyrogram. Jedes</p>	 <p>The diagram illustrates a biochemical cycle. At the top, a pink oval labeled "Sulfurylase" has an arrow pointing from "APS+PPi" to "ATP". Below this, a blue oval labeled "Luciferase" has an arrow pointing from "ATP" to "Oxyluciferin". A yellow starburst labeled "Light" is shown below "Oxyluciferin". To the right, a graph shows a red peak on a coordinate system with "light" on the y-axis and "time" on the x-axis. A yellow arrow points from the "Light" starburst to the peak. Below the graph, the text reads: "nucleotide incorporation generates light seen as a peak in the pyrogram".</p>

<p>helle Signal ist zur Zahl den enthaltenen Nukleotiden proportional.</p>	
<p>Schritt4 Apyrase, ein entwüdigendes Enzym des Nukleotids, vermindert ununterbrochen einen Überfluss von dNTPs und ATP. Wenn die Verminderung komplett ist, wird ein anderes dNTP addiert.</p>	
<p>Schritt5 Die dNTPs werden einzeln hinzugefügt. Es soll gemerkt werden, dass Deoxyadenosinealfathiotriphosphat (dATPαS) als Ersatz für das natürliche Deoxyadenosinetriphosphat (dATP) und leistungsfähig durch die DNA-Polymerase benutzt wird, aber nicht durch das Luciferase erkannt wird. Während der Prozess fortfährt, wird die ergänzende DNA-Faser aufgebaut und die Nukleotidreihenfolge wird von der Signalspitze im Pyrogram festgestellt. (Pyrosequencing AB-Uppsala, Schweden)</p>	

Für die Pyrosequenzierung haben wir von der DNA Proben mittels 5' Nuklease PCR (TaqMan) PCR Produkte für IL-1 α und β vorbereitet. Es wurden 25 ng DNA für alle PCR Amplifikationen eingesetzt. Das Reaktionsgemisch beinhaltet: 5 pmol von je Sense- und Antisense Primers, 250 μ M Deoxynukleotidphosphat (dNTP), 4 μ l von 10xAmplifikationspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 9,0], 50 mM Kalium Chloride, 0,01% [w/v] Gelatin, 1,5 mM Magnesium Chloride, 0,1% Triton X-100, Vienna Lab) und 1 Einheit Taq-

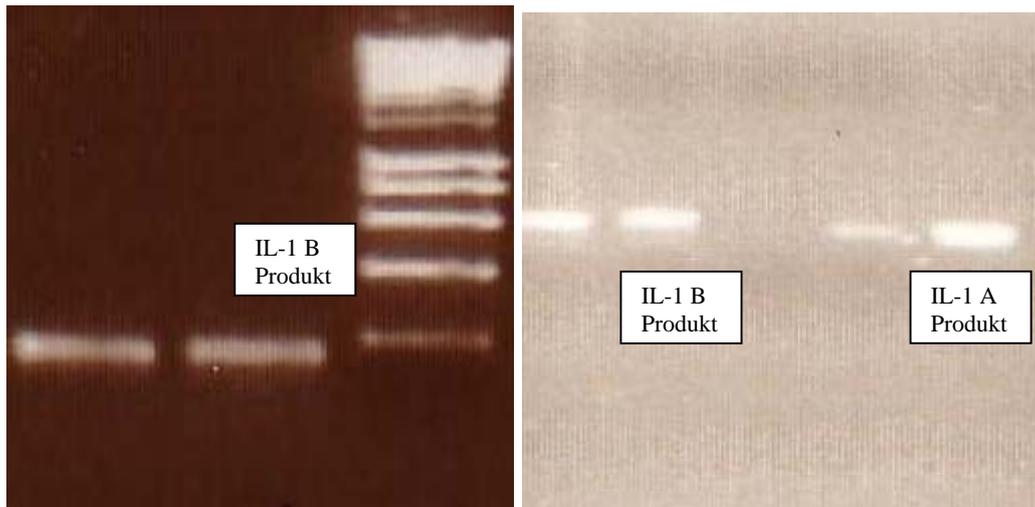
Polymerase (HT Biotechnology Ltd., Cambridge United Kingdom). Die PCR Analyse wurde mit einem Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) durchgeführt.

Ein T/C Übergangspolymorphismus bei dem -889 Locus des IL-1 A Gens wurde unter folgenden PCR Bedingungen untersucht: Denaturierung bei 94 °C 1 Minute, 40 Zyklen [Schmelzen bei 94 °C 30 Sekunden, Anlagern bei 50 °C 30 Sekunden, Verlängern bei 72 °C 30 Sekunden], finale Extension bei 72 °C 5 Minuten. Die Oligonukleotidprimers (forward, 5-AAT AAT AGT AACCAG GCA AC-3; reverse, 5-ATA TGC CCA AGG TGTGTC-3; GenBank accession no. X03833) wurden für ein 169-bp-lang PCR Produkt benutzt.

Ein C/T Übergangspolymorphismus bei dem -511 Locus des IL-1 B Gens wurde unter folgenden PCR Bedingungen untersucht: Denaturierung bei 95 °C 5 Minute, 45 Zyklen [Schmelzen bei 95 °C 15 Sekunden, Anlagern bei 60 °C 30 Sekunden, Verlängern bei 72 °C 15 Sekunden], finale Extension bei 72 °C 5 Minuten. Die Oligonukleotidprimers (forward, 5-GCCT-GAACCTGCATACCGT-3; reverse, 5-GCCAATAGCCCTCCCTGTCT-3; GenBank accession no. X04500) wurden für ein 186-bp-lang PCR Produkt benutzt.

Die PCR Produkte wurden mittels der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt um die Qualität des Produktes zu überprüfen. Das Prinzip der Agarosegel-Elektrophorese ist wie folgt: man kocht Agarose (2,5%) in Elektrophoresepuffer, bis die Agarose gelöst ist und giesst daraus mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kammes ein Gel mit Taschen. Nach Erstarren der Agarose wird der Kamm entfernt und das Gel mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Das DNA Produkt wird in die Elektrophoresetaschen gegeben und eine Spannung von 50-100 Volt angelegt (Abb. 6).

Abb. 6: Qualität des PCR Produktes



Die Polymorphismen von IL-1 A und IL-1 B Promotern wurden mittels Pyrosequencer PSQ 96 and PSQ 96 SNP Reagent Kit (Uppsala, Sweden) untersucht. Nach Anweisungen des Herstellers wurden 35 μ l PCR Produkt für die Pyrosequenzierung eingesetzt. Die PCR Produkte wurden zu einem single-stranded DNA Template mittels Pyromark VPW (Vacuum Prep Workstation) konvertiert. Die Produkte wurden in Streptavidin Sepharose immobilisiert und bei 1400 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Es folgte eine mehrmalige Reinigung mit 70% Ethanol 5 Sekunden, 0,2M NaOH 5 Sekunden, 10mM Tris Acetat Puffer 5 Sekunden, MiliQ Wasser 15 Sekunden. 5 pM von der Sequenzierungsprimers (-889 IL1A-1800587-F: 5' AATAATAGTAACCAGGCAAC-3', IL1A-1800587-R: 5'BIOTIN -ATATGCCCAAGGTGTGTC-3'; Pro-511 IL-1 B-F 5'-GTCTT-GCAGGGTTGTGTGAG-3', IL-1 B-R-5'-TGAGGGTGTGGGTCTCTACC-3') wurden für die Detektion der Polymorphismen zugegeben. Das Pyrosequenzierungsreaktionsgemisch beinhaltet: 8 Einheiten von Exonu-klease-DNA Polymerase, 40 m-Einheiten Apyrase, 100 ng Luciferase, 20 m-Einheiten recombinierte ATP-Sulphurylase, 2,5 μ g DNA-Bindeprotein, 0,1 M Tris-Acetat (pH 7,75), 0,3 mM EDTA, 5 mM Magnesiumacetat, 0,1% BSA, 1 mM Dithiothreitol, 5 μ M Adenosine-5'-Phosphosulfat, 0,4mg/ml Polyvinylpyrrolidon und 100 μ g/ml D-Luciferin. Die Sequenzierungsprozedur erfolgte in mehreren Etapen und die Ergebnisse wurden anschliessend im Photomultiplikator registriert.

2.3. Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Aszites und Serum

Die Konzentrationen von IL-1 α , IL-1 β und IL-1 RA im Serum und Aszites wurden bei 53 Patientinnen mit Ovarialkarzinom und 50 Patientinnen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen mittels der ELISA Methode (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt.

Die ELISA Methode beinhaltet die quantitative immunoenzymatische „sandwich“ Technik. Die 96-Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Bindungsstelle des IL-1-Moleküls gerichtet ist. Die Standards und die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzym-Konjugat inkubiert. Es wird ein Immuno-Sandwich-Komplex gebildet. Im nächsten Schritt wird das nicht-gebundene Konjugat durch Waschen mit Puffer aus dem Wells entfernt. Danach wird eine Farbentwicklungslösung in die Wells hinzugegeben, durch die gebundenen Enzyme kommt es zur Farbentwicklung. Die Intensität der entwickelten Farbe ist proportional zur IL-1 Konzentration in der Lösung. Nach 20 Minuten wird die Farbentwicklung mit einer Stopplösung (2N H₂SO₄) beendet. Auf einem Mikrotiterplattenleser wird die Extinktion bei 450nm gemessen.

2.3.1 IL-1 α Bestimmung

Die Konzentrationen von IL-1 α wurden mit einem „Human IL-1 α Immunoassay“ Quantikine Kit-DLA50 (R&D Systems) bestimmt. Vor dem Gebrauch wurden die Serum- und Aszites Proben auf Raumtemperatur gebracht. Zuerst wurde die Platte mit 50 μ l Assaydiluent bestückt. Dann wurden mit einer Mikropipette 200 μ l Probe in den Wells gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 3-mal gewaschen, anschliessend 200 μ l Konjugat zugegeben und weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das nicht gebundene Konjugat wurde durch 3-maliges Waschen entfernt. Danach wurden 200 μ l Farbentwicklungslösung in jedes Well gegeben, für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Mit der Zugabe von 50 μ l Stopplösung wurde die Reaktion beendet und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

2.3.2 IL-1 β Bestimmung

Die Konzentrationen von IL-1 β wurden mit einem „Human IL-1 β Immunoassay“ Quantikine HS (high sensitivity)-HSLB50 Kit (R&D Systems) bestimmt. Vor dem Gebrauch wurden die Serum- und Aszites Proben auf Raumtemperatur gebracht. Zuerst wurde die Platte mit 100 μ l Assaydiluent bestückt. Dann wurden mit einer Mikropipette 150 μ l Probe in den Wells gegeben und 14-20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 4-mal gewaschen, anschließend 200 μ l Konjugat zugegeben und weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das nicht gebundene Konjugat wurde durch 4-maliges Waschen entfernt. Danach wurden 50 μ l Farbentwicklungslösung in jedes Well gegeben, für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden 50 μ l Amplifier Lösung zugegeben und weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit der Zugabe von 50 μ l Stopplösung wurde die Reaktion beendet und die Extinktion bei 490 nm gemessen.

2.3.3 IL-1 RA Bestimmung

Die Konzentrationen von IL-1 RA wurden mit einem „Human IL-1 RA/IL-1F3 Immunoassay“ Quantikine Kit-DRA00 (R&D Systems) bestimmt. Vor dem Gebrauch wurden die Serum- und Aszites Proben auf Raumtemperatur gebracht. Zuerst wurde die Platte mit 50 μ l Assaydiluent bestückt. Dann wurden mit einer Mikropipette 200 μ l Probe in den Wells gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde es 4-mal gewaschen, anschliessend 200 μ l Konjugat zugegeben und weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das nicht gebundene Konjugat wurde durch 4-maliges Waschen entfernt. Danach wurden 200 μ l Farbentwicklungslösung in jedes Well gegeben, für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Mit der Zugabe von 50 μ l Stopplösung wurde die Reaktion beendet und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

2.4. Klinische Daten und Statistik

Bei den Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde die radikale Standardoperation mit dem Ziel der maximalen Tumorreduktion unternommen, in der Regel wurden eine Laparotomie mit bilateraler Adnektomie, Hysterektomie, Omentektomie, pelvine und paraaortale Lymphonodektomie, Appendektomie bei Patientinnen mit primären Ovarialkarzinom und Re-laparotomie mit Tumorreduktion und maximalen Tumordebulking bei rezidivierten Ovarialkarzinome durchgeführt.

Das „IMO“ (Intraoperatives Mapping des Ovarialkarzinoms) stellt ein neues Instrument für eine detaillierte und objektive Operationsdokumentation dar und dient einem exakteren FIGO Staging (Sehouli 2003). Anhand einer Operationsliste wurden der vorliegende Tumorbefall und die durchgeführten operativen Massnahmen dokumentiert. Hierzu wurden die befallenen Organe, die Menge des intraoperativ vorliegenden Aszites, die Grösse des postoperativen makroskopischen Tumorrestes und die Art der Peritonealkarzinose beschrieben.

Im Anschluss an die Operation erfolgte eine Dokumentation aller intraoperativ gewonnenen Daten sowie aller erhobenen krankheitsrelevanten klinischen und histopathologischen Daten der Patientin in eine elektronische Datenbank (Software SPSS 11,5 für Windows 2003, SPSS Inc., Chicago, IL). Die Antwortmöglichkeiten wurden in dichotome oder codierte Merkmale (Labels) transformiert. Die offenen Antworten wurden kategorisiert. In der Nachbeobachtungszeit erfolgte eine Aktualisierung der Daten zur adjuvanten Therapie und der Nachbeobachtungszeit über unsere Tumornachsorge-sprechstunde und Kontaktaufnahme mit den weiterbehandelnden Ärzten und Telefonaten mit den Patientinnen.

Die Überlebensraten wurden nach der Kaplan-Meier Methode berechnet und die Gleichverteilung des Überlebens wurde mit dem Log Rank Test analysiert. Wir haben 95 % CI (Konfidenzintervall) für den Medianwert des Überlebens berechnet (Kaplan EL J Am Stat Assoc 1958). Die Korrelationskoeffizienten wurden nach Chi-Quadrat Test nach Spearman (für nicht normalverteilte Werte) bestimmt.

Der Vergleich zwischen Mittelwerte wurde nach Mann-Whitney U-Test (für zwei Stichproben) und Kruskal-Wallis Test (für $k \geq 3$ Stichproben) analysiert. Wir haben alle p-Werte die zweiseitig waren, 95 % CI berechnen lassen, ein p Wert $< 0,05$ galt als statistisch signifikant.

Eine unabhängige Auswirkung von verschiedenen Parametern haben wir mit einer multivariaten Regression (Cox) bewertet (Verweij PM Biometrics 1995). Mit der Faktorenanalyse wurde versucht, die zugrundeliegenden Variablen oder Faktoren zu bestimmen, welche die Korrelationsmuster innerhalb eines Satzes beobachteter Variablen erklären, Erzeugen von Hypothesen über kausale Mechanismen zu ermöglichen.