

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Die prognostische Bedeutung der ESR1-Promotor-
Methylierung bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rong Shi

aus Yangling/ Volksrepublik China

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: PD Dr. Kai Hell

Prof. Dr. Hans Arnholdt

Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: Frau PD Dr. med. Verena Kirn

Dekan: Herr Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2018

Inhaltsverzeichnis

Kapitel I: Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom	5
1.1.1 Früherkennung und Tumormarker	6
1.1.2 TNM Klassifikation	9
1.1.3 FIGO Klassifikation	11
1.2 Histologische Subtypen	12
1.2.1 Serös	13
1.2.2 Muzinös	14
1.2.3 Endometrioid	15
1.2.4 Klarzellig	16
1.2.5 LMP/ Borderline	16
1.3 Histopathologisches Gradingssystem	18
1.4 CpG-Insel-Methylierung	21
1.4.1 CpG-Inseln	21
1.4.2 DNA-Methylierung	21
1.4.3 Methylierung des ESR1-Promotors	22
1.5 Östrogenrezeptor	24
1.6 Zielsetzung	25

Kapitel II: Material und Methoden

2.1 Material und Geräte	26
2.1.1 Patientinnenkollektiv, Herkunft des Materials	26
2.1.2 DNA-Extraktion	27
2.1.3 Bisulfit-Behandlung	28
2.1.4 Real-time-PCR	28
2.1.5 Immunhistochemie	30
2.2 Methoden	
2.2.1 DNA-Extraktion	31
2.2.2 Bisulfit-Behandlung	33
2.2.3 Real-time-PCR	36
2.2.4 Immunhistochemie	39

2.2.5 Statistische Auswertung	40
-------------------------------	----

Kapitel III: Ergebnisse

3.1 DNA-Extraktion und DNA Konzentration	41
3.2 Bisulfit-Behandlung	42
3.3 PCR Ergebnisse und Überlebensstatus	42
3.4 Immunhistochemie	47
3.5 Resektionsstatus und Chemotherapeutika	49
3.6 Statistische Auswertung	51
3.6.1 Verteilung von den histologischen Subtypen und FIGO- Stadien	51
3.6.2 Korrelation ESR1-Promotor-Methylierung mit dem Überleben im Gesamtkollektiv	52
3.6.3 Korrelation ESR1-Promotor-Methylierung mit dem Überleben in der low grade Gruppe	53
3.6.4 Korrelation ESR1-Promotor-Methylierung mit dem Überleben in der high grade Gruppe	54
3.6.5 Korrelation FIGO-Stadien und Grading mit ESR1-Methylierung im Gesamtkollektiv	55
3.6.6 Korrelation Immunhistochemie mit ESR1-Methylierung im Gesamtkollektiv	56

Kapitel IV: Diskussion

4.1 Erkenntnisse aus Vorarbeiten	57
4.2 Repräsentativität des Patientenkollektivs	59
4.3 Diskussion der Ergebnisse	60
4.4 ESR1- Promotor-Methylierung als potentieller Tumormarker sowie Ausblick für die Zukunft	63

Kapitel V:

Zusammenfassung	65
------------------------	-----------

Kapitel VI:

6.1 Abbildungsverzeichnis	67
6.2 Tabellenverzeichnis	68
6.3 Abkürzungstabelle	69

Kapitel VII:

Literaturverzeichnis	70
Danksagung	74
Eidesstattliche Versicherung	75

Kapitel I :

Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist nach Brustkrebs, Darmkrebs, dem Bronchialkarzinom und dem Endometriumkarzinom die fünfthäufigste Tumorerkrankung der Frau. Nach dem Endometriumkarzinom ist es der zweithäufigste Genitaltumor der Frau und weist eine hohe Letalität auf[1].

Histologisch handelt es sich in den meisten Fällen um epitheliale Tumoren, die aus den Epithelzellen der Ovarien entstehen. Das Durchschnittserkrankungsalter in Deutschland liegt bei 69 Jahren. Allerdings sind oftmals auch jüngere Frauen unter 45 Jahren betroffen. Bei diesen Patientinnen handelt es sich jedoch häufig um Keimzelltumoren oder benigne Formen der Ovarialtumoren. Aktuell steigt die Inzidenz mit steigendem Alter der Patientinnen. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 8000 Frauen an Ovarialkarzinom[2].

Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken steigt mit der Anzahl der Ovulationen. Nulliparität, frühe Menarche, späte Menopause sowie Sterilitätsbehandlung begünstigen die Entstehung des Tumors. Bei Frauen mit PCO-Syndrom (polyzystische Ovarien) steigern die hormonellen Faktoren das Risiko einer ovariellen Entartung. Hormonersatztherapie (insbesondere Östrogenmonopräparate) nach der Menopause beeinflusst auch die Entstehung eines Ovarialkarzinoms. Frauen mit genetischer Prädisposition, z.B. einer BRCA1/-2 Mutation, entwickeln in 10-15 % der Fälle ebenfalls eine Entartung der Ovarien[3, 4]. In einigen Studien hat man mehrere Mutationen gefunden, die mit der Erkrankung assoziiert sind, z.B. Tumorsuppressorgene wie p53, KRAS oder andere DNA- mismatch-repair-Genen[1, 5, 6].

Die Einnahme hormoneller Ovulationshemmer schützt vor der Entwicklung eines Ovarialkarzinoms. Auch eine Sterilisation mittels Tubenligatur verringert das Risiko der Erkrankung[7].

Es handelt sich beim Ovarialkarzinom um eine polygene Erkrankung, mindestens fünf bis zehn molekulare Veränderungen sind notwendig für die maligne Transformation einer Ovarialepithelzelle zur Karzinomzelle.

Histologisch gibt es mehrere Subtypen, deren Ätiologie und Pathogenese sich grundlegend voneinander unterscheiden. Diese Erkenntnis ist sehr wichtig für die Therapie und Prognose der Patientinnen. Man unterteilt die Karzinome in zwei große Gruppen.

Typ I sind gut differenzierte Karzinome (G1), die teilweise aus Borderline Tumoren (low malignant potential, LMP) entstanden sind. Hier überwiegt unter anderem die KRAS Mutation.

Typ II weist ein hohes Grading (G2, 3) mit histologisch schlechter Differenzierung ohne morphologisch bekannte Vorläuferstadien[8-10]. Bei Typ II Karzinomen besteht eine erhöhte Korrelation zu p53 Mutation (50-80 %). Die unterschiedliche Tumorätiologie und die biomolekularen Mechanismen bei der Entstehung von low oder high grade Ovarialkarzinomen erfordern die getrennte Betrachtung der beiden Untergruppen, um ein vollständiges Verständnis zu erzielen und geeignete Therapien zu entwickeln[5, 11, 12].

1.1.1 Früherkennung und Tumormarker

Ein effektives Screening Programm wäre notwendig, um die Erkrankung frühzeitig zu detektieren und die Prognose zu verbessern. Bislang ist jedoch kein etabliertes Screening Programm verfügbar. Versuche eines Screening-Programms mittels transvaginaler Sonografie haben in der Vergangenheit keine Verbesserung bewirkt. Die Ergebnisse der Sonografie hängen im Wesentlichen mit dem Können und den Erfahrungen des Untersuchers ab, wodurch eine objektive Beurteilung erschwert wird[14]. Eine Kombination aus transvaginaler Sonografie sowie Tumormarkerbestimmung CA 12-5 wurde beispielsweise in einer multizentrischen, klinischen Studie mit über 20000 Probandinnen in Großbritannien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser großrahmigen Studie zeigen, dass das Ovarialkarzinom ein hochspezifisches Screening-Protokoll erfordert und viele Cofaktoren wie die

genetische Vorbelastung die Etablierung eines sinnvollen Screening Programms erschweren[15].

Die transvaginale Sonografie könnte bei der Vorsorgeuntersuchung Hinweise auf eine maligne Veränderung geben, für die Sicherung der Diagnose wird jedoch die histologische Gewebsuntersuchung benötigt[16].

Tumormarker für Ovarialkarzinome sind unspezifisch und dienen nur als Verlaufskontrolle, keineswegs der Diagnosesicherung. Der Tumormarker CA 12-5 ist der wichtigste Verlaufsparemeter. Es handelt sich hierbei um ein Glykoprotein, das in erster Linie von serösen Ovarialkarzinomen gebildet wird[17]. Es ist bei mehr als 80 % der Patientinnen mit fortgeschrittenen Tumoren erhöht. Im Frühstadium (FIGO I) ist CA 12-5 oftmals nicht stark erhöht. Außerdem ergeben sich häufig falsch positive Werte bei benignen Adnextumoren, Endometriose, genitalen und peritonealen Infektionen, Uterus myomatosus, Schwangerschaft sowie Lebererkrankungen oder Autoimmunerkrankungen. Daher wird jeder Anstieg bei Zustand nach einem Ovarialkarzinom verlaufskontrolliert um ein mögliches Tumorrezidiv auszuschließen[18, 19]. Weitere Tumormarker wie CA19-9, CA 72-4, LDH, CEA sind eher unspezifisch beim Ovarialkarzinom. Diese erhöhen sich auch bei anderen abdominalen Tumoren sowie bei Metastasen. Des Weiteren sind diese oben genannten Tumormarker im Frühstadium oftmals unauffällig und sind somit nicht entscheidend bei der Diagnosefindung. Der Tumormarker CA 19-9 ist vor allem bei muzinösen Ovarialkarzinomen erhöht, bei nicht muzinösen Ovarialkarzinomen ist die Detektion von ca. 28 % deutlich niedriger[19, 20].

In der Frühphase der Tumorerkrankung sind die Patientinnen oft asymptomatisch und bereits befinden sich mit ca. 70 % in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III, IV) bei der Diagnosestellung. Dies ist ein wesentlicher Grund für die unter 40 % liegende, niedrige 5-Jahres-Überlebensrate[2, 13].

In 10-15 % der Fälle ist eine postmenopausale Blutung das einzige Symptom. Dieses Symptom kann auch bei anderen Tumorerkrankungen des Genitaltraktes sowie verlängerter Menopause auftreten und ist somit nicht spezifisch für das Ovarialkarzinom. Die Spätsymptome sind vor allem durch progredienten Aszites oder eine fortgeschrittene Peritonealkarzinose mit Darmbefall bedingt. Die Patientinnen

leiden oftmals an Stuhlunregelmäßigkeiten, Bauchschmerzen, Obstipation, Diarrhoe, Meteorismus sowie Kachexie. In den fortgeschrittenen Stadien entwickeln viele Patientinnen aufgrund der Peritonealkarzinose Aszites oder eine enorme Vergrößerung der betroffenen Ovarien mit konsekutiver, typischer Zunahme des Bauchumfangs. Die auffällige Bauchumfangszunahme in kurzer Zeit erweckt in den meisten Fällen den Verdacht und führt die Betroffenen letztendlich zum Arzt[6, 21].

Zur Abklärung und Bestätigung der Verdachtsdiagnose sollte eine umfangreiche Untersuchung durchgeführt werden. Intermodale Diagnostiken wie transvaginale Sonografie, Oberbauchsonografie, Zytologie, CT und MRT ermöglichen ein Tumorstaging. Die anschließende chirurgische Sanierung dient teilweise der Therapie und komplettiert das Staging[17, 22].

1.1.2 TMN Klassifikation

Die im Jahr 1950 von UICC (Union internationale contre le cancer) entwickelte TNM Klassifikation ist allgemeingültig für jede Tumorerkrankung und spielt in der Therapieplanung und im klinischen Alltag eine entscheidende Rolle. Je nach Zeitpunkt und Situation des Stagings werden einzelne Buchstaben vor der eigentlichen TNM Klassifikation gesetzt. C steht für clinical (also klinischer Status), a für Autopsie, y für neoadjuvant vor Beginn einer Chemotherapie, r steht für rezidiv und p für pathologisch gesichert. Die TNM Klassifikation fasst insgesamt die drei wichtigsten Aspekte des Tumors zusammen. T beschreibt die Größe des Primärtumors und dessen Ausbreitung, N steht für Nodus, also den Lymphknotenbefall durch den Tumor. M beinhaltet die Zusammenfassung der Fernmetastasen. Die Zahlen eins bis drei als Subkriterien geben das Ausmaß der organbezogenen Tumorausdehnung an.

Die nachfolgende Tabelle 1.1 zeigt einen Überblick der TNM- und FIGO-Klassifikation beim Ovarialkarzinom.

Tabelle 1.1: TNM und FIGO Klassifikation des Ovarialkarzinoms[23, 24]

TNM		FIGO	
Tx			Primärtumor unbekannt (z.B. CUP Syndrom, Cancer of unknown primary), nicht beurteilbar
T0			Kein Anhalt für einen Primärtumor
T1		1	Tumor begrenzt auf die Ovarien
	T1a	1a	Tumor begrenzt auf ein Ovar, Kapsel intakt, kein Tumorgewebe auf der Oberfläche des Ovars
	T1b	1b	Tumor begrenzt auf beide Ovarien, Kapsel intakt, kein Tumorgewebe auf der Oberfläche des Ovars
	T1c	1c	Tumor begrenzt auf ein Ovar oder beide Ovarien, Kapsel durchbrochen, Tumorgewebe an der Oberfläche, Aszites mit malignen Zellen
T2		2	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im kleinen Becken aus
	T2a	2a	Ausbreitung auf und/ oder Implantate auf Ovar oder Adnexe
	T2b	2b	Ausbreitung auf anderes Gewebe
	T2c	2c	Ausbreitung im Becken (2a,b) mit malignen Zellen im Aszites oder Peritonealausspülung
T3		3	Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/ oder regionale Lymphknotenmetastasen
	T3a	3a	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
	T3b	3b	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung ≤ 2 cm
	T3c	3c	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung >2cm, und /oder regionale Lymphknotenmetastasen
Nx			Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0			Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1			Regionäre Lymphknotenmetastasen
M1		4	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

1.1.3 FIGO Klassifikation

Die Abkürzung FIGO steht für Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique. Diese Vereinigung französischen Ursprungs hat die FIGO-Klassifikation für gynäkologische Tumoren entwickelt, welche auf klinischen Daten sowie Staging basiert. Lokalisation und Ausdehnung sind wesentliche Bestandteile dieser international anerkannten Klassifikation. Die FIGO-Klassifikation spielt im klinischen Alltag bei der Einteilung des Ovarialkarzinoms eine größere Rolle im Vergleich zur TNM-Klassifikation. Sie lässt sich insgesamt vier Stadien einteilen.

Im Stadium 0 handelt sich um ein Carcinoma in situ. Im Stadium I ist der Tumor auf das Ausgangsorgan begrenzt, also auf die Ovarien. Im Stadium II ist das angrenzende Gewebe bereits vom Tumor befallen. Im Fall des Ovarialkarzinoms sind es die Adnexe sowie Weichteilgewebe des kleinen Beckens. Im Stadium III reicht die Ausdehnung bis zum nächsten Organ, z.B. im Rahmen einer Peritonealkarzinose oder mit regionalen Lymphknotenmetastasen. Ist das Nachbarorgan befallen oder existieren bereits Fernmetastasen, insbesondere wenn Organmetastasen feststellbar sind, spricht man vom Stadium IV. Jedes Stadium von I bis III wird nochmals in drei Substadien unterteilt, a bis c, welche die Tumorausdehnung noch näher beschreiben und klassifizieren[25].

Übertragen auf das Ovarialkarzinom ist im Stadium FIGO I das Tumorwachstum auf die Ovarien beschränkt, im Stadium FIGO Ia ist nur ein Ovar betroffen, dessen Kapsel intakt und kein Tumorgewebe auf der Kapseloberfläche nachweisbar ist. Im Stadium FIGO Ib ist ein bilateraler Befall der Ovarien mit intakter Kapsel. Im Stadium FIGO Ic ist die Ovarialkapsel durch Tumorwachstum durchbrochen oder es liegt ein maligner Aszites mit nachweisbaren Tumorzellen vor. Im FIGO II Stadium beschränkt sich das Tumorwachstum nicht mehr nur auf die Ovarien, sondern ein Befall auf das Nachbargewebe, wie beispielsweise die Adnexe oder Parametrien, ist ebenfalls nachweisbar. Wenn Peritonealmetastasen oder regionale Lymphknotenmetastasen nachweisbar sind, handelt sich um eine FIGO IIc Situation. Im FIGO IIIa-Stadium ist die Tumorausdehnung noch weiter fortgeschritten, mit mikroskopisch nachweisbaren Peritonealmetastasen jenseits des kleinen Beckens. Im FIGO IIIb haben diese Peritonealmetastasen einen Durchmesser ≤ 2 mm, im IIIc Stadium sind die

Peritonealmetastasen größer als 2 mm. Im fortgeschrittenen Stadium IV bestehen Fernmetastasen.

Im Gegensatz zur FIGO-Klassifikation basiert die TNM-Klassifikation auf chirurgischen und/oder pathologischen Informationen.

1.2 Histologische Subtypen

Das Ovar ist ein hormonproduzierendes Organ und besteht aus unterschiedlichen Gewebsarten (Keimgewebe, Epithel, Bindegewebe), welche die funktionsspezifischen Abläufe der Fortpflanzung und des dazugehörigen Hormonkreislaufes ermöglichen. Die Klassifikation der histologischen Subtypen der Ovarialtumoren wird durch die Vielfalt der unterschiedlichen Gewebsarten abgeleitet. Dabei werden das makroskopische Erscheinungsbild, der Malignitätsgrad, die Hormonproduktion und die Histogenese beurteilt.

Durchgesetzt hat sich die von der WHO festgelegte Einteilung nach der Histogenese. Die Abstammung des Gewebes wird in Gruppen unterteilt. In der nachfolgenden Auflistung sind diese nach Häufigkeit sortiert[26, 27]. Den größten Anteil machen die epithelialen Tumoren aus, die invasiv wachsen können und somit mit einer schlechten Prognose einhergehen.

- Oberflächenepithel-Stromatumoren (bis 90 %), dazu gehören die serösen, muzinösen, endometroiden Ovarialkarzinome
- Keimstrangstroma-Tumoren (5-8 %)
- Keimzelltumoren (3-5 %)
- Gonadoblastom (selten)
- Keimzell-Keimstrangstroma-Tumor (selten)
- Tumoren des Rete ovarii (selten)
- Mesotheliale Tumoren (selten)
- Tumoren unsicherer Histogenese und verschiedene Tumoren (selten)
- Gestationale trophoblastische Erkrankungen (selten)
- Weichgewebstumoren, nicht ovarspezifisch (selten, sekundärer Befall)
- Maligne Lymphome, Leukämien und Plasmozytome (selten, sekundärer Befall)

- Unklassifizierbare Tumoren
- Metastasen (z.B. Krukenberg Tumor)

1.2.1 Serös

Seröse Ovarialkarzinome zeigen histologisch papilläre Epithelstrukturen. Typisch, aber nicht spezifisch ist der Nachweis von den sogenannten Psammkörperchen mit Mikrokalzifikationen. Sie machen ca. 50 % aller Ovarialtumoren aus.

Abbildung 1.1 zeigt einen HE-Schnitt (Hämatoxylin-Eosin Färbung) eines gut differenziertes G1-Karzinomes mit dem histologischen Subtyp serös. Die einzelnen Zellstrukturen wie Stroma, Epithelzellen und Zellkerne sind noch gut voneinander abgrenzbar.

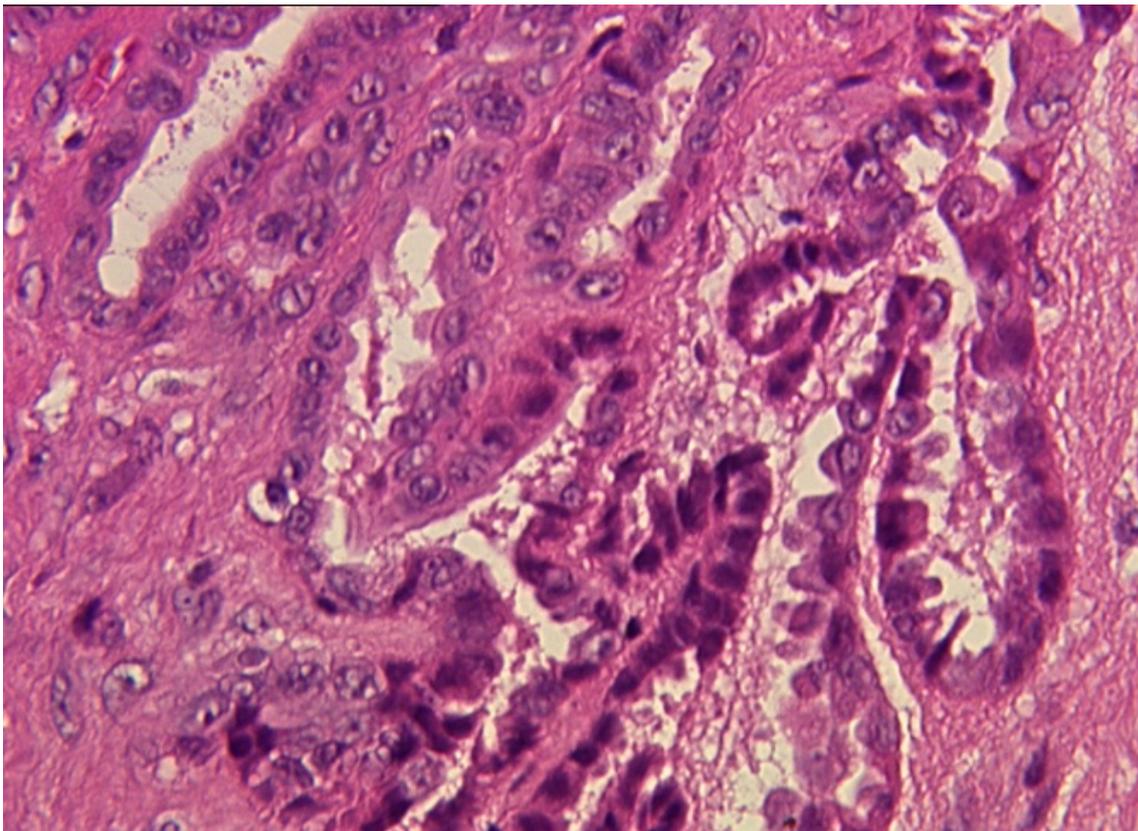


Abbildung 1.1: Ein seröses Ovarialkarzinom (G1) in HE-Färbung aus dem ausgewählten Patientenkollektiv

1.2.2 Muzinös

Bei dem Subtyp der muzinösen Tumoren handelt es sich um histologisch infiltrativ wachsende Tumorzellen mit unregelmäßig proliferierten muzinösen Drüsen, die Muzin sezernieren, also Schleimstoffe. Insbesondere die high grade muzinösen Tumoren zeigen einen Differenzierungsverlust sowie intrazellulären Muzinnachweis. Dieser Subtyp neigt im fortgeschrittenen Stadium dazu, eine relative Resistenz gegenüber der platinhaltigen Chemotherapie- Kombinationen zu entwickeln. Daher ist dieser Subtyp teils mit einem schlechten Outcome der betroffenen Patientinnen verbunden. Muzinöse Tumoren machen ca. 10 % aller Ovarialtumoren aus. Die Abbildung 1.2 zeigt ein Beispiel eines schlecht differenzierten, muzinösen Ovarialkarzinoms in HE-Färbung.

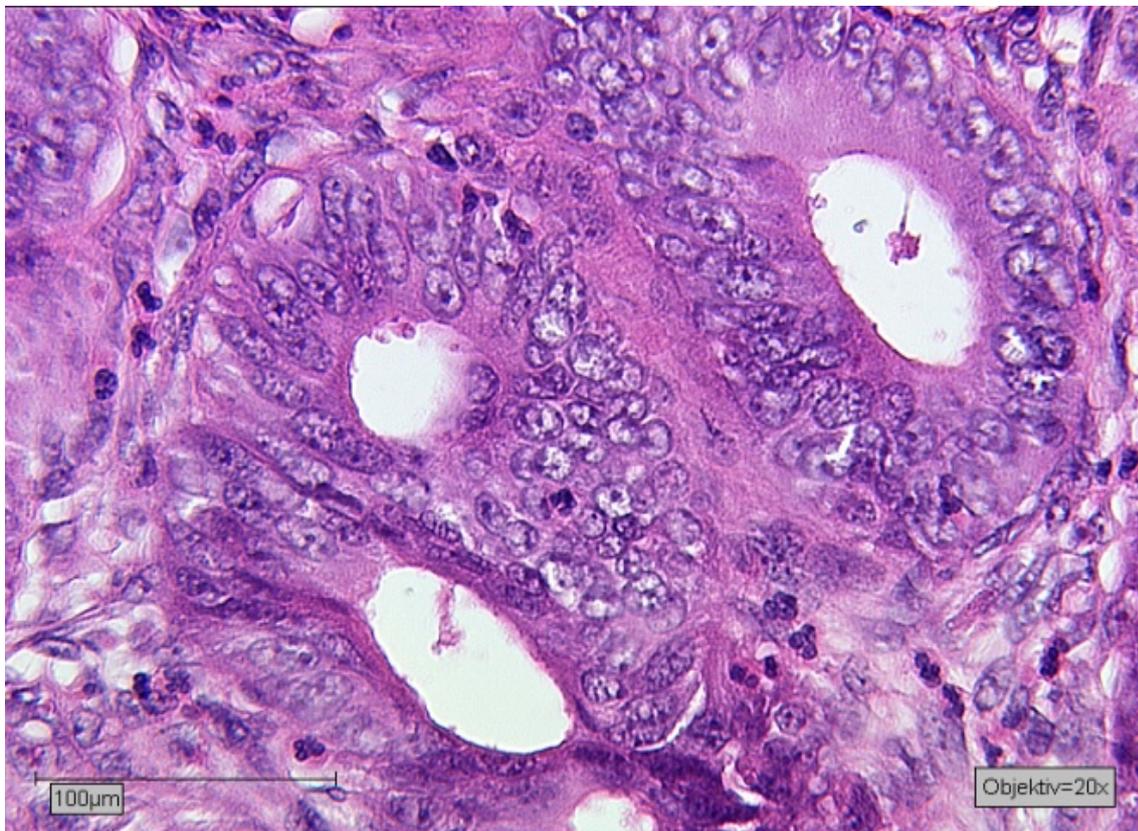


Abbildung 1.2: Ein muzinöses, schlecht differenziertes Ovarialkarzinom aus dem Patientenkollektiv (G3)

1.2.3 Endometrioid

Histologisch gesehen sind die endometrioiden Ovarialkarzinome mit den endometrioiden Karzinomen des Endometriums identisch. Eine drüsige Differenzierung sowie solide, papilläre oder plattenepitheliale Anteile sind histologisch nachzuweisen. In bis zu 25 % aller endometrioiden Ovarialkarzinome besteht gleichzeitig eine histologisch ähnliche Läsion des Endometriums. Es handelt sich hierbei dennoch lagebedingt um zwei unabhängige Tumoren. Die Abbildung 1.3 zeigt einen HE-Schnitt eines endometrioiden Ovarialkarzinoms mit den charakteristisch hoch aufgebauten Drüsenzellen.

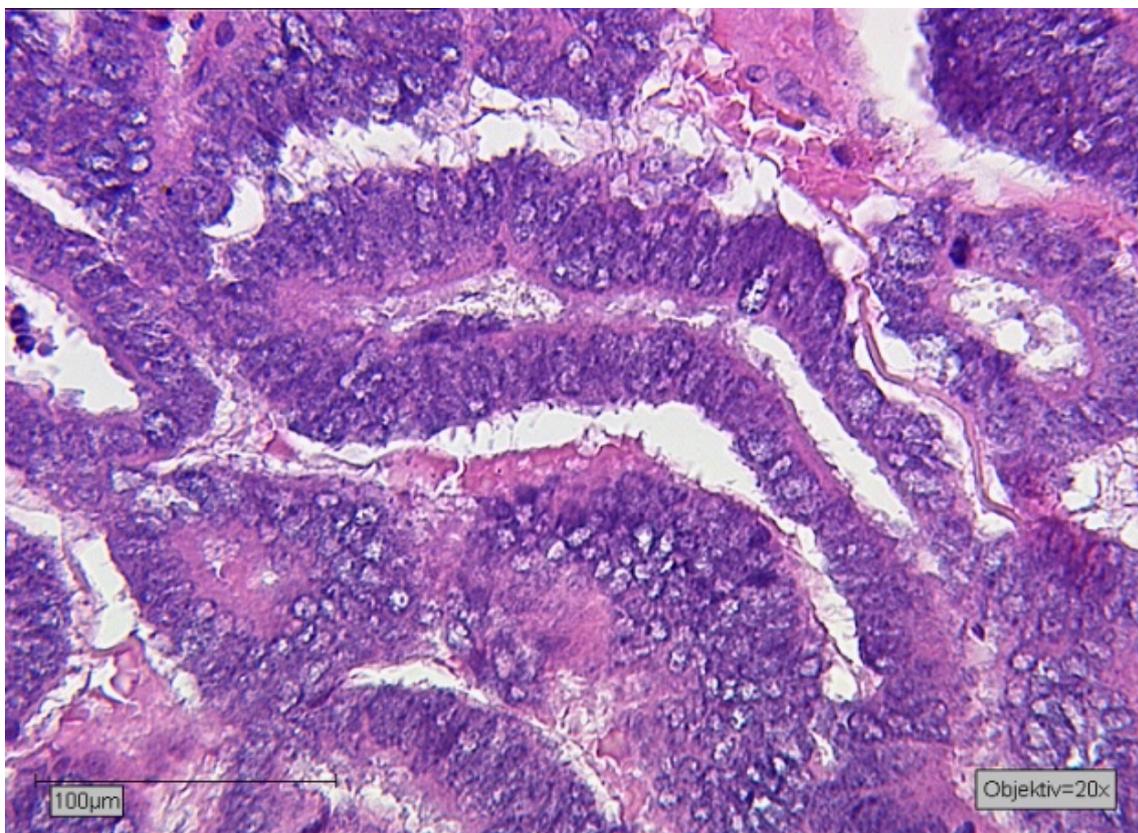


Abbildung 1.3: Ein Beispiel eines endometrioiden Ovarialkarzinoms (G1) aus dem Patientenkollektiv

1.2.4 Klarzellig

Eine seltene Subgruppe stellen die klarzelligen Tumoren dar mit einer Häufigkeit von ca. 5 bis 25%. Diese Karzinomart befällt häufig nur ein Ovar und ist im Frühstadium teilweise mit Endometriose assoziiert. Die Prognose von klarzelligen Tumoren ist im Vergleich zu high grade serösen Tumoren im fortgeschrittenen Stadium schlechter. Unter anderem bedingt durch die Resistenz der Tumorzellen gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika. Diese Eigenschaft verschlechtert den therapeutischen Erfolg enorm[28].

1.2.5 LMP/ Borderline

Etwa 10 % der malignen epithelialen Ovarialtumoren sind Borderline Tumoren, die durch die internationale Terminologie LMP (low malignant potential) zusammengefasst werden.

Bei den LMP gibt es ebenfalls mehrere histologische Subtypen wie serös, muzinös, endometrioid oder andere seltene Subtypen, wobei die serösen mit über 55 % den größten Anteil ausmachen. Borderline-Tumoren stehen klinisch und auch morphologisch zwischen den eindeutig benignen und klar malignen Tumoren[29-31].

Histologisch weisen sie auch einige Atypien wie beispielsweise Mehrreihigkeit, Papillenbildung des Epithels sowie Kernatypien und vermehrte Mitosefiguren auf. Im Gegensatz zu den invasiven Ovarialkarzinomen findet bei den meisten LMP jedoch keine Stromainfiltration statt. Einige seröse Typen neigen gelegentlich zu peritonealer Implantation. Selten werden auch hämatogene oder lymphogene Streuungen beobachtet. Abbildung 1.4 zeigt einen serösen Borderline Tumor mit guter Differenzierung (G1) aus unserem Kollektiv. Die nachfolgende Tabelle 1.2 fasst die histologische Verteilung der einzelnen Subtypen der LMP zusammen.

Die serösen LMP-Tumoren treten in 25 bis 50 % der Fälle bilateral auf. Molekularbiologisch überwiegen die KRAS/BRAF Mutationen. Die p-53-Mutationen weisen niedrige Anteile bei den LMP Tumoren auf.

LMP Tumoren treten im Vergleich zu den malignen Ovarialkarzinomen im Durchschnitt 10 Jahre früher auf und sind häufig mit einer besseren Prognose verbunden.

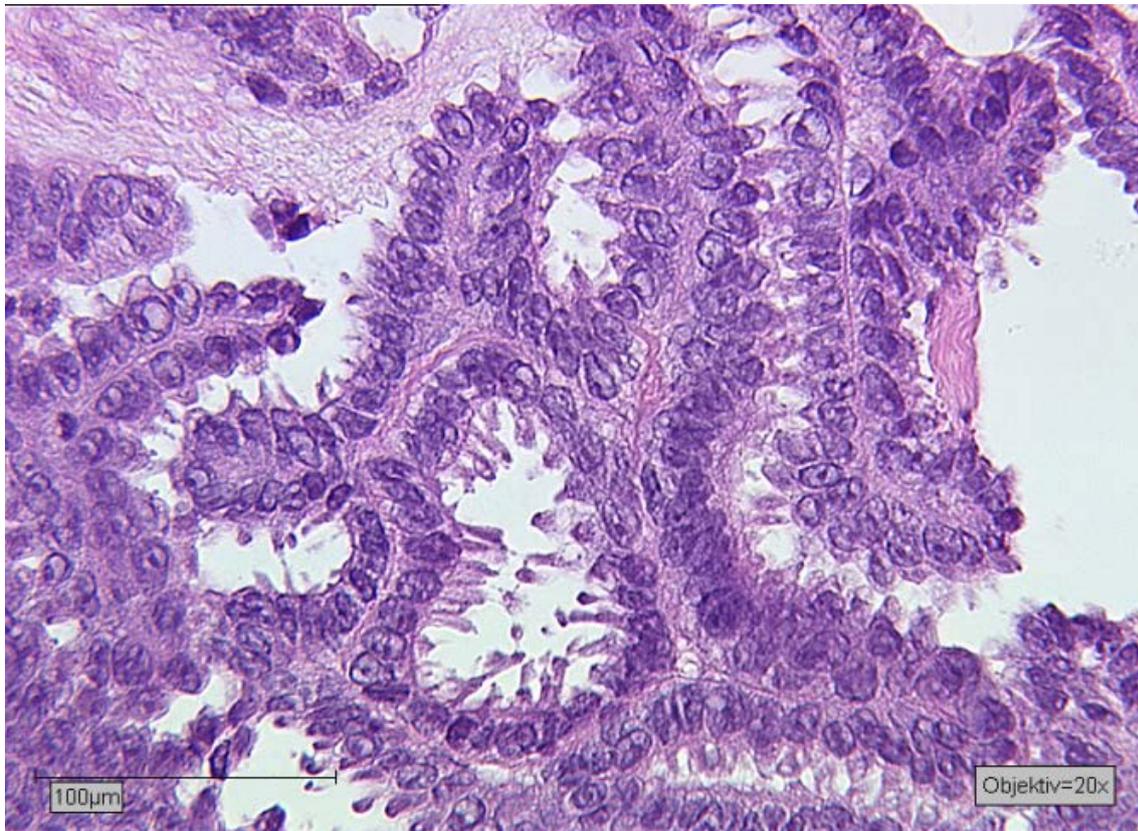


Abbildung 1.4: Ein Fall aus dem Patientenkollektiv (seröses Borderline, G1), HE

Tabelle 1.2 : Borderline Subtypen [32]

Histologischer Typ	Häufigkeit (%)	Anmerkung
Serös	90	Weitaus am häufigsten
Muzinös	5	-
Endometrioid	2	-
Klarzellig	1	-
Borderline Tumor mit Mikroinvasion des Stromas*	<1	
*Sonderform, frühe Stromainvasion, Nachweis eines oder mehrerer Herde mit einer Ausdehnung von max. 10 mm ² .		

1.3 Histopathologisches Gradingssystem

Das angewandte Gradingssystem von Silverberg[11, 33] berücksichtigt die Architektur, Kernmorphologie und die Mitosezahl. Es handelt sich hierbei um einen Punktescore.

Die Punkte der drei Parameter Architektur, Kernmorphologie und Mitosezahl werden addiert. Der maximale Wert 9 entspricht dabei der höchsten Stufe G3. Tabelle 1.3a und b zeigen die Kriterien der drei Parameter und der Entstehung des endgültigen Gradingystems. Abbildungen 1.5 und 1.6 zeigen jeweils einen HE-Schnitt einer G1- sowie G3-Probe aus dem Patientenkollektiv der Studie.

Durch die Erforschung der Pathogenese, des Wachstumsverhaltens und des Therapieverhaltens der high und low grade Ovarialkarzinome in der Vergangenheit, insbesondere bei serösen Ovarialkarzinomen erschien eine Zweistufeneinteilung sinnvoll. Die Pathogenese sowie das Wachstumsverhalten dieser Subgruppen unterscheiden sich grundlegend. Die low grade Ovarialkarzinome weisen unter anderem gehäuft Mutationen der Gene KRAS und BRAF auf, wogegen in den high grade Ovarialkarzinomen die Mutation des Gens p53 den Großteil ausmacht. Außerdem wachsen low grade Ovarialkarzinome wesentlich langsamer als high grade Ovarialkarzinome. Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass die Untergruppen in der Forschung getrennt betrachtet werden. Im Expertenkonsensus werden G1 und Bordeline zu low grade und G2 sowie G3 zu high grade eingestuft [5, 27].

Tabelle 1.3a: Histopathologisches Gradingssystem, Score Einteilung.

Punktwert	1	2	3
Architektur	Glandulär	Papillär	Solide
Kernmorphologie	relativ uniforme vesikuläre Kerne; Kerngrößenvariation ≤ 2:1 keine prominenten Nukleolen	Kerngrößenvariation zwischen 2:1 und 4:1; kleine Nukleolen; keine bizarren Kerne	Kerngrößenvariation 4:1; große eosinophile Nukleolen; evtl. bizarre Kerne
Mitoseanzahl			
Sehfeldzahl 20	0-7	8-18	≥19
Sehfeldzahl 26	8-18	10-24	≥25

Tabelle 1.3b: Gradingssystem G1-3

3-5 punkte	G1: gut differenziert
6-7 Punkte	G2: Mäßig differenziert
8-9 Punkte	G3: Schlecht differenziert

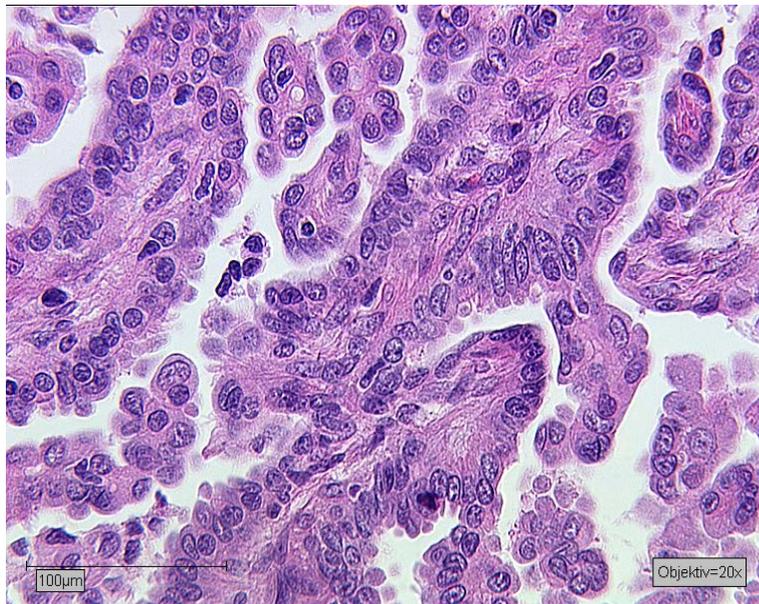


Abbildung 1.5: HE-Schnitt einer G1-Probe eines Ovarialkarzinoms.

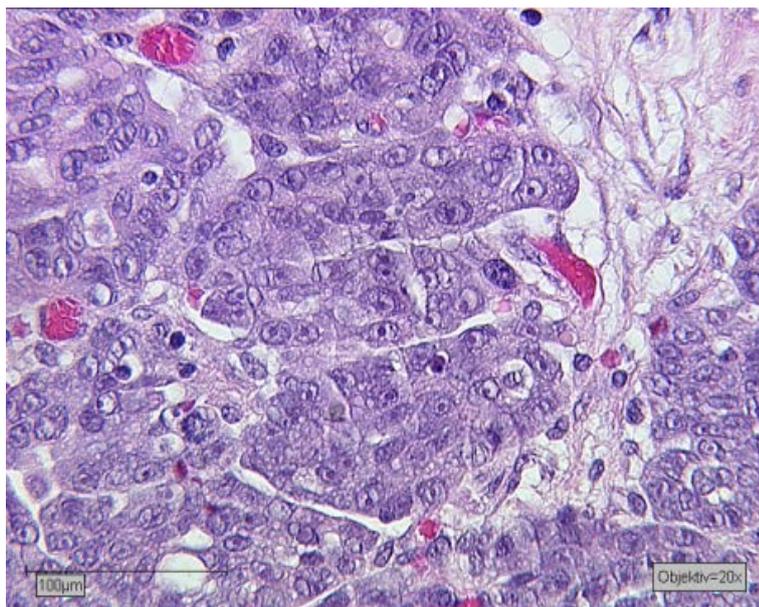


Abbildung 1.6: HE-Schnitt einer G3-Probe eines Ovarialkarzinoms.

1.4 CpG-Insel-Methylierung

1.4.1 CpG-Inseln

Die DNA besteht aus vier Basen. Zwei Purinbasen Adenin und Guanin, und zwei Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin. Die unterschiedliche Nukleotidabfolge in der DNA macht die genetische Codierung aus. Die DNA wird von zwei antiparallelen Nukleotidsträngen gebildet. Die Paarung der DNA-Basen zueinander ist nicht willkürlich. Adenin bindet mit Thymin durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Cytosin und Guanin bilden gemeinsam drei Wasserstoffbrücken aus. Die Bezeichnung CpG steht für **C**ytosin-**p**hosphatidyl-**G**uanin. Die CpG-Insel ist ein Bereich im Genom mit einer hohen Dichte an Abfolge von Cytosin auf Guanin. P steht für die Phosphodiesterbindung zwischen den Nucleosiden Cytosin und Guanin und gibt an, dass es sich hier um eine Basenabfolge handelt. CpG Inseln findet man gehäuft in Promotorregionen am 5` Ende des DNA-Strangs. Im menschlichen Genom findet man dieses Phänomen in ca. 60 % der Promotorregionen[34].

1.4.2 DNA-Methylierung

Die Methylgruppe, CH₃-, kann sich mit Hilfe von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) auf die DNA-Basen binden. Diese Modifikation verändert nicht die Basen-Abfolge, beeinflusst jedoch in manchen Genregionen die Genaktivität, zum Beispiel kann die Expression bestimmter Gene dadurch supprimiert werden. Daher handelt sich dabei nicht um eine Mutation, sondern um eine epigenetische Modifikation. Die Methylierung von Cytosin in den Promotorregionen beispielsweise verhindert häufig die Expression des dazugehörigen Gens. Diese epigenetische Veränderung führt oft dazu, dass Tumorsuppressorgene oder andere für die Zellfunktion wichtige Gene nicht exprimiert werden, auch bekannt als gene silencing. Die Entartung mancher gesunder Zellen zu Krebszellen kann dadurch beeinflusst werden[35-37].

Physiologisch kommt die DNA-Methylierung auch bei der Embryogenese von Säugetieren vor. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Frühembryogenese und Differenzierung der Stammzellen spielt. Durch Methylierung der CpG-Inseln kommt es zu gene silencing und dadurch entsteht eine Selektion bei der Genexpression[38-40].

Im Mausmodell führen Mutationen der DNMTs zu vermehrter Deregulation der DNA-Methylierung und somit zu gene silencing, das teilweise zu Letalität des Mausembryos führt. Diese Erkenntnis verdeutlicht die wichtige Bedeutung der DNA-Methylierung und die entscheidende Rolle der DNMTs in der Entwicklung von Säugetieren[41].

1.4.3 Methylierung des ESR1 (Östrogenrezeptor α)

Insbesondere die DNA-Methylierung des Östrogenrezeptor α bzw. dessen zugehöriges Gen ESR1 in Assoziation mit Tumorentstehungen wurde in der Vergangenheit bereits für mehrere Tumorarten wie das Mammakarzinom, Kolonkarzinom sowie das Zervixkarzinom beschrieben. Wie diese epigenetische Veränderung das Ovarialkarzinom beeinflusst, ist noch weitestgehend ungeklärt.

Bereits 1994 beschrieb Issa et al.[42] die Methylierung von CpG-Inseln in der Promotor-Region des ESR-Gens in kolorektalen Karzinomen mittels methylierungsspezifischer Restriktionsenzyme (methylierungsspezifische PCR). Diese epigenetische Modifikation korreliert eng mit dem Expressionsverlust (gene silencing) in Proben aus kolorektalen Karzinomen oder Adenomen. Weiterhin beschrieb Issa et al. 1997 die Hypermethylierung des Östrogenrezeptors in 86 % der untersuchten hämatopoetischen Neoplasien und akuter Leukämien und Lymphomen[43].

1998 fand Lapidus et al. heraus, dass primäre Brustkrebszellen ebenfalls eine Methylierung der CpG-Inseln des Östrogenpromotors aufweisen[44].

Für die Ovarialkarzinomzellen wurden auch einige Gene entdeckt, die durch Hypermethylierung ausgeschaltet sind. Manche haben eine hohe Methylierungsrate, manche sind nur moderat methyliert. Die Bedeutung der Methylierung dieser Gene bei der Entartung ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Besonders gut erforscht ist das BRCA1-Gen in Ovarialtumoren. Die Hypermethylierung von BRCA1-Gen führt zu verringerter Expression des Gens. Dieses Phänomen kann insbesondere in high grade Tumoren beobachtet werden[42].

Der Methylierungsstatus des ESR1-Promotors in high grade Ovarialkarzinomen sowie in LMP Tumoren wurde von Wiley et al. 2005 mittels herkömmlicher methylierungsspezifischer PCR untersucht. Es zeigt sich bei high grade

Ovarialkarzinomen eine Methylierungsrate von 57 % sowie 42 % für LMP[45]. Die Abbildung 1.7 veranschaulicht schematisch den Methylierungsprozess.

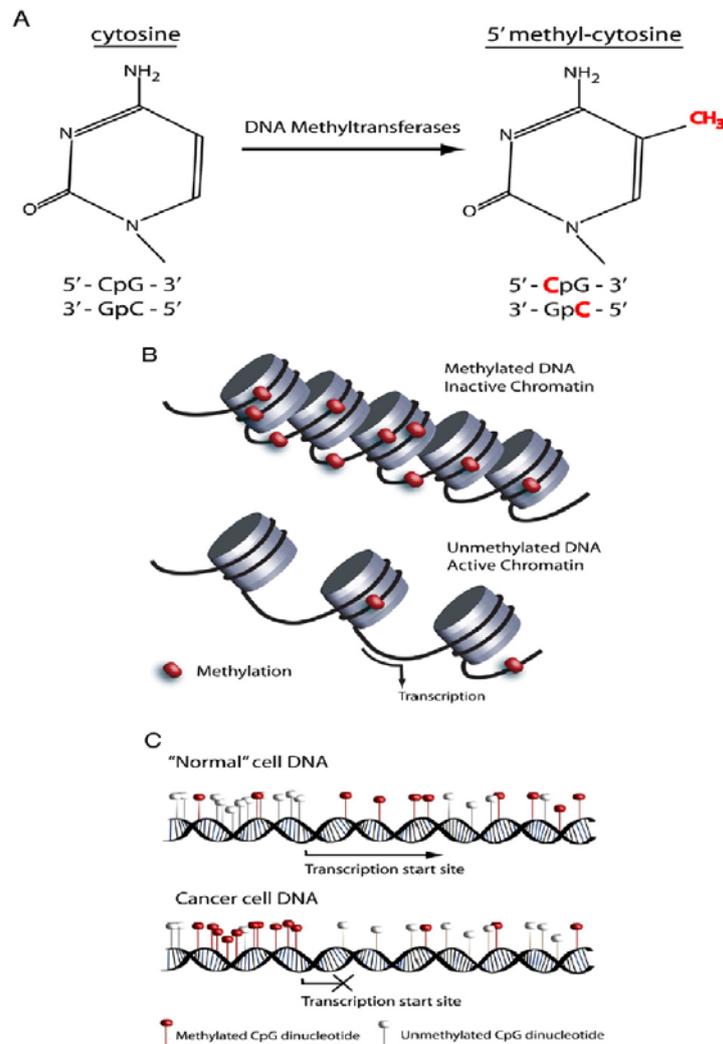


Abbildung 1.7: Ablauf der Methylierung und deren Auswirkung auf die Transkription. A) Durch das Enzym DNA-Methyltransferase wird eine Methylgruppe an Cytosin gebunden. B) Methylierte DNA bewirkt eine Inaktivierung des Chromatins. Demethylierung initiiert die Gentranskription, da das Chromatin dadurch gelockert und zugänglich für Transkriptionskomplexe gemacht wird. C) Im Vergleich zu gesunden Zellen zeigt eine Hypermethylierung der CpG-Insel in der Promotor-Region eine Inaktivierung des Gens [46].

1.5 Östrogenrezeptor

Der Östrogenrezeptor (ESR) ist ein intrazellulärer nuklearer Rezeptor, der in vielen Geweben exprimiert wird. Das dazugehörige Hormon Östrogen gehört zur Gruppe der lipidlöslichen Steroidhormone, welches die Zellmembran passieren muss um an den intrazellulären Östrogenrezeptor anzudocken. Es sind zwei Subtypen des ESR bekannt, ESR α bzw. ESR1 sowie ESR β bzw. ESR2. Das Gen für ESR1 befindet sich auf Chromosom 6q25.1 und das Gen für ESR2 ist auf dem Chromosom 14q23.2 lokalisiert. 1985 wurde erstmals die cDNA des ESR1 kloniert und sequenziert (1785 Nukleotide, 595 Aminosäuren). Zehn Jahre später wurde die zweite Isoform des ESR2 sequenziert. Beide Isoformen unterscheiden sich nicht stark voneinander und werden gemeinsam auf Thymus-, Milz-, Ovarial-, Hypophysen-, Mamma-, Hoden- und Darmepithelzellen exprimiert. Die Verteilung von ESR1 und 2 ist jedoch organspezifisch. So dominiert beispielsweise ESR1 in der Leber und ESR2 in den Darmepithelzellen. Im gleichen Organ können beide Subtypen verteilt sein, beispielsweise wird ESR1 hauptsächlich in den Thekazellen und ESR2 in den Granulosazellen des Ovars exprimiert[47].

Durch alternatives Splicing entstehen mehrere mRNA Transkripte, die sich hauptsächlich in ihrem nicht translatierten 5' Ende unterscheiden. So entstehen ESR1 und 2. Der translatierte Anteil des jeweiligen Rezeptors unterscheidet sich allerdings geringfügig voneinander[47, 48].

Der 529bp lange Promotor des ESR1 hat mehrere Bereiche. Lapidus et al. veröffentlichten 1998 ein Methylierungsmuster der Promotorregion[44]. Mittels methylierungs-spezifischer PCR und methylierungsspezifischer Sequenzierung erfolgt die Unterteilung in sechs Bereiche. Insbesondere die ER-negative Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ohne nachweisliche Methylierung der Promotor-Region des ESR sowie die ER-positive Mammakarzinomzelllinie MD-MBA 231 mit nachgewiesener Methylierung der Promotor-Region wurde in dieser Arbeit näher beschrieben. Diese Erkenntnis dient dann als Positiv- und Negativkontrolle der Methylierung des ESR1-Promotors in dieser Studie.

1.6 Zielsetzung

Die Methylierung der Promotor-Region des ESR1 könnte möglicherweise die Entstehung des Ovarialkarzinoms beeinflussen. Derzeit gibt es wenige Untersuchungen über den Methylierungsstatus des Promotors in ESR1 in Ovarialkarzinomen sowie dessen mögliche prognostische Bedeutung auf das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom.

In dieser Studie werden Patientinnen mit Ovarialkarzinom retrospektiv identifiziert, deren Überlebensdaten und weitere klinische Daten wie FIGO-Stadien, Tumorbiologie, Resektionsstatus und Applikation einer Chemotherapie erhoben. Anschließend folgt die Untersuchung des Methylierungsstatus des ESR1-Promotors in diesem Kollektiv.

Ziel der Studie ist die Korrelation des ESR1-Promotor-Methylierungsstatus mit den klinischen Parametern sowie mit dem Überleben der Patientinnen, um die mögliche prognostische Bedeutung der Promotor-Methylierung zu evaluieren.

Kapitel II:

Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Patientenkollektiv, Herkunft des Materials

Für diese Studie wurden alle Patientinnen, die zwischen 2000 bis 2009 wegen Ovariakarzinom in der Frauenklinik Maistraße der Ludwig-Maximilians Universität München (LMU) behandelt wurden, retrospektiv rekrutiert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der LMU überprüft und genehmigt. Die Proben sowie klinische Daten wurden nummeriert und anonymisiert verwendet.

Mithilfe des Tumorregisters der Klinik konnten 75 Patientinnen mit Ovariakarzinom identifiziert werden. Von diesen 75 Patientinnen wurden Daten zu Tumorstadien, Histologie, OP-Status, adjuvanten oder neoadjuvanten Chemotherapien sowie Überlebensstatus aus den Krankenakten retrospektiv erhoben. Die zugehörigen, in Paraffin eingebetteten Blöcke der Tumorpräparate wurden begutachtet und die benötigten Schnitte von den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie daraus angefertigt. Die Paraffinblöcke enthalten Tumorgewebe der Ovarien, sowie Anteilen der zugehörigen Adnexe. Für die DNA-Isolierung wurden pro Fall vier 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Für die immunhistochemische Untersuchung wurde pro Präparat zwei 3 µm dicke Schnitte benötigt. Ein weiterer 3 µm dicker Schnitt wird mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Dieser dient zur Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und benachbartem Normalgewebe während der Mikrodissektion.

2.1.2 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden folgende Reagenzien und Materialien benötigt.

- Xylol
- Ethanol 100 %, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol 96 %, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol 70 %, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol 50 %, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Aqua destillata
- QIAamp® DNA FFPE Tissue kit, Qiagen GmbH, Hilden Deutschland, dieser Kit besteht aus folgenden Bestandteilen:
 - QIAamp MinElute® Columns
 - Collection Tubes
 - Buffer ATL: tissue lysis buffer
 - Buffer AL: Lysis buffer
 - Buffer AW1: wash buffer
 - Buffer AW2: wash buffer
 - Buffer ATE: elution buffer
 - Proteinase K: tissue lysis enzyme
- Schüttelinkubator Thermomixer comfort, Eppendorf 1,5 ml
- DNA Konzentrationsmessung: Implen Nanophotometer, Implen, München

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels eines kompletten DNA-Extraktionskits der Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland.

2.1.3 Bisulfit-Behandlung

Die Bisulfit-Behandlung der extrahierten DNA-Proben wurde mittels EpiTect®Bisulfite kit durchgeführt. Das fertige Kit beinhaltet sämtliche Reagenzien, die während dieses Prozesses benötigt werden.

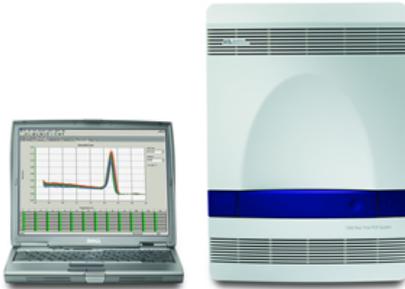
- EpiTect®Bisulfite kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Chemical module:
 - Bisulfite Mix
 - DNA Protect buffer
 - RNase-free water
 - Purification Module
 - EpiTect Spin Columns
 - Collection Tubes
 - Buffer BL
 - Buffer BW
 - Buffer BD
 - Buffer EB
 - Carrier RNA
 - 96 % Ethanol
 - RNase free Water
 - Aqua iniectionabilia, Delta Select GmbH, Dreiech Deutschland
- Thermocycler: Mastercycler gradient, Eppendorf
- Inkubator: Techne Dri-block® DB 2A

2.1.4 Real-time-PCR

- 7500 fast Real-time PCR System, Applied Biosystems
- Taqman® Fast Universal PCR Master Mix
- Aqua ad iniectionabilia, Delta Select GmbH, Dreiech
- Taqman Cytokeratin 19
- PCR Platte: Optical fast 96-Well-Platte, Applied Biosystems
- Adhesive Cover, Applied Biosystems

Für alle Reaktionsschritte:

- Reaktionsgefäße : „Eppendorf Tubes“ 1.6 ml, farblos, Biozym Biotech Trading GmbH, PCR Tubes, 1 ml
- Pipettenspitzen: 10 µl, 30 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl
- Pipetten: „Eppendorf “ 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl



[49]

Abbildung 2.1: Das verwendete PCR Gerät von Applied Biosystems, 7500 fast Real-time PCR System

Weitere Geräte:

- Thermocycler: Mastercycler gradient: Eppendorf
- Vortex: Corning LSE vortex Mixer
- Zentrifuge: Centrifuge 5415D Minispin, Eppendorf
- DNA-Messung: Implen Nanophotometer
- Inkubator: Techne Dri-Block
- Schüttelinkubator: Thermomixer comfort, Eppendorf 1,5 ml

2.1.5 Immunhistochemie

Die OP-Präparate wurden in 4 %iger Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus diesen Paraffinblöcken wurden mit konventionellen, histologischen Methoden 2-3 µm dicke Schichten angefertigt. (Super Frost Plus, Menzel, Germany).

Die Immunhistochemische Färbung erfolgt standardisiert nach Protokoll für die klinische Routine durch die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie im Pathologischen Institut des Klinikums Großhadern.

Für die immunohistologische Färbung der ER (Östrogenrezeptor) und PR (Progesteronrezeptor) Expressionen wurde Ventanas Benchmark® XT in an automatic manner verwendet.

Remmele Scores für PR und ER werden für jede Probe erhoben und anschließend statistisch mit den klinischen Daten korreliert.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA- Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgt aus Paraffin eingebettetem Tumorgewebe der Ovarien sowie Tubengewebe. Es werden vier 10 µm dicke Schnitte auf Objektträger aufgetragen, die ungefärbt bleiben. Ein weiterer 3 µm dicker Schnitt, der an die Präparate angrenzt, wird mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Dieser Schnitt dient der histologischen Erkennung und Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe. Gleichzeitig erleichtert dieser Schnitt die Mikrodissektion auf den Präparaten, sodass präziser das Tumorgewebe entnommen werden kann.

Um die Schnitte zu entparaffinisieren, werden sie zunächst zweimal 30 min in ein Xylolbad eingetaucht. Anschließend durchlaufen die Präparate eine absteigende Alkoholreihe, die wie folgend aufgebaut ist: 2 Kammern mit 100 %igem Ethanol, dann jeweils eine Kammer mit 96 %igem Ethanol, 70 %igem Ethanol und 50 %igem Ethanol. In jeder Kammer werden die aneinander gereihten Objektträger ca. zehnmal hin und her geschwenkt. Um die Überreste vom Paraffin vollständig zu entfernen, werden die Präparate anschließend in einer Kammer mit Aqua destillata eingetaucht. Hier verbleiben die Präparate, bis sie mit einem Skalpell unter Sicht im Mikroskop (Mikrodissektion) vom Objektträger gelöst werden. Bei nassen Präparaten kann das Tumorgewebe einfacher und genauer vom umliegenden Gewebe getrennt werden.

Die DNA- Extraktion erfolgt mit den QIAamp® DNA Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangabe im Handbuch. Jeweils 4 der 10 µm dicken Schnitte werden in 180 µl „ATL Puffer“ und 20 µl Proteinase K aufgenommen. Über Nacht werden die Proben bei 55°C in einem Schüttelinkubator gehalten, währenddessen findet die Zersetzung der Zellen statt. Am nächsten Morgen gibt man 200 µl „AL Puffer“ zu den Proben und diese werden für weitere 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach fügt man 200 µl 100 %iges Ethanol hinzu, mischt die Proben gut durch und anschließend wird jeweils der gesamte Inhalt jeder Probe zur DNA-Reinigung auf die Säule mit einem Membranfilter (MinElute® Columns, im Set mitgeliefert) aufgetragen. Eine Minute werden die Proben bei 8000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss wird verworfen. Dieser Schritt wird mit jeweils 500 µl „AW1 Puffer“ und „AW2 Puffer“ wiederholt. Die Lösungen werden dabei auf die Säulen aufgetragen, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Zum Trocknen der Säulen werden die Proben nochmals zwei Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss wird jeweils verworfen. Anschließend werden die Säulen auf neue Reaktionsgefäße gesetzt und mit 20 µl „ATE Puffer“ geladen. Zur Gewinnung der DNA werden die Proben nochmals für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Eluat mit der gelösten DNA wird im neuen Eppendorf-Gefäß (2 ml) aufgefangen.

Die Konzentrationen der gewonnenen DNA-Proben werden photospektrometrisch mit dem Nanophotometer der Firma Implen gemessen. Für die weitere Verarbeitung sollte die Konzentration mindestens 100 ng/ml betragen. Bei zu hoher Konzentration werden die Proben mit „RNase free Water“ verdünnt und die Konzentration erneut bestimmt. Für diese Konzentrationsmessung wird jeweils ein Mikroliter Eluat benötigt. Die Proben werden anschließend bei -20° C aufbewahrt.

Für die Bisulfit-Behandlung braucht man von jeder Probe ein exaktes Volumen von 20 µl mit einer absoluten DNA-Menge von 2000 ng. Da die DNA-Konzentrationen und Volumina der Proben unterschiedlich sind, müssen diese mit einem weiteren Schritt angepasst werden und die benötigte Menge an „RNase free Water“ wird für jede Probe einzeln berechnet.

Folgende Formeln werden dafür angewandt:

- $2000\text{ng} : \text{DNA Konzentration} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) = \text{Volumen DNA}(\mu\text{l})$
- $20\mu\text{l} - \text{Volumen DNA} = V \text{ „RNase free Water“}$

2.2.2 Natriumbisulfit-Behandlung

Die Bisulfit-Behandlung der DNA-Proben ist ein entscheidender Schritt für die anschließende Unterscheidung methylierter DNA-Abschnitte mittels Real-time-PCR. Dabei wird die biochemische Modifizierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil bewirkt. Methylierte Cytosine bleiben nach der Behandlung weiterhin unverändert, sodass eine Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Proben durch die Real-time-PCR stattfinden kann.

Bei der später folgenden Real-time-PCR wird statt des Uracils Thymin in die Amplikons eingebaut.

Für die Natriumbisulfit-Behandlung werden zwei Mikroliter DNA eingesetzt. Je nach Konzentration und Volumen des Eluats wird „RNase free Water“ hinzugefügt um das notwendige Volumen von 20 µl zu erreichen. Die Konzentration der DNA-Proben wird möglichst ≥ 100 ng/ml gehalten.

Die Bisulfit-Behandlung besteht aus zwei Hauptschritten und erfolgt nach dem Handbuch des Herstellers Qiagen EpiTect®. Vor dem eigentlichen Versuch müssen einige Reagenzien zunächst vorbereitet werden.

„BW Puffer“ wird in 30 ml 96 bis 100 % Ethanol aufgelöst, das Gefäß kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

„BD Puffer“ wird in 27 ml 96 bis 100 % Ethanol aufgelöst und bei 2 bis 8°C im Kühlschrank aufbewahrt. Bei längerem Lagern können sich Kristalle bilden, die durch ein lauwarmes Wasserbad wieder aufgelöst werden können. Kristalliner Puffer ist ungeeignet für die Bisulfitbehandlung.

Lyophilisierte „Carrier RNA“ wird in 310µl „RNase free Water“ aufgelöst, sodass eine Konzentration von 1 µg/µl entsteht. Diese Lösung reicht für 48 Proben. Falls die Lösung nicht komplett auf einmal verbraucht werden kann, kann sie bei -20°C bis zu einem Jahr aufbewahrt werden.

Die „RNA carrier“ Lösung wird in „BL Puffer“ aufgelöst, das Verhältnis für eine Probe ist 620 µl „BL Puffer“ zu 6,2 µl „carrier RNA“ Lösung. Je nach Anzahl der Proben müssen die Volumina ausgerechnet und die Lösung frisch angesetzt werden. Der

Bisulfit-Mix wird in 800 µl „RNase free Water“ unter kräftigem Rühren (Vortex®) vollständig aufgelöst. Nachdem diese Vorbereitungen abgeschlossen sind, werden zu jeder DNA-Probe 85 µl Bisulfit-Mix, 35 µl „DNA protect Puffer“ hinzugefügt. Das Gesamtvolumen in jeder PCR Tube beträgt 140 µl. (Tabelle 2.1) Anschließend durchlaufen die Proben ein Programm im Thermocycler, das folgende Reihenfolge hat: 5 min Denaturierung bei 95°C, 25 min Inkubation bei 60°C, 5 min Denaturierung bei 95°C, 85 min Inkubation bei 60°C, 5min Denaturierung bei 95°C, 175 min Inkubation bei 60°C, anschließend Erhalten der Proben bei 20°C. Bei korrektem pH-Wert der Reaktionsgemisches schlägt die Farbe von grün in blau um. Dieser Farbindikator dient als Kontrolle der korrekten Durchführung. Nach diesem Zyklus erfolgt der zweite Schritt der Bisulfitbehandlung.

Der Inhalt in jeder PCR-Tube wird jeweils vollständig in eine 1,5 ml Eppendorf Tube übertragen. Zu jeder Probe wird 310 µl „BL Puffer“ mit „Carrier RNA“ und 250 µl 96 % Ethanol hinzu pipettiert. Das Gemisch wird gut durchmischt und auf die „EpiTect® spin columns“ aufgetragen. Bei 13000 rpm werden die „Columns“ eine Minute lang zentrifugiert, der gesammelte Durchfluss in „Collection-Tubes“ wird verworfen. 500 µl „BW Puffer“ wird anschließend hinzugefügt, eine Minute bei 13000 rpm durchzentrifugiert, der Durchfluss wird verworfen. Dieser Schritt wird mit 500 µl „BD Puffer“ wiederholt. Danach werden die Proben mit geschlossenen Deckeln bei Raumtemperatur 15 min inkubiert, bei 13000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, der Durchfluss verworfen.

Direkt im Anschluss werden die Proben zweimal mit jeweils 500 µl BW Puffer gewaschen, Durchfluss ebenfalls verworfen. Die „Collection-Tubes“ werden durch neue, trockene Tubes ersetzt und die Proben nochmals bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert bis diese trocken sind. Die „Collection Tubes“ werden nun durch endgültige, beschriftete 1,5 ml „Eppendorf Tubes“ ersetzt. Auf einem Heizblock werden die Proben mit offenen Deckeln bei 56°C 5 Minuten lang getrocknet. Im letzten Schritt wird zu jeder Säule 20 µl „BE Puffer“ für die DNA Elution aufgetragen. Die Säulen werden bei 12000 rpm eine Minute zentrifugiert. Dabei wird das behandelte DNA-Material von der EpiTect® „spin-column“ gelöst. Bei der Auftragung ist zu beachten, dass die Membran nicht durch die Pipettenspitze verletzt wird um Verunreinigungen zu vermeiden.

Tabelle 2.1: Einzelne Bestandteile des Reaktionsgemisches der Bisulfit-Behandlung

Reagenzien des Reaktionsgemisches	Volumina (µl)
DNA-Lösung	Variabel (wird berechnet)
„RNase free Water“	Variabel (wird berechnet)
Bisulfit-Mix	85
„DNA protect puffer“	35
Gesamtvolumen	140

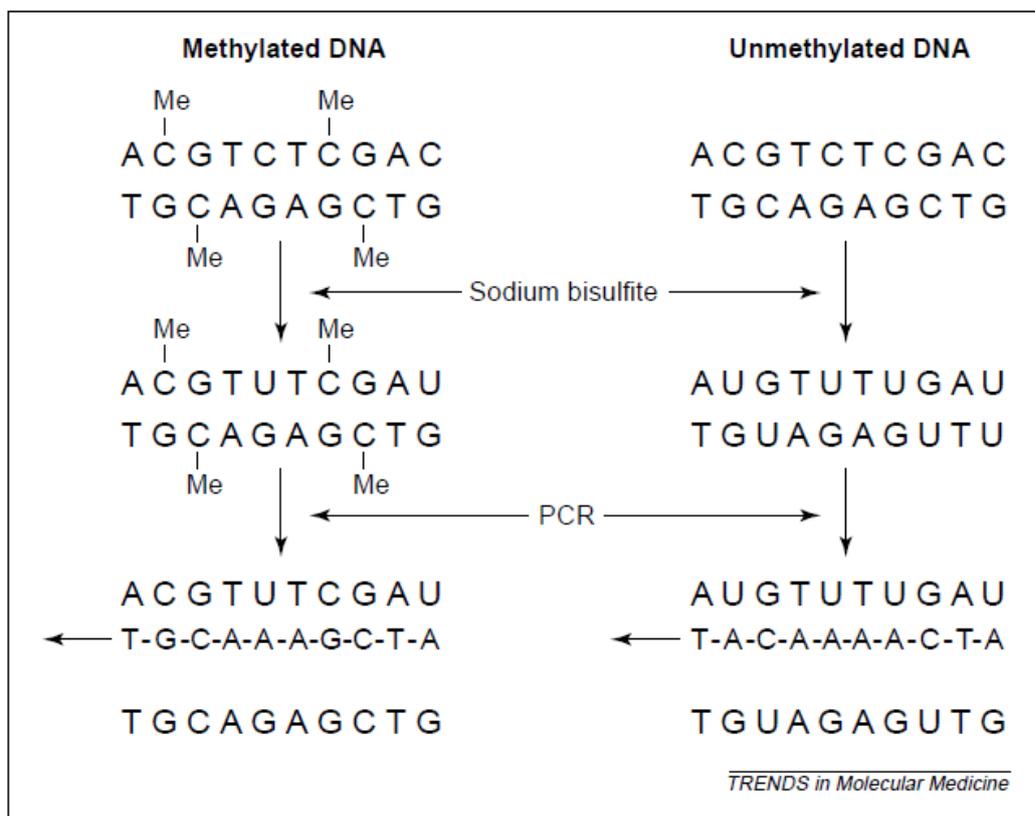


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Bisulfit-Behandlung sowie der nachfolgenden PCR. Durch die Bisulfit-Behandlung wird Cytosin in Uracil umgewandelt. Eine Methylierung von Cytosin verhindert diese Umwandlung. In der nachfolgenden PCR kann man somit die methylierte von der unmethylierten DNA unterscheiden[50].

2.2.3 Real-time-PCR

Die herkömmliche PCR (Polymerase Kettenreaktion) dient der Vervielfältigung der DNA durch exponentielle Amplifikation. Diese Methode ist mit einem höheren Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden, da anschließend die PCR-Produkte auf ein Gel aufgetragen werden müssen, um sie nachzuweisen. Der Vorteil der benutzten Real-time PCR liegt vor allem darin, dass die Amplifikation und der Nachweis des PCR Produkts simultan stattfinden.

Die Real-time-PCR (RT-PCR) basiert auf dem kontinuierlichen optischen Monitoring der PCR durch die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe. Eine spezielle fluoreszierende Sonde wird eingesetzt. Es handelt sich um ein Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat, in diesem Fall „TAMRA“) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist, um eine Extension des 3'-Ende während der RT-PCR zu vermeiden. Die Sonde hybridisiert mit den Primern an den Matrizen-Strang. Solange der Reporter-Farbstoff in räumlicher Nähe zum sogenannten Quencher steht, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs unterdrückt. Während der Extensionsphase der PCR wird die Sonde allerdings von der Taq-Polymerase verdrängt und bildet eine Y-förmige Sekundärstruktur aus. Dadurch wird die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten. Die räumliche Nähe zwischen Reporter-Farbstoff und Quencher wird unterbrochen und ebenso wie sich das PCR-Produkt mit jedem Zyklus vermehrt, steigt auch die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Da nicht 100 % bindende Sonden verdrängt werden noch bevor die Exonuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert wird, ist das gebildete Signal strikt sequenzspezifisch. Es kommt zur Primer-Extension und Sondenhydrolyse. Das PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert und die beiden Farbstoffe voneinander getrennt. Das Reporter-Signal wächst in Abhängigkeit von der Zahl der freigesetzten Reportermoleküle. Abbildung 2.3 vereinschaulicht das Prinzip der RT-PCR.

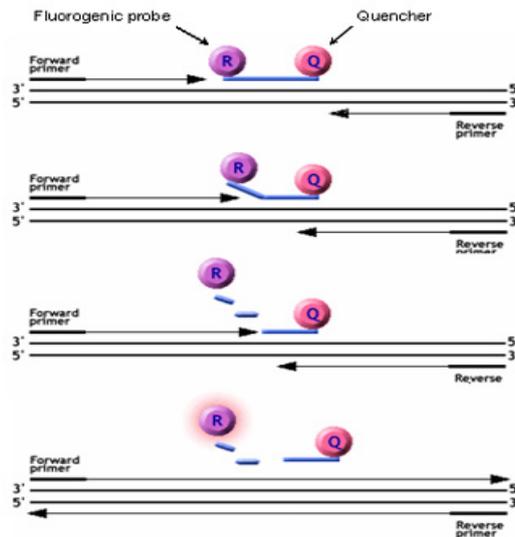


Abbildung 2.3: Schematischer Ablauf der RT-PCR. [51]

Parallel zu den Ovarialkarzinomproben wurden zusätzlich zwei Negativkontrollen (eine unmethylierte Mammakarzinomzelllinie: MCF7 und Wasser) und eine Positivkontrolle (eine methylierte Mammakarzinomzelllinie: MD-MBA-231) mitgeführt [52].

Das Volumen des PCR-Ansatzes beträgt jeweils 25µl. Die nachfolgende Tabelle 2.2 zeigt die jeweilige Bestandteile und deren Volumina.

Tabelle 2.2: Einzelne Bestandteile und Volumina des PCR-Ansatzes.

Bestandteile	Volumina
PCR Mastermix	12.5 µl
Forward Primer	2.5 µl
Reverse Primer	2.5 µl
Sonde	2.5 µl
Aqua dest.	3.0 µl
DNA	2 µl

Die Primersequenzen des Östrogenrezeptors lauten:

- Forward: 5'-GGCGTTCGTTTTGGGATTG-3'
- Reverse: 5'-GCCGACACGCGAACTCTAA-3'

- Sonde: FAM-5'-CGATAAAACCGAACGACCCGACGA-3'-TAMRA

Die PCR Primer und Sonde stammen von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Die Konzentrationen sind in der Tabelle 2.3 aufgelistet:

Tabelle 2.3: Zusammensetzung und Konzentrationen der Primer für die PCR.

Primer	Konzentration
Forward Primer	9 mM
Reverse Primer	3 mM
Probe	2.5 mM

Zusätzlich zu jeder Probe wurde Cytokeratin 19 (CK19) als „house-keeping gene“ verwendet, welches die DNA Qualität überprüft und nachweist, dass genomische DNA in den Proben enthalten ist. Cytokeratin 19 ist ein Gen, das vor allem in den Epithelien der Bronchialschleimhaut vorkommt. Es gehört zu der Familie Cytokeratine, die zur Stabilisierung und Form der Zelle beitragen. 20 Subtypen sind bis jetzt bekannt. In den Ovarialkarzinomproben ist ebenfalls Cytokeratin 19 nachzuweisen, sodass parallel eine PCR-Kontrolle mit diesem Gen durchgeführt werden konnte.

Die PCR Primer und Sonden von Cytokeratin 19 stammen ebenfalls von der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Assay ID: Hs00761767_s1; Matching Applied Biosystems 1700 Probe ID: 168194

Das Gesamtvolumen dieses PCR-Gemisches für Cytokeratin 19 beträgt insgesamt 25 µl, die einzelnen Bestandteile sind in der Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: PCR-Ansatz Cytokeratin 19 als „house keeping gene“

Bestandteile des PCR-Ansatzes Cytokeratin 19	Volumina
Mastermix	12,5 µl
Taqman Gen expression Assay (Applied Biosystems)	1 µl
Aqua destillata	9.5 µl
DNA	2 µl

Die PCR wurde mittels eines festgelegten Temperaturprotokolls durchgeführt:

Initial 95°C für 10 min, der erste Zyklus wird durchgeführt. Anschließend unverändert 95°C für die Amplifikation von 50 Zyklen je 15 Sekunden. Als letzter Schritt werden die Proben bei 60 °C für 1 min gehalten und automatisch von dem PCT Gerät ausgewertet.

2.2.4 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden aus den in Paraffin eingebetteten Präparaten 3µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht (Super Frost Plus, Germany).

Die Färbung der Schnitte für Progesteronrezeptor (PR) und Östrogenrezeptor (ER) erfolgt vollautomatisiert mit dem Färbungsgerät „Ventana BenchMark XT“ im pathologischen Institut des Klinikums der LMU München.

Die Auswertung erfolgt mittels „Remmele Score“. Remmele et Stegner [53] haben 1987 eine Quantifizierung der Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren beschrieben, die primär beim Mammakarzinom angewandt wurde. Es handelt sich um eine subjektive Beurteilung von Färbeintensität und Anzahl der gefärbten nukleären Signale. Das Produkt der beiden Punkte bildet den Multiplikations-Score, genannt „Remmele Score“. Auch als IRS bekannt (immunreaktiver Score). Nachfolgende Tabellen 2.5 und 2.6 zeigen einen Überblick über diesen Score sowie dessen Interpretation und Einteilung.

Tabelle 2.5: Einzelheiten des „Remmele scores“.

Score	Färbeintensität	Anteil positiver Zellen
0	Keine Färbereaktion	0 %
1	Schwache Färbereaktion	< 10 %
2	Mäßig starke Färbereaktion	10 % - 50 %
3	Starke Färbereaktion	51 % - 80 %
4	-	> 80 %

Tabelle 2.6: Interpretation und Einteilung von „Remmele Score“

Score	Interpretation
0-2	schwache Expression
3-6	mittlere Expression
7-12	starke Expression

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS 18.0 Software (PASW Statistics, SPSS Inc, IBM, Chicago, IL) durchgeführt. Die Korrelationsanalyse wurde jeweils für die histologischen Subtypen, Tumorstadien, Grading sowie klinische Daten durchgeführt. Dabei wurden unter anderem Kruskal-Wallis test, rank-sum test, Spearman Korrelationskoeffizient, Pearson Chi-Square, Likelihood Ratio und Linear-by-Linear Assoziation verwendet. Kaplan-Meier-Kurven wurden mit den erhobenen Überlebensdaten erstellt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Überlebenskurven wurden mit Hilfe des Chi-quadrat, log-rank Tests ermittelt. P-Werte ≤ 0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Kapitel III:

Ergebnisse

3.1 DNA-Extraktion und -Konzentration

Von den initial rekrutierten 75 Patientinnen konnten letztendlich Daten von 62 Patientinnen ausgewertet werden. Von acht Patientinnen konnte aufgrund schlechter Gewebequalität keine DNA isoliert werden. Von fünf Patientinnen konnten keine klinischen und histopathologischen Daten erhoben werden, da die Akten dieser Patientinnen nicht vorlagen. 42 von den 62 Fällen sind der Gruppe high grade Karzinomen zugeordnet. 13 davon sind low grade Karzinome. 7 sind Karzinome von dem Subtyp LMP (low malignant potential).

Die DNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Implen Nanophotometers nach der Extraktion bestimmt. Für die anschließende Weiterbehandlung der DNA muss die Konzentration mindestens 100 ng/ μ l betragen. Wenn die Proben zu hohe Konzentrationen aufweisen, also mehr als 1000 ng/ μ l, werden diese durch einen weiteren Schritt mit „RNase free Water“ verdünnt. Zusätzlich wurde ein Parameter A260/280 ratio simultan ermittelt, welcher die Reinheit der DNA angibt. Dieser Wert sollte im Idealfall circa 2 betragen.

23 Proben mussten mit „RNase free Water“ verdünnt werden, da die DNA-Konzentrationen dieser Proben mit Werten über 1000 ng/ μ l zu hoch waren. Im Durchschnitt beträgt die DNA-Konzentration 867 ng/ μ l (Range: 17-3365 ng/ μ l). Nur eine Probe erwies eine Konzentration von 17ng/ μ l, welche für die weitere Bisulfit-Behandlung unzureichend war, diese wurde daher mit einer niedrigeren Konzentration als empfohlen durchgeführt.

Der Wert A260/280 Ratio beträgt durchschnittlich 1,92 (Range: 2,18-1,65). Somit erwiesen alle Proben eine gute DNA-Qualität auf.

3.2 Bisulfitbehandlung

Nach der DNA-Isolierung wird die Konzentration der DNA für jede Probe nachgemessen, Proben mit zu hoher Konzentration wurden mit „RNase free water“ verdünnt. Da für die Bisulfit-Behandlung die DNA-Konzentration idealerweise zwischen 100ng/µl und 1000ng/µl betragen sollte.

Die Bisulfitbehandlung wurde bei allen DNA Proben mit ausreichend guter Qualität erfolgreich durchgeführt.

3.3 PCR Ergebnisse und Überlebensstatus

Die Proben wurden jeweils um 50 Zyklen amplifiziert. Die Auswertung der PCR erfolgt mit Hilfe des horizontalen und eines senkrechten Grenzwertes. Der Verlauf der PCR Kurve sollte eine exponentielle Form annehmen. Irregulärer, zackenartiger Kurvenverlauf ist artifiziell und entsteht beispielsweise durch Kontamination oder Fragmentation der DNA und somit als negativ beziehungsweise als misserfolgte PCR zu interpretieren.

Der „cycle threshold“ (Ct-Wert) schneidet die Kurve im exponentiellen Anstieg und stellt die mittlere Amplifikation fest. Dieser ist abhängig von der Startmenge der DNA und ist proportional zur DNA-Startmenge. Bei kleinerer Startmenge werden mehr Zyklen gebraucht, um das Cutt-Off zu erreichen. Die meisten Proben des Patientenkollektives zeigen eine späte Amplifikation mit einem mittleren Anstieg nach dem 40. Amplifikationszyklus, welche mit der DNA Qualität und Konzentration erklärt werden kann. Scheinbar nehmen die Paraffineinbettung und die Bisulfit-Behandlung Einfluss auf die Qualität der DNA und durch die Doppelstrangbrüche wird die Amplifikation der DNA deutlich verlangsamt. Somit wurde der Anstieg vor dem 45. Zyklus wird als positiv bewertet.

Der automatisch errechnete Ct-Wert (cycle threshold) von der Berechnungssoftware der PCR-Maschine gibt die Überkreuzung der Amplifikationskurve an der X-Achse (Anzahl der Zyklen) an und bietet eine zusätzliche Hilfe bei der Auswertung an.

Y-Achse mit der Bezeichnung Delta Rn zeigt die exponentielle Amplifikationsanzahl an.

Insgesamt konnten Ergebnisse von 62 Patientinnen ausgewertet werden, da bei den restlichen Fällen aufgrund schlechter DNA-Qualität keine Aussage getroffen werden konnte.

Für die weiterführende statistische Auswertung wurden die eingeschlossenen Fälle jeweils zu low oder high grade Subgruppen zugeordnet. Aufgrund der ähnlichen Pathogenese wurden G1 und LMP zu low grade und G2 sowie G3 zu high grade zusammengefasst.

Im Gesamtkollektiv sind insgesamt 36 Fälle methyliert und 26 unmethyliert. In der low grade Gruppe sind 20 Fälle, davon sind 10 Fälle methyliert und 10 Fälle unmethyliert. Der high grade Gruppe sind 42 Fälle zugeordnet, davon sind 26 Fälle methyliert und 16 Fälle unmethyliert.

Von den 62 eingeschlossenen Patienten sind insgesamt noch 21 Patientinnen am Leben (33,9 %), 41 Patientinnen sind bereits verstorben. Von den 26 unmethylierten Fällen sind 15 Patientinnen verstorben. 11 Patientinnen mit negativem Methylierungsstatus sind zum Zeitpunkt der letzten Beobachtung noch am Leben, das entspricht 42,3 %.

26 Patientinnen von den 36 Fällen mit positivem Methylierungsstatus sind verstorben. 10 Patientinnen in dieser Gruppe lebten noch bei der letzten Beobachtung, das entspricht 27,8 %. (Siehe Tabelle 3.1)

Tabelle 3.1: Überlebenstabelle methyliert vs. unmethyliert.

Methylierungsstatus	Total	verstorben	lebend	Prozentuale Überlebensrate
Unmethyliert	26	15	11	42,3%
Methyliert	36	26	10	27,8%
Insgesamt	62	41	21	33,9%

Die Abbildung 3.1 zeigt eine positive Methylierungskurve einer Probe vom „house keeping gen“ CK19. Die Kurve verläuft exponentiell und hat einen Cutoff-Wert bei dem 36. Amplifikationszyklus. Als Negativbeispiel zeigt die Abbildung 3.2, ebenfalls von einer CK 19 Probe, welche keine exponentiell verlaufende PCR-Kurve aufweist. Diese Probe enthielt demnach keine DNA.

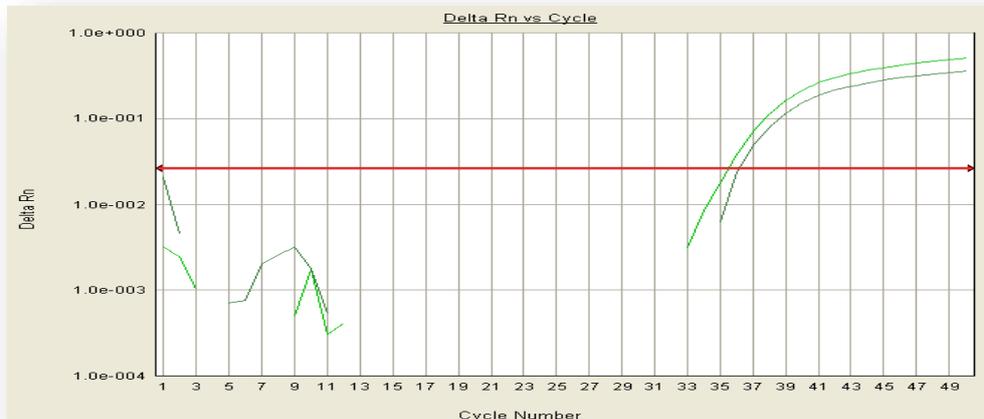


Abbildung 3.1: Ein Beispiel von zwei identischen, positiven PCR-Kurven (house keeping gene CK19) mit doppelt durchgeführten PCR-Ansätzen.



Abbildung 3.2: Ein Beispiel einer negativen PCR-Kurve (CK19)



Abbildung 3.3: Eine doppelt durchgeführte DNA-Probe mit positivem Methylierungsstatus des ESR1-Promotors.



Abbildung 3.4: Ein Fallbeispiel mit negativem Methylierungsstatus vom ESR1-Promotor, ebenfalls zweifach untersucht. Die zwei Kurven haben keinen exponentiellen Verlauf wie bei einer Positivprobe, sondern verlaufen zackenartig und irregulär.

Die Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen die jeweils PCR-Kurven einer positiven und einer negativen Probe für den Methylierungsstatus des ESR1-Promotors. Die positive PCR-Kurve in Abbildung 3.3. verläuft regelrecht exponentiell und zeigt einen Cutoff-Wert bei ca. 32. Zyklus. Die Negativkurve in Abbildung 3.4. zeigt einen unruhigen, irregulären Verlauf ohne Cutoff.

Als eine weitere Negativkontrolle gilt destilliertes Wasser, welches eine negative PCR-Kurve vorweist, da in dieser Probe keine DNA vorliegt und somit keine Methylierung nachgewiesen werden kann. Diese Negativkontrolle hat den gleichen Kurvenverlauf wie eine Probe mit negativem Methylierungsstatus (Abb. 3.5)



Abbildung 3.5: Zwei parallel verlaufende Positivkurven für CK19 im Sinne von positivem DNA-Nachweis (lila und grün) und eine Negativkontrolle (Wasser, türkis) mit flachem Verlauf unterhalb des Thresholds (grüne Horizontale).

3.4 Immunhistochemie

Insgesamt wurde für 61 Proben eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. Die immunhistochemische Färbung eines Präparats war nicht erfolgreich und eine Wiederholung konnte aufgrund unzureichenden Tumormaterials nicht durchgeführt werden. Dabei wurde die Expression von Östrogen- sowie Progesteronrezeptoren untersucht.

Die Abbildungen 3.6a und 3.6b zeigen eine Probe jeweils mit einem „Remmele Score“ von 9 für Östrogenrezeptor (ER) und einem Score 3 für Progesteronrezeptor (PR).

Die Abbildungen 3.7a und 3.7b zeigt ein weiteres Beispiel für eine hohe Proliferation des ER, jedoch mit einem geringen Nachweis von PR.

Abbildungen 3.8a und 3.8b zeigen eine Probe, bei der sowohl ER also auch PR gering ausgebildet sind, hierbei beträgt der „Remmele Score“ jeweils für ER und PR 4.

Der durchschnittliche „Remmele Score“ aller Proben für ER beträgt 6,3, für PR 9. Die Bandbreite liegt zwischen 12 und 0.

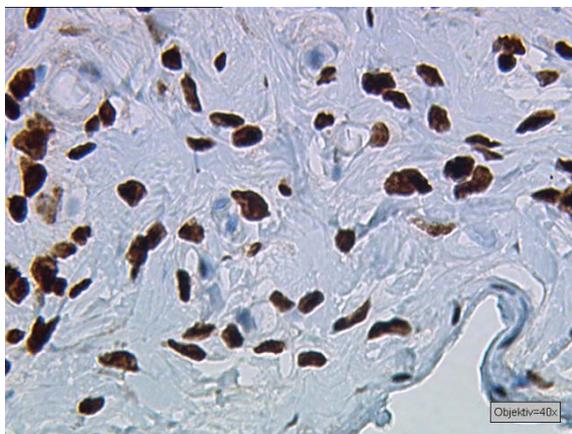


Abbildung 3.6a: ER: Remmele Score 9

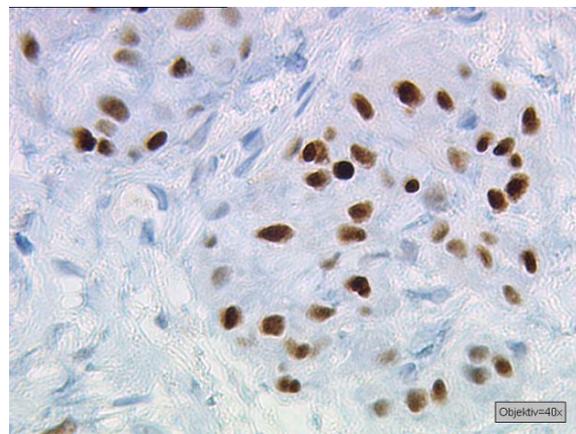


Abbildung 3.7b: PR: Remmele Score 3

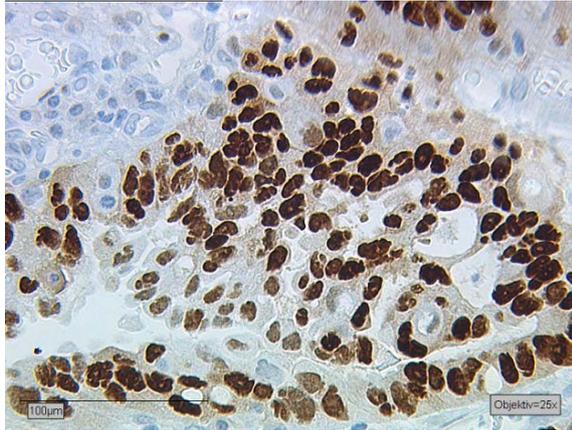


Abbildung 3.7a: ER „Remmele Score“12

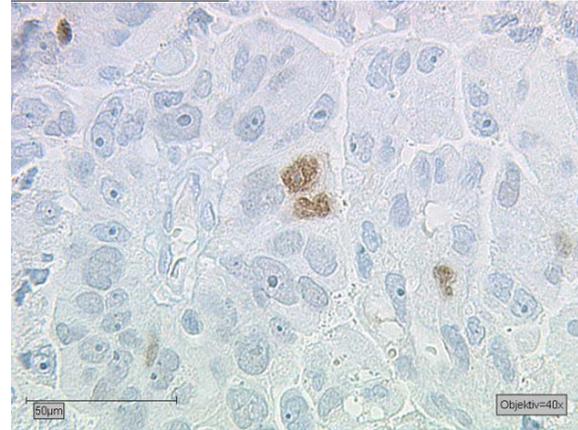


Abbildung 3.7b: PR „Remmele Score“ 1

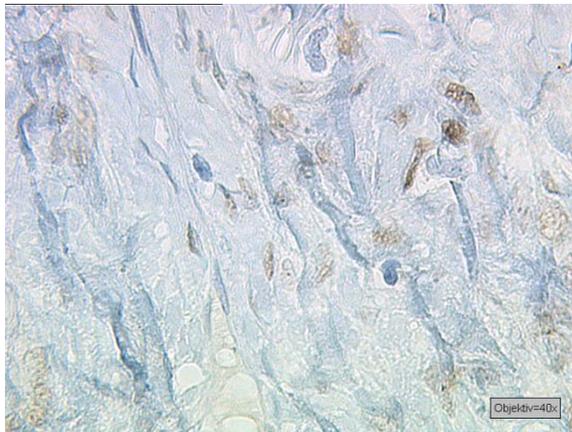


Abbildung 3.8a: ER: Remmele Score 4

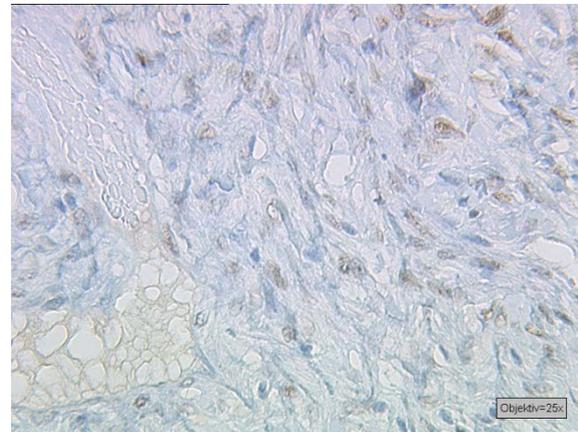


Abbildung 3.8b: PR: Remmele Score 4

3.5 Resektionsstatus und Chemotherapeutika

Daten über Resektionsstatus und erhaltene Chemotherapie konnte lediglich von 54 Patientinnen erfasst werden. Von den übrigen acht Patientinnen konnten diese Informationen aus den unvollständigen Akten nicht entnommen werden.

Von allen Patientinnen, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben, wurden 29 mittels Carboplatin/Taxol, 6 mittels Carboplatin Monotherapie sowie 5 Patientinnen mittels Carboplatin/Cyclophosphamid behandelt. 14 Patientinnen erhielten keine adjuvante Chemotherapie. Die Häufigkeit einer adjuvanten Chemotherapie ist in der high grade Gruppe mit 89% in der methylierten und 84% in der unmethylierten Subgruppe höher als in der gesamten low grade Gruppe. Hier hatten 40% mit und 50% ohne Methylierung des ESR1-Promotors eine adjuvante Chemotherapie erhalten.

Die Rate einer R0 Resektion ist ebenfalls bei der low grade Gruppe mit maximal 90% höher als die der high grade Gruppe. Maximal 16,7% der Patientinnen mit positiver Methylierung in der high grade Gruppe hatte einen Resektionsstatus R2. Im Vergleich dazu hatte in der low grade Gruppe keine Patientin einen R2-Resektionsstatus.

Die nachfolgende Tabelle 3.2 stellt eine Übersicht der klinischen Daten getrennt nach high grade und low grade Karzinomen dar. Innerhalb der beiden Kollektive werden Patientinnen mit und ohne Methylierungsstatus des ESR1-Promotors separat aufgeführt.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung Resektionsstatus, Chemotherapeutika sowie Überlebensdaten.

	High grade		Low grade	
	M+	M-	M+	M-
Durchschnittsalter (in Jahren)	66,8	65,2	60,8	59,1
FIGO				
I	3	2	4	4
II	1	2	0	2
III	21	12	6	4
IV	1	0	0	0
Resektionsstatus (%)				
R 0	77,7	55,6	90	87,5
R 1	16,7	27,7	10	12,5
R 2	5,6	16,7	-	-
Chemotherapie (%)				
Ja	88,9	84,2	40	50
Nein	11,1	15,8	60	50
Überlebensrate in Jahren (Range)	3,28 (2,41-4,15)	3,62 (2,33-4,92)	3,68 (2,38-4,98)	5,54 (4,47-6,60)

3.6 Statistische Auswertungen

3.6.1 Verteilungen von histologischen Subtypen und FIGO Stadien

In der nachfolgenden Tabelle 3.3 ist die Verteilung von FIGO-Stadien, Grading und Subtypen der eingeschlossenen Fälle aufgelistet. Die FIGO-Klassifikation und die histologische Typisierung wurden bereits von Pathologen des pathologischen Instituts LMU im Rahmen der postoperativen Aufarbeitung festgestellt. Das Grading wurde für diese Arbeit nochmals re-evaluiert. Es ergab sich keine Diskrepanz zwischen der ersten Beurteilung und der Re-evaluation.

Das Durchschnittsalter aller Patientinnen bei Erstdiagnose des Ovarialkarzinoms betrug 64,0 Jahre.

Tabelle 3.3 Verteilung der histologischen Subtypen sowie FIGO-Stadien der Kohorte.

Patientinnen in der Endauswertung		
N (Anzahl)	62	
Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose	64,0 Jahre	
Histologie	N(Anzahl)	%
Serös	50	80%
Muzinös	5	8%
Endometrioid	7	12%
Tumor grading (N)		
low grade	20	32%
high grade	42	68%
Tumorstadium (FIGO)(N)		
I	13	21%
II	5	8%
III	43	69%
IV	1	2%

3.6.2 Korrelation der ESR1-Promotor-Methylierung mit dem Überleben im Gesamtkollektiv

36 von 62 Fällen zeigen eine Methylierung des ESR1-Promotors. 26 Proben haben einen negativen Methylierungsstatus. Bei der Korrelation von ESR1-Methylierungsstatus zum Gesamtkollektiv konnte kein Einfluss auf das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosesicherung, FIGO-Stadien oder das mittlere Überleben festgestellt werden.

Patientinnen mit positivem Methylierungsstatus des ESR1-Promotors haben ein mittleres Überleben von 3,41 Jahren. Die Patientinnen mit negativem Methylierungsstatus des ESR1-Promotors lebten im Durchschnitt 1 Jahr länger, nämlich 4,36 Jahren.

Für diese Analyse im Gesamtkollektiv beträgt der p-wert 0,095 (log rank Test und Chi-Square), somit ist das Ergebnis nicht signifikant. Die Abbildung 3.9 zeigen die Kaplan-Meier-Kurven der methylierten (grün) und der unmethylierten (blau) Fälle im Gesamtkollektiv. Y-Achse zeigt das kumulative Überleben (cum survival), censored zeigt Zeitpunkt des Todes.

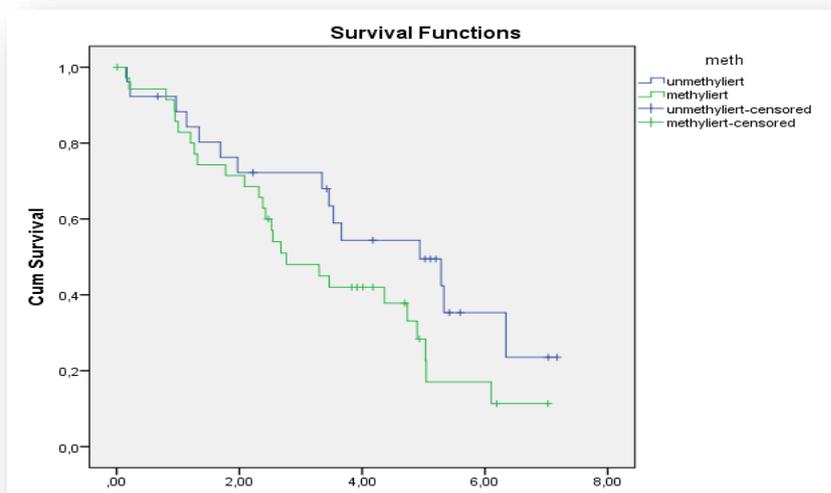


Abbildung 3.9: Überleben des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit des ESR1-Promotor-Methylierungsstatus. Die unmethylierten Fälle zeigen ein besseres Überleben, welches aber nicht statistisch signifikant ist.

3.6.3 Korrelation ESR1-Methylierung mit dem Überleben in der low grade Gruppe

In der Untergruppe der low grade Fälle (G1 und LMP) zeigt sich ein signifikant besseres Überleben der Patientinnen mit negativem Methylierungsstatus. Das mittlere Überleben der unmethylierten Fälle beträgt 5,54 Jahre (Range: 4,47-6,60), während das Überleben der methylierten Fällen 3,68 Jahre ist (Range: 2,38-4,98).

Der p-Wert beträgt 0,031 (Log-Rank Test).

Im Durchschnitt überlebten die 20 Patientinnen in dieser Untergruppe 4,64 Jahre nach der Diagnosesicherung bzw. operativer Therapie. Abbildung 3.10 zeigt die Überlebenskurven der Patientinnen in der low grade Gruppe.

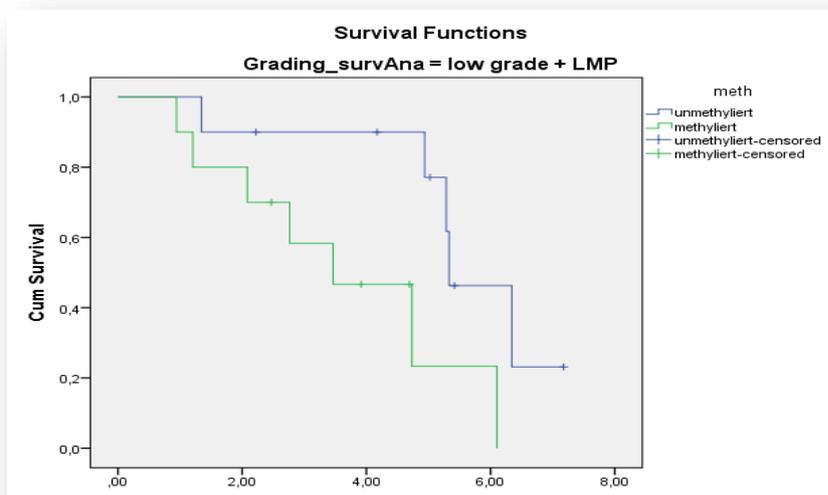
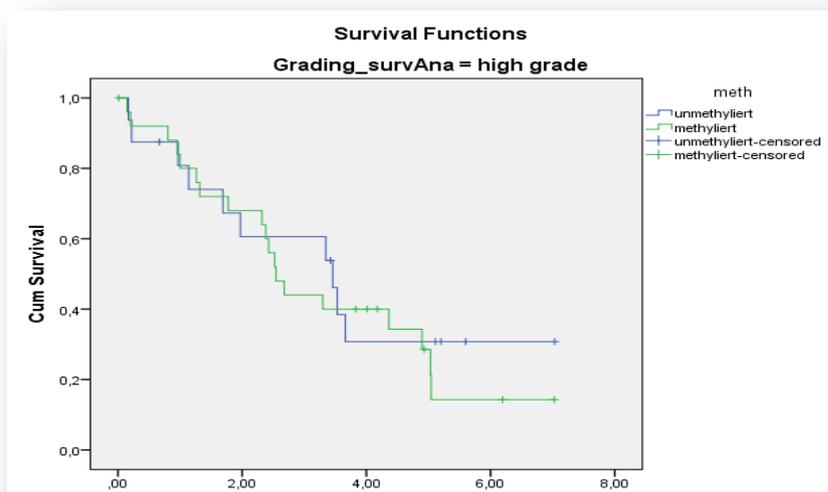


Abbildung 3.10: Überleben der low grade Gruppe in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus des ESR1-Promotors. Grüne Kurve: methyliert; blaue Kurve: unmethyliert. Die Y-achse zeigt das kumulative Überleben (cum survival). Censored zeigt die Zeitpunkte des Versterbens.

3.6.4 Korrelation ESR1-Methylierung mit dem Überleben in der high grade Gruppe

Die Untersuchung der high grade Gruppe zeigt keine Signifikanz bezüglich des Überlebens und dem Methylierungsstatus. Die Methylierung scheint demzufolge keinen prognostischen Einfluss auf das Gesamtüberleben zu nehmen.

Das mittlere Überleben bei den unmethylierten Fällen beträgt 3,62 Jahre. Die Patientinnen mit methyliertem ESR1-Promotor überlebten durchschnittlich 3,28 Jahren. Insgesamt überlebten die Patientinnen in der high grade Gruppe im Durchschnitt 3,83 Jahre nach der Diagnosestellung. Abbildung 3.11 zeigt die Überlebenskurven der Patientinnen in der high grade Gruppe. Die grüne Kurve stellt die methylierten Fälle dar. Die blaue Kurve stellt die unmethylierten Fälle dar.



p-Wert = 0,582 (Log-rank Test)

Abbildung 3.11: Überleben der high grade Gruppe in Abhängigkeit des ESR1-Promotor-Methylierungsstatus.

3.6.5 Korrelation FIGO- Stadien und Grading mit ESR1-Promotor-Methylierung im Gesamtkollektiv

Der Zusammenhang zwischen FIGO-Stadien, Grading mit ESR1-Methylierung wurde ebenfalls untersucht. Sowohl die FIGO-Stadien als auch das Grading zeigt keine signifikante Korrelation zu dem Methylierungsstatus im Gesamtkollektiv. Die Tabelle 3.4 zeigt die Verteilung der FIGO-Stadien und Methylierungsstatus. Am häufigsten ist das Stadium FIGO III vertreten mit einer Fallzahl von 43 (69%).

Die Auswertung der Überlebensdaten der 62 Fälle hat ergeben, dass der p-Wert > 0,05 beträgt und somit nicht signifikant ist.

Tabelle 3.4: Verteilung der FIGO-Stadien und Methylierungsstatus

		Methylierung		Total
		unmethyliert	methyliert	
FIGO	I	6	7	13
	II	3	2	5
	III	17	26	43
	IV	0	1	1
Total		26	36	62

3.6.6 Korrelation der Immunhistochemie mit ESR1-Promotor-Methylierung im Gesamtkollektiv

Für die Untersuchung der Immunhistochemie konnten nur 61 Fälle eingeschlossen werden, da bei einem Fall die immunhistochemische Färbung nicht erfolgreich war. Aufgrund mangelnder Materialmenge konnte die Färbung bei diesem Fall nicht wiederholt werden. Eine mikroskopisch sichtbare Expression der PR und ESR in der immunhistochemischen Färbung wird als positiv gewertet.

Dabei zeigte sich eine Expressionsrate zwischen 76% und 82% für ESR und eine positive Expressionsrate von 54% und 61% für PR. In der Tabelle 3.5 ist die prozentuale Verteilung für methylierte und unmethylierte Fälle für ESR und PR aufgelistet.

Statistische Auswertung der immunhistochemischen Analyse der 61 Fälle haben ergeben, dass der p-wert $> 0,05$ beträgt, somit nicht signifikant.

Tabelle 3.5 : Verteilung der immunhistochemischen Färbung für ESR und PR.

		Methylierungsstatus	
		unmethyliert	methyliert
ER	negativ	18%	24%
	positiv	82%	76%
PR	negativ	46%	39%
	positiv	54%	61%

Kapitel IV:

Diskussion

4.1 Erkenntnisse aus Vorarbeiten

Bereits in der Vergangenheit wurden viele Nachforschungen eines möglichen, neuen Biomarkers für das Ovarialkarzinom durchgeführt, um die Prognose und Früherkennung zu ermöglichen. Insbesondere aus der Vorarbeit von Huang et al.[54] wurden epigenetische Veränderungen zur Identifizierung und Detektion von möglichen Tumormarkern untersucht. Sie haben fünf Gene mit Hypermethylierung in Ovarialkarzinomen detektiert (CYP39A1, GTF2A1, FOXD4L4, EPB und HAAO). Dabei wurde das gesunde Epithelialgewebe von Ovarien als Gegenvergleich verwendet. Beispielsweise liegen Sensitivität und Spezifität für CYP39A1 bei 96 und 67 %, für GTF2A1 95 % und 88 % sowie für HAAO 89 % und 82 %. Sie postulieren, dass GTF2A1 allein oder in Kombination mit HAAO als exzellente Biomarker für Ovarialkarzinom fungieren könnte. Allerdings wurde die Hypermethylierung hauptsächlich in Spätstadien detektiert (FIGO III und IV). Eine Früherkennung im Rahmen des Screenings kann mit dieser Analyse nicht erreicht werden.

Im Jahre 1994 publizierte Jean-Pierre Issa et al.[55] eine Arbeit über Methylierung von CpG-Inseln von Östrogenrezeptor in Neoplasien des menschlichen Kolons. Sie berichten, dass die Methylierung der CpG-Inseln des ESR1-Promotors in Kolontumoren in allen Proben nachzuweisen ist. Außerdem untersuchten sie gesunde Gewebe, in denen diese Methylierung nicht vorhanden war, z.B. in Mamma-, Lungen-, Schilddrüsen- und Zervixgewebe. Daraus entstand die Hypothese, dass der ESR1-Promotor eine ähnliche Rolle wie die eines Tumorsuppressorgens spielen könnte. Er wird in normalem Gewebe exprimiert, in Neoplasie zusätzlich durch Methylierung epigenetisch verändert und somit deaktiviert. Die Expression und Methylierung des ESR1-Promotors in Ovarialkarzinomen wurde bisher nicht ausführlich erforscht. O'Doherty et al.[56] beschrieb 2002 zum ersten Mal die Methylierung des ESR1-Promotors in Ovarialkarzinom-Zelllinien. In drei von vier Zelllinien fanden sie eine Hypermethylierung und daraus resultierende fehlende Expression des Östrogenrezeptor Alpha Proteins. Zudem wurde festgestellt, dass die

Hypermethylierungsrate mit dem Alter steigt. Da der Altersgipfel der Erkrankung bei Frauen jenseits des 50. Lebensjahr liegt, wurde vermutet, dass die Methylierung des ESR1-Promotors bei der Tumorgenese eine wesentliche Rolle spielt.

Montavon et al.[57] untersuchten die DNA-Methylierung von unterschiedlichen Genen in high grade, serösen Ovarialkarzinomen sowie in benignen epithelialen Ovarialtumoren in Hinblick auf die Prognose. Eine wichtige Entdeckung der Studie ist die hohe Frequenz der Methylierung von HOXA9 und EN1 mit einer Rate von >95% der 80 untersuchten Fälle. Lenhard et al. fanden heraus, dass die Expression des ER von high grade zu low grade abnimmt[58].

Neben der Bedeutung der Hypermethylierung in Ovarialkarzinomen wurden in der Vergangenheit weitere epigenetische Veränderungen in anderen Tumorentitäten untersucht und es ist nachgewiesen, dass die epigenetische Inaktivierung von bestimmten Genen, z.B. Tumorsuppressorgenen, die Tumorentstehung beeinflusst. Esteller et al. publizierten 2001 eine Arbeit über Hypermethylierungsmuster von 12 Genen in 15 verschiedenen Karzinomzellen, darunter sind beispielsweise Leukämie, Mammakarzinom, kolorektales Karzinom sowie Lungenkarzinom vertreten. Sie haben herausgefunden, dass es für jedes der untersuchten Karzinome ein einzigartiges Hypermethylierungsmuster bestimmter Gene gibt, daraus resultierend spielt die Methylierung der untersuchten Gene eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der dazugehörigen Erkrankung. So sind beispielsweise eine Hypermethylierungsrate der Gene p15, DAPK, CDH1 in Leukämiezellen über 81 %[59].

DNA-Methylierung ist nicht die einzige epigenetische Veränderung, die die Pathogenese der Tumorzellen beeinflusst. Auch Histonmodifikation, Acetylierung sowie „chromatin remodelling“ führen zu Inaktivierung von Genen[50, 60].

Diese wichtigen Erkenntnisse aus Vorarbeiten helfen uns dabei, das epigenetische Phänomen der Methylierung näher zu verstehen und dessen Bedeutung in der Prognose und Therapie des Ovarialkarzinoms herauszufinden. Bisher wurde jedoch keine genauere Untersuchung des Methylierungsstatus des ESR1-Promotors in Ovarialkarzinom in Korrelation zu den Überlebensdaten sowie histologischen Subtypen und Immunhistochemie unternommen. In dieser Arbeit haben wir die Methode der RT-PCR bei der Untersuchung des Methylierungsstatus des ESR1-

Promotors etabliert und diese Information als möglichen Ansatz eines prognostischen Markers untersucht.

4.2 Repräsentativität des Patientenkollektivs

Bei dieser Arbeit wurden insgesamt 75 Patientinnen, die an einem Ovarialkarzinom erkrankt sind und sich zwischen 2000 bis 2009 in der Frauenklinik Maistrasse der LMU München in Behandlung befanden, mit Hilfe des Münchner Tumorregisters retrospektiv rekrutiert. Das durchschnittliche Erkrankungsalter des Kollektivs war 64,6 Jahre zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. In dem offiziellen Bericht des Robert-Koch-Instituts (RKI) von 2013 wurde für das Jahr 2009 und 2010 ein mittleres Erkrankungsalter von 69 Jahren angegeben. Unser Kollektiv ist im Vergleich vier Jahre jünger bei der Diagnosestellung. Dies könnte zugrunde legen, dass die medizinische Versorgung sowie die Diagnostik in Ballungszentren wie beispielsweise München und Umgebung im bundesweiten Vergleich besser sind und die Diagnosefindung bei den Betroffenen eher stattfindet. Dennoch liegt unser Kollektiv mit 64,6 Jahre bei der Diagnosestellung in der 6. Lebensdekade wie im offiziellen, bundesweiten Bericht des RKI.

In unserem Kollektiv befanden sich 43 Patientinnen im FIGO III (69 %), 13 Fälle im FIGO I sowie 5 Fälle im FIGO II und 1 Fall im FIGO IV Stadium. Diese Verteilung verdeutlicht nochmals die Beobachtung, dass die meisten Ovarialkarzinome erst im fortgeschrittenen Stadium detektiert werden[6, 61]. Auch die histologische Verteilung stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein. In unserem Kollektiv gab es 50 seröse Fälle, das entspricht 80 % der Gesamtzahl. Von den serösen Fällen sind 42 high grade (68 %). In einer Übersichtsarbeit von Prat et al. wurde ebenfalls erwähnt, dass high grade seröse Ovarialkarzinome den größten Anteil aller Subtypen mit 70 % ausmachen. Endometrioid sowie klarzellige Karzinome machen mit 10 % gemeinsam den zweitgrößten Anteil aus[62]. In dem auserwählten Kollektiv sind 12 % der Fälle endometrioid.

Mit einer Gesamtanzahl von 75 Patientinnen fand die Studie in einem kleinen Umfang statt. Davon konnten letztendlich nur 62 in die abschließende Analyse eingeschlossen werden. 13 Fälle mussten teils aufgrund schlechter DNA-Qualität der Paraffinblöcke,

teils aufgrund fehlender klinischer Daten ausgeschlossen werden. Die in Paraffin eingebetteten Präparate zeigten keine optimale DNA-Qualität für die weiterführende Untersuchung. Durch die postoperative Verarbeitung der OP-Präparate mittels Formalin und anschließend mit Paraffin zur Konservierung entstehen vermehrt Doppelstrangbrüche, welche die folgende Analyse mittels PCR erschweren. Eine größere Kohorte, insbesondere in der low grade Gruppe sowie DNA-Isolation aus Frischgewebe würden eventuell noch bessere, aussagekräftigere Ergebnisse erzielen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Für die Analyse der erhobenen Daten wurden die Fälle in zwei Gruppen eingeordnet, low und high grade Karzinome. International gibt es aktuell kein einheitliches Grading System. In einigen Studien[11] wurde dieses zweistufige Modell gewählt, da es Anhaltspunkte dafür gibt, dass es eher der Tumorätiologie entspricht. Die Pathogenese von low und high grade Ovariakarzinomen sind grundverschieden, somit auch der klinische Verlauf. Daher erscheint es sinnvoller die Ovariakarzinome in diese zwei Untergruppen einzuteilen[63, 64].

In dieser Studie wurden neben Methylierungsstatus des ESR1-Promotors auch Überlebensdaten, FIGO-Stadien, Immunhistochemie sowie angewandte Therapien in unterschiedlichen histologischen Subtypen des Ovariakarzinoms erhoben und diese Daten durch statistische Tests näher untersucht. Hormonrezeptoren spielen aktuell eine wichtige Rolle im klinischen Alltag. Rezeptorblockade ist ein wesentlicher Bestandteil der onkologischen Therapie, insbesondere beim Mammakarzinom[53]. Über das Ovariakarzinom wurde noch nicht viel berichtet, daher untersuchten wir in dem ausgewählten Kollektiv den Rezeptorstatus für PR und ER und analysierte dessen Korrelation zu den Überlebensdaten.

Wir haben herausgefunden, dass die Korrelation der Überlebensdaten mit ESR1-Promotor-Methylierung im Gesamtkollektiv sowie in der high grade Gruppe keine Signifikanz zeigt. Auch die FIGO-Stadien und Expression von ER und PR zeigen keinen Einfluss auf das Überleben der Betroffenen. Als signifikant zeigte sich aber das bessere Überleben der Patientinnen der low grade Gruppe mit negativem Methylierungsstatus des ESR1-Promotors. Dieses Ergebnis ist möglicherweise unter

anderem darauf zurückzuführen, dass die Pathogenese der low und high grade Karzinome des Ovars grundverschieden ist.

Das Ovarialkarzinom weist wie andere Tumorentitäten eine Heterogenität in der Histologie und der molekularen Pathogenese auf. Zwei wesentliche „Pathways“ werden bei der Entstehung vermutet[65]. Ein „Pathway“ zeigt, dass LMP Tumoren Vorläufer von LMP serösen, muzinösen, endometrioid und klarzelligen Karzinomen sind. Diese histologischen Subtypen werden in der Literatur als Typ I Ovarialkarzinome zusammengefasst. Typ I Karzinome weisen eine hohe Mutationsfrequenz unterschiedlicher Gene auf, unter anderem von KRAS, BRAF, ERBB2, welche die Tumorgenese bekannter Weise beeinflussen. Das mittlere 5-Jahres-Überleben beträgt bei dieser Gruppe ca. 55 %[63]. Ein anderer „Pathway“ führt zu high grade serösen Karzinomen, malignen mesodermalen sowie undifferenzierten Tumoren (Typ II Ovarialkarzinome). Im Gegensatz zu Typ I zeigt die Typ II Gruppe aggressives und invasives Wachstum im kleinen Becken, die zum großen Teil aus serösen Tumoren besteht. Diese weisen eine höhere Mutationsrate von dem Tumorsuppressorgen TP53 auf[64, 66-68]. Diese unterschiedlichen Eigenschaften bei der Entstehung sowie im klinischen Verlauf zeigen, dass es sinnvoll ist high und low grade Ovarialkarzinome getrennt voneinander zu betrachten und zu untersuchen. Diese bereits bekannten Unterschiede auf der molekularen Ebene beider Subgruppen könnte ebenfalls eine Erklärung für das Ergebnis der Studie sein. Die Rolle der ESR1-Promotor-Methylierung ist in low und high grade Karzinomen nicht gleichzusetzen.

Ovarialkarzinome sind wie jede andere Tumorerkrankung eine multifaktorielle Erkrankung. Mutationen mehrerer Gene führen zu Zellentartung. Promotor-Hypermethylierung von mehreren tumorassoziierten Genen in Ovarialkarzinomen wurden in der Vergangenheit erforscht. Prakash et al. untersuchten ein Panel dieser Gene und fanden heraus, dass drei Gene eine höhere Methylierungsfrequenz in invasiven Ovarialkarzinomen aufweisen: RASSF1A, H-cadherin, APC. Dies lässt vermuten, dass eine Akkumulation bestimmter epigenetischer Events die Entartung gutartiger Zellen zum Karzinom herbeiführen oder beeinflussen[69]. Ein weiterer Aspekt ist die Anhäufung der Ovarialkarzinome bei Frauen mit Mutationen der BRCA 1 und 2 Gene. Die Wahrscheinlichkeit beträgt für die Betroffenen ca. 40 % bis 60 %, dass sie in ihrem Leben an einem Ovarialkarzinom erkranken[70, 71]. All diese

Erkenntnisse zeigen uns, dass die Pathogenese des Ovarialkarzinoms ein wesentlich komplexerer Prozess ist. Der Methylierungsstatus des ESR1-Promotors ist nur ein Teilaspekt. Somit ist eine breitbandige Betrachtung und Analyse dieser multifaktoriellen Pathogenese notwendig um die Unterschiede der jeweiligen histologischen Subtypen näher zu verstehen.

In dieser Studie wurde keine relevante Korrelation der Expression der Hormonrezeptoren PR und ER in Zusammenhang auf das Überleben festgestellt. Die Rolle des Hormonrezeptorstatus ist für andere gynäkologische Tumorerkrankungen wie das Mammakarzinom von essentieller Bedeutung. Die Analyse der Hormonrezeptoren ist ein fester Bestandteil der Diagnostik und die antihormonelle Therapie ist eine tragende Säule in der Behandlung von Mammakarzinomen mit positivem Hormonstatus. Der Hormonrezeptorstatus beim Ovarialkarzinom hat jedoch bisher keine vergleichbare Relevanz in der klinischen Routine erlangt. Der Rezeptorstatus beim Ovarialkarzinom stellt keinen Angriffspunkt für einen potentiellen Therapieansatz dar. Somit hat der Rezeptorstatus keinen direkten Einfluss auf die Behandlung und die Prognose der Patientinnen.

Die Überlebensrate der Krebspatientinnen liegt weiteren klinischen Einflüssen wie beispielsweise Alter, Allgemeinzustand und Komorbidität der Patientinnen zugrunde. Die Operabilität im fortgeschrittenen Stadium ist ebenfalls ein wichtiger, klinischer Aspekt und beeinflusst den Krankheitsverlauf. All diese klinischen Faktoren hängen miteinander zusammen und sind individuell unterschiedlich ausgeprägt.

4.4 ESR1-Promotor-Methylierung als potenzieller Tumormarker sowie Ausblick für die Zukunft

Aktuell spielt der Tumormarker CA 12-5 die größte Rolle in der Verlaufsbeurteilung des Ovarialkarzinoms im klinischen Alltag. Allerdings ist er auch gemeinsam mit einer transvaginalen Sonografie nicht zur Früherkennung eines Ovarialkarzinoms geeignet. Zudem weist CA12-5 eine niedrige Spezifität auf und ist zudem bei benignen Erkrankungen teilweise erhöht[72]. Somit ist die Suche nach besseren Tumormarkern mit höherer Spezifität bis dato nicht beendet. Aus klinischer Sicht wäre vor allem ein Marker zur Früherkennung wünschenswert.

Die Untersuchung des DNA-Methylierungsstatus als möglichen Biomarker weist im Allgemeinen einige Vorteile auf in der Umsetzung für den klinischen Alltag. Aus Serum, Peritonealflüssigkeit sowie aus Liquor isolierte Tumorzellen reichen für die Verarbeitung aus. Diese Zellen zeichnen sich durch die biomolekulare Stabilität sowie gute Amplifikationsfähigkeit des Erbgutes aus[54, 73]. Diese non-invasive, einfache diagnostische Möglichkeit eröffnet viele Türen für eine verbesserte Diagnosestellung. Die Gewinnung des Tumorerbguts ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

Viele Gene und bestimmte Loci der DNA in unterschiedlichen Tumorzellen wurden in der Vergangenheit auf epigenetische Veränderung und Muster untersucht. Neben Methylierungsstatus spielt die Modifikation von Histonen und MicroRNA auch eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionalen Gendownregulation[74]. Die Vielfalt der epigenetischen Veränderungen in Tumorzellen erschwert jedoch die Suche nach einer klar definierten diagnostischen Methode, die die Funktion eines alltagstauglichen Tumormarkers annimmt. Mit dieser Studie haben wir zwar gezeigt, dass in der Untergruppe der low grade Fälle ein signifikant besseres Überleben der Patientinnen mit negativem Methylierungsstatus (mittleres Überleben 5,54 Jahre vs. 3,68 Jahre, $p=0,031$) vorherrscht. Die Untersuchung von ESR1-Methylierungsstatus allein wird jedoch nicht als potenzieller Tumormarker für eine zuverlässige Aussagekraft der Prognose oder des klinischen Verlaufes der Patientinnen ausreichen. Neben Erhebung anderer klinischer Daten wie FIGO-Stadien, Histologie, Alter und Komorbidität ist die Untersuchung weiterer epigenetischer Eigenschaften von weiteren Genen oder einem bestimmten Genpool notwendig, um eine zuverlässige

diagnostische Methode zu entwickeln, welche für das Ovarialkarzinom charakteristisch ist.

Durch die Erforschungen von epigenetischen Veränderungen und deren Einfluss auf die Tumorentstehung gab es in der Vergangenheit bereits neue Therapieansätze mit Inhibitoren der DNA-Methyltransferase, die das durch Methylierung verursachte gene silencing reversibel machen. Diese werden aktuell beispielsweise in der Therapie von MDS (myelodysplastisches Syndrom) eingesetzt. Weitere Nukleosidinhibitoren gegen DNA-Methylierung wie 5-Fluoro-2'-deoxycytidine und Zebularine sind noch in der Anfangsphase der Entwicklung[75-77]. Die Hemmung der DNA-Methyltransferase führt in vitro zur Toxizität für gesunde Zellen. Zudem hat im Tierversuch mit einem Mausmodell in der Vergangenheit ergeben, dass die Inhibition von einer der drei in Säugetieren bekannten DNA-Methyltransferase DNMT1, 3a und 3b tödlich endet. Außerdem ist die Aktivität der DNA-Methyltransferase während der Embryogenese von enormer Bedeutung für eine korrekte und lebensfähige Genexpression[50, 78].

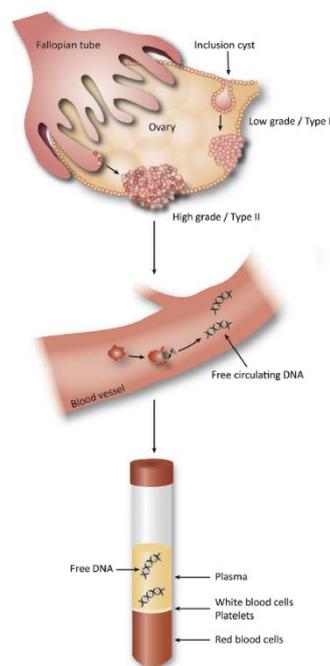


Abbildung 4.1: Detektion freizirkulierender Tumor-DNA als Biomarker [79]. Tumorzellen und deren DNA zirkulieren frei in der Blutbahn und können ohne großen Aufwand entnommen werden.

Kapitel V:

Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist das dritthäufigste gynäkologische Karzinom und wird meist im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, unter anderem aufgrund unspezifischer Frühsymptome und fehlender effektiver Früherkennung mittels Screening. Somit sind das mittlere Überleben und die Prognose im Vergleich zu den übrigen gynäkologischen Karzinomarten deutlich schlechter. Neben Tumorstadium ist die histologische Differenzierung entscheidend für die Prognose der Patientinnen.

Bereits in der Vergangenheit wurde in vielen Studien der Einfluss des positiven Methylierungsstatus des ESR1-Promotors in anderen Tumorentitäten untersucht wie beim Kolonkarzinom. Die Rolle der ESR1-Promotormethylierung beim Ovarialkarzinom ist bis dato nicht komplett entschlüsselt. In dieser experimentellen Studie wurden 75 Patientinnen retrospektiv rekrutiert, die zwischen 2000 und 2009 an der Frauenklinik der LMU München, Campus Innenstadt wegen eines Ovarialkarzinoms behandelt wurden. Aus Paraffin eingebettetem Tumorgewebe wurde die DNA isoliert und anschließend damit eine Bisulfit-Behandlung durchgeführt. Letztere führt zu einer Umwandlung unmethylierter Cytosine zu Uracil. Diese Sequenzänderung ermöglicht eine Differenzierung zwischen methylierten und unmethylierten DNA-Proben in der nachfolgenden methylierungsspezifischen Real-time-PCR.

Gleichzeitig wurden die HE-Schnitte der OP-Präparate re-evaluiert und in low grade und high grade Gruppen unterteilt. Eine weitere immunhistochemische Untersuchung von Progesteron- und Östrogenrezeptor wurde durchgeführt. In der abschließenden statistischen Auswertung konnten insgesamt 62 von den ursprünglichen 75 Fällen eingeschlossen werden. Die übrigen 13 Fälle wurden aufgrund schlechter DNA-Qualität oder fehlender Akten ausgeschlossen.

Von den 20 low grade Fällen zeigen sich 10 methyliert und 10 unmethyliert. Von den 42 high grade Fällen waren 16 Fälle methyliert und 26 Fälle unmethyliert. Die statistischen Tests zeigten letztendlich ein signifikant besseres Überleben der Patientinnen mit negativem Methylierungsstatus in der low grade Gruppe. In der high

grade Gruppe scheint die ESR1-Promotor-Methylierung keinen Einfluss auf das Überleben zu haben. Ebenso ergab sich keine signifikante Korrelation des Methylierungsstatus im Gesamtkollektiv. Die unterschiedliche Pathogenese von low und high grade Ovarialkarzinomen mit den jeweils für den Subtyp spezifischen Mutationen bestimmter Gene ist eine mögliche Erklärung für dieses signifikante Ergebnis in der low grade Gruppe. Der Einfluss der Methylierung des ESR1-Promotors ist demnach nicht identisch in der low und high grade Gruppe. In low grade Karzinomen scheint dieses epigenetische Phänomen eine größere Rolle bei der Zellentartung zu spielen.

Aus den Vorkenntnissen weiß man bereits, dass die biomolekularen Mechanismen der Pathogenese von low und high grade Ovarialkarzinomen grundverschieden sind. Daher ist es sinnvoller diese histologischen Subtypen stets getrennt voneinander zu betrachten und zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde Methode der Real-time-PCR für die Untersuchung des Methylierungsstatus des ESR1-Promotors in Ovarialkarzinomen etabliert und die Studie hat gezeigt, dass der Methylierungsstatus des Promotors eine Rolle bei den low grade Ovarialkarzinomen spielt- negativer Methylierungsstatus beeinflusst das Überleben positiv. Im Gegensatz dazu zeigen Patientinnen mit low grade Ovarialkarzinom und positivem Methylierungsstatus eine schlechtere Überlebensrate.

Die Pathogenese des Ovarialkarzinoms ist, wie jede andere Tumorerkrankung auch, ein komplexer Prozess und der Methylierungsstatus des ESR1-Promotors stellt nur einen Teilaspekt dar. Aber zur Entschlüsselung der Bedeutung dieser epigenetischen Modifikation hat diese Studie etwas beigetragen.

Kapitel VI:

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Ein seröses Ovarialkarzinom (G1) in HE-Färbung aus dem ausgewählten Patientenkollektiv

Abbildung 1.2: Ein muzinöses, schlecht differenziertes Ovarialkarzinom aus dem Patientenkollektiv (G3)

Abbildung 1.3: Beispiel eines endometrioiden Ovarialkarzinoms (G1) aus dem Patientenkollektiv

Abbildung 1.4: Ein Fall aus dem Patientenkollektiv (seröses Borderline, G1)

Abbildung 1.5: HE-Schnitt einer G1-Probe eines Ovarialkarzinoms

Abbildung 1.6: HE-Schnitt einer G3-Probe eines Ovarialkarzinoms

Abbildung 1.7: Ablauf der Methylierung und deren Auswirkung auf die Transkription

Abbildung 2.1: Das verwendete PCR Gerät von Applied Biosystems

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Bisulfitbehandlung sowie der nachfolgenden PCR

Abbildung 2.3: Schematischer Ablauf der RT-PCR

Abbildung 3.1: Ein Beispiel von zwei identischen, positiven PCR-Kurven (house keeping gene CK19)

Abbildung 3.2: Beispiel einer negativen PCR-Kurve (CK19)

Abbildung 3.3: Eine positive PCR-Kurve einer Probe mit positivem Methylierungsstatus des ESR1-Promotors

Abbildung 3.4: Ein Fallbeispiel mit negativem Methylierungsstatus von ESR1-Promotor

Abbildung 3.5: Zwei parallel verlaufende Positivkurven für CK19 im Sinne von positivem DNA-Nachweis und eine Negativkontrolle (Wasser) mit Verlauf unterhalb des Thresholds

Abbildung 3.6a: ER: Remmele Score 9

Abbildung 3.6b: PR: Remmele Score 3

Abbildung 3.7a: ER: Remmele Score 12

Abbildung 3.7b: PR: Remmele Score 1

Abbildung 3.8a: ER: Remmele Score 4

Abbildung 3.8b: PR: Remmele Score 4

Abbildung 3.9: Überleben des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit des ESR1-promotor- Methylierungsstatus

Abbildung 3.10: Überleben der low grade Gruppe in Abhängigkeit von Methylierungsstatus des ESR1-Promotors

Abbildung 3.11: Überleben der high grade Gruppe in Abhängigkeit von Methylierungsstatus des ESR1-Promotors.

Abbildung 4.1: Detektion freizirkulierender Tumor-DNA als Biomarker

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: FIGO und TNM Klassifikation des Ovarialkarzinoms

Tabelle 1.2: Borderline Subtypen

Tabelle 1.3a: Histopathologisches Gradingsystem, Remmele Score

Tabelle 1.3b: Gradingsystem G1-3

Tabelle 2.1: Einzelne Bestandteile des Reaktionsgemisches der Bisulfitbehandlung

Tabelle 2.2: Einzelne Bestandteile und Volumina des PCR-Ansatzes

Tabelle 2.3: Zusammensetzung und Konzentration der Primers für PCR

Tabelle 2.4: PCR-Ansatz Cytokeratin 19 als „House keeping gene“

Tabelle 2.4: Einzelheiten des Remmele Scores

Tabelle 2.5: Einteilung und Interpretation des Remmele Scores

Tabelle 3.1:Überlebenstabelle methyliert vs. unmethyliert (N(Event):Tod)

Tabelle 3.2: Zusammenfassung Resektionsstatus, Chemotherapeutika sowie Überlebensdaten

Tabelle 3.3: Verteilung der histologischen Subtypen sowie FIGO-Stadien der Kohorte.

Tabelle 3.4: Verteilung der FIGO-Stadien und Methylierungsstatus

Tabelle 3.5: Verteilung der immunhistochmischen Färbung des ESR und PR

6.3 Abkürzungstabelle

Abb.	Abbildung
CA 12-5	Cancer Antigen 12-5
CA 19-9	Cancer Antigen 19-9
CK19	Cytokeratin 19
Ct-Wert	Cycle threshold
CEA	Carcinoembryonales Antigen
DNMT	DNA- Methyltransferase
ESR/ ER	Oestrogenrezeptor
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
HE	Hämatoxylin-Eosin
LMP	Low malignant potential
LDH	Laktatdehydrogenase
MCF-7	Michigan cancer foundation, Mammakarzinomzelllinie mit negativem Methylierungsstatus des ESR
MD-MBA-231	Zelllinie mit Methylierung des ESR
PCO	Polyzystisches Ovar
PR	Progesteronrezeptor
RT-PCR	Realtime-Polymerase chain reaction
RKI	Robert-Koch-Institut
TMN	TMN Klassifikation für Tumorerkrankung
UICC	Union internationale contre le cancer

Kapitel VII

Literaturverzeichnis

1. Jayson, G.C., et al., *Ovarian cancer*. Lancet, 2014. **384**(9951): p. 1376-88.
2. Robert-Koch-Institut. *Eierstockkrebs*. 2013; Available from: http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Ovarialkrebs/ovarialkrebs_node.html
3. Ramus, S.J., et al., *Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to inherited ovarian cancer*. Hum Mutat, 2007. **28**(12): p. 1207-15.
4. Ramus, S.J. and S.A. Gayther, *The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer*. Mol Oncol, 2009. **3**(2): p. 138-50.
5. Vang, R., M. Shih Ie, and R.J. Kurman, *Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems*. Adv Anat Pathol, 2009. **16**(5): p. 267-82.
6. Cannistra, S.A., *Cancer of the ovary*. N Engl J Med, 2004. **351**(24): p. 2519-29.
7. Sieh, W., et al., *Tubal ligation and risk of ovarian cancer subtypes: a pooled analysis of case-control studies*. Int J Epidemiol, 2013. **42**(2): p. 579-89.
8. R. Kreienberg, A.d.B., J. Pfisterer, S. Schindelmann, B. Schmalfeldt, *Management des Ovarialkarzinoms, Interdisziplinäres Vorgehen*, 2009, Springer Medizin Verlag: Heidelberg.
9. Nik, N.N., et al., *Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 27-45.
10. Kurman, R.J., *Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma*. Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 10**: p. x16-21.
11. Silverberg, S.G., *Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal*. Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**(1): p. 7-15.
12. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(3): p. 433-43.
13. Jacobs, I.J., et al., *Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial*. Lancet, 2016. **387**(10022): p. 945-56.
14. Liu, J., Y. Xu, and J. Wang, *Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis of ovarian carcinoma*. Eur J Radiol, 2007. **62**(3): p. 328-34.
15. Jacobs, I., et al., *Prevalence screening for ovarian cancer in postmenopausal women by CA 125 measurement and ultrasonography*. BMJ, 1993. **306**(6884): p. 1030-4.
16. Brun, J.L., et al., *Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2000. **78**(1): p. 21-7.
17. Shaw, D., A. Clamp, and G.C. Jayson, *Angiogenesis as a target for the treatment of ovarian cancer*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(5): p. 558-65.
18. Gadducci, A., et al., *Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer*. Biomed Pharmacother, 2004. **58**(1): p. 24-38.
19. Kobayashi, E., et al., *Biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of ovarian cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(11): p. 1902-12.
20. Santotoribio, J.D., et al., *Cancer antigens 19.9 and 125 as tumor markers in patients with mucinous ovarian tumors*. Eur J Gynaecol Oncol, 2016. **37**(1): p. 26-9.
21. Badgwell, D. and R.C. Bast, Jr., *Early detection of ovarian cancer*. Dis Markers, 2007. **23**(5-6): p. 397-410.
22. McGuire, W.P., et al., *Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer*. N Engl J Med, 1996. **334**(1): p. 1-6.

23. Stauber Manfred, T.W., *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2007, Thieme Verlag: Stuttgart.
24. Wittekind Ch, M.H., Bootz F, *UICC, TNM Klassifikation maligner Tumoren 6. Auflage*. Springer Verlag, 2002.
25. Prat, J., *FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication*. J Gynecol Oncol, 2015. **26**(2): p. 87-9.
26. Karseladze, A.I., [*WHO histological classification of ovarian tumors. Geneva, 1999 (R.E.Scully, L.H.Sobin)*]. Arkh Patol, 2005. **Suppl**: p. 1-64.
27. TUM, T.M.a.d.M.F.d.L.u., *Manuel, Maligne Ovarialtumoren Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Vol. 8. Auflage. 2007: Zuckschwerdt.
28. del Carmen, M.G., M. Birrer, and J.O. Schorge, *Clear cell carcinoma of the ovary: a review of the literature*. Gynecol Oncol, 2012. **126**(3): p. 481-90.
29. Kurman, R.J. and C.L. Trimble, *The behavior of serous tumors of low malignant potential: are they ever malignant?* Int J Gynecol Pathol, 1993. **12**(2): p. 120-7.
30. Seidman, J.D. and R.J. Kurman, *Subclassification of serous borderline tumors of the ovary into benign and malignant types. A clinicopathologic study of 65 advanced stage cases*. Am J Surg Pathol, 1996. **20**(11): p. 1331-45.
31. Kempson, R.L. and M.R. Hendrickson, *Ovarian serous borderline tumors: the citadel defended*. Hum Pathol, 2000. **31**(5): p. 525-6.
32. Edgar Petru, W.J., Daniel Fink, Ossi Köchli, *Praxisbuch onkologische Gynäkologie*, 2011, Springer Verlag: Berlin Heidelberg.
33. Silverberg, S.G., *Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1999. **73**(1): p. 170-1.
34. Teodoridis, J.M., et al., *CpG-island methylation and epigenetic control of resistance to chemotherapy*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 916-7.
35. Teodoridis, J.M., C. Hardie, and R. Brown, *CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications*. Cancer Lett, 2008. **268**(2): p. 177-86.
36. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
37. Dehan, P., et al., *DNA methylation and cancer diagnosis: new methods and applications*. Expert Rev Mol Diagn, 2009. **9**(7): p. 651-7.
38. Guibert, S. and M. Weber, *Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development*. Curr Top Dev Biol, 2013. **104**: p. 47-83.
39. Matsuzaki, H., et al., *De novo DNA methylation through the 5'-segment of the H19 ICR maintains its imprint during early embryogenesis*. Development, 2015. **142**(22): p. 3833-44.
40. Santos, K.F., T.N. Mazzola, and H.F. Carvalho, *The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(10): p. 1531-41.
41. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.
42. Issa, J.P., et al., *Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon*. Nat Genet, 1994. **7**(4): p. 536-40.
43. Issa, J.P., S.B. Baylin, and J.G. Herman, *DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 1**: p. S7-11.
44. Lapidus, R.G., et al., *Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction*. Cancer Res, 1998. **58**(12): p. 2515-9.
45. Wiley, A., et al., *Aberrant promoter methylation of multiple genes in malignant ovarian tumors and in ovarian tumors with low malignant potential*. Cancer, 2006. **107**(2): p. 299-308.
46. Barton, C.A., et al., *DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment*. Gynecol Oncol, 2008. **109**(1): p. 129-39.
47. Pearce, S.T. and V.C. Jordan, *The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **50**(1): p. 3-22.

48. Gibson, D.A. and P.T. Saunders, *Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - a role for estrogen receptors and estrogen related receptors*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **348**(2): p. 361-72.
49. Biosystems, A.; Available from: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab>.
50. Brown, R. and G. Strathdee, *Epigenomics and epigenetic therapy of cancer*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4 Suppl): p. S43-8.
51. Hawrami, K. and J. Breuer, *Analysis of United Kingdom wild-type strains of varicella-zoster virus: differentiation from the Oka vaccine strain*. J Med Virol, 1997. **53**(1): p. 60-2.
52. Rwigemera, A., J. Mamelona, and L.J. Martin, *Inhibitory effects of fucoxanthinol on the viability of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 are correlated with modulation of the NF-kappaB pathway*. Cell Biol Toxicol, 2014. **30**(3): p. 157-67.
53. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
54. Huang, Y.W., et al., *Identification of candidate epigenetic biomarkers for ovarian cancer detection*. Oncol Rep, 2009. **22**(4): p. 853-61.
55. Issa, J.P., S.B. Baylin, and S.A. Belinsky, *Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure*. Cancer Res, 1996. **56**(16): p. 3655-8.
56. O'Doherty, A.M., et al., *Methylation status of oestrogen receptor-alpha gene promoter sequences in human ovarian epithelial cell lines*. Br J Cancer, 2002. **86**(2): p. 282-4.
57. Montavon, C., et al., *Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2012. **124**(3): p. 582-8.
58. Lenhard, M., et al., *Steroid hormone receptor expression in ovarian cancer: progesterone receptor B as prognostic marker for patient survival*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 553.
59. Esteller, M., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3225-9.
60. Esteller, M. and J.G. Herman, *Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*. J Pathol, 2002. **196**(1): p. 1-7.
61. Cannistra, S.A., *Cancer of the ovary*. N Engl J Med, 1993. **329**(21): p. 1550-9.
62. Prat, J., *Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features*. Virchows Arch, 2012. **460**(3): p. 237-49.
63. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1511-8.
64. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications*. Int J Gynecol Pathol, 2008. **27**(2): p. 151-60.
65. Gross, A.L., et al., *Precursor lesions of high-grade serous ovarian carcinoma: morphological and molecular characteristics*. J Oncol, 2010. **2010**: p. 126295.
66. Cho, K.R. and M. Shih Ie, *Ovarian cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 287-313.
67. Lynch, H.T., et al., *Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management*. Mol Oncol, 2009. **3**(2): p. 97-137.
68. Shaw, P.A., et al., *Histopathologic features of genetically determined ovarian cancer*. Int J Gynecol Pathol, 2002. **21**(4): p. 407-11.
69. Makarla, P.B., et al., *Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(15): p. 5365-9.
70. Ford, D., et al., *Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium*. Lancet, 1994. **343**(8899): p. 692-5.
71. Easton, D.F., D. Ford, and D.T. Bishop, *Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(1): p. 265-71.

72. Gadducci, A., et al., *The concomitant determination of different tumor markers in patients with epithelial ovarian cancer and benign ovarian masses: relevance for differential diagnosis*. *Gynecol Oncol*, 1992. **44**(2): p. 147-54.
73. Laird, P.W., *The power and the promise of DNA methylation markers*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(4): p. 253-66.
74. Asadollahi, R., C.A. Hyde, and X.Y. Zhong, *Epigenetics of ovarian cancer: from the lab to the clinic*. *Gynecol Oncol*, 2010. **118**(1): p. 81-7.
75. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. *Cell*, 1980. **20**(1): p. 85-93.
76. Cheng, J.C., et al., *Preferential response of cancer cells to zebularine*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(2): p. 151-8.
77. Laird, P.W., *Cancer epigenetics*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14 Spec No 1**: p. R65-76.
78. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. *Cell*, 1999. **99**(3): p. 247-57.
79. Gloss, B.S. and G. Samimi, *Epigenetic biomarkers in epithelial ovarian cancer*. *Cancer Lett*, 2014. **342**(2): p. 257-63.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Verena Kirn bedanken für die langjährige Unterstützung des Projekts von Anfang der Laborarbeit bis zur Vollendung der Dissertation. Trotz ihres beruflichen Wechsels an die Uniklinik Köln hat sie mich nicht in Stich gelassen und mich immer wieder ermutigt weiterzumachen. Dafür bedanke ich mich sehr. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Jeschke und dem ganzen Laborteam in der Frauenklinik Maistrasse sowie Frau Prof. Mayr und ihrem Team im pathologischen Institut der LMU. Erst mit ihrem Fachwissen und Teaching konnte ich die komplizierte Laborarbeit erfolgreich und korrekt durchführen. Insbesondere hat Frau Prof. Mayr mir das Mikroskopieren und Interpretieren der histologischen Präparate beigebracht, was einen wichtigen Kern dieser Arbeit darstellt. Großes Dankeschön auch an die Kollegin Frau Dr. Dr. Sabine Heublein für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Aus meinem privaten Umfeld bedanke ich mich herzlichst bei meinem Ehemann Alexander, der immer an mich geglaubt hat und in schwierigen Phasen des Projekts mir Mut zugesprochen hat.

Von Annahme des Themas bis Abgabe der Dissertation haben mich viele Menschen auf unterschiedlichste Art und Weise begleitet und unterstützt. Es ist kaum möglich alle namentlich zu nennen. Für jede kleinste Unterstützung in diesem Langzeitprojekt bin ich zu tiefst dankbar.

Eidesstattliche Versicherung

Shi, Rong

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die prognostische Bedeutung der ESR1-Promotor-Methylierung bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Koetz. 25.11.2018

Ort, Datum

Shi, Rong

Unterschrift Doktorandin/Doktorand