

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinikdirektor: Professor Dr. med. Sven Mahner

**Real-Time PCR Markergene beim endometrioiden
Adenokarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von

Lisa-Marie Victor

aus

Linz (Österreich)

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller:

Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstellerin:

Prof. Dr. med. Doris Mayr

Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. Dr. med. Ulrich Angergassen

Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl

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

Tag der mündlichen Prüfung:

07.11.2019

Für meine Eltern und meine Familie. Danke für eure Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	6
1. Das Endometriumkarzinom.....	7
1.1 Epidemiologie.....	7
1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	8
1.3 Pathohistologie und Klassifikation.....	11
1.4 Klinik und Diagnostik.....	14
1.5 Therapie und Prognose.....	15
1.5.1 Chemotherapie und Hormontherapie.....	17
1.6 Markergene.....	19
1.6.1 Cytokeratin 19 (CK 19).....	19
1.6.2 Claudin 4 (CLDN-4).....	19
1.6.3 Cyclin E (CCNE), MAL 2 und Mammaglobin (MGL).....	21
1.7 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs).....	22
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2. Methoden und Material.....	25
2.1 Zellkultur.....	25
2.1.1 Zelllinien.....	25
2.1.2 Kulturmedium.....	27
2.1.3 Subkultivierung von Zelllinien.....	27
2.2 RNA Isolierung.....	28
2.2.1 Bestimmung der RNA Konzentration und Ratio im Photometer.....	30
2.3 Reverse Transkription.....	30
2.4 Gewebeverarbeitung und RNA Isolierung der Negativkontrolle.....	33
2.5 Real-Time PCR.....	35
2.6 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial.....	40
2.6.1 Chemikalien.....	40
2.6.2 Geräte.....	41
2.6.3 Verbrauchsmaterial.....	42
3. Ergebnisse.....	43
3.1 RNA Isolierung.....	43
3.2 Gewebeverarbeitung und RNA Isolierung der Negativkontrolle.....	44
3.3 Real-Time PCR.....	45

3.4 Expression der untersuchten Markergene	45
3.4.1 CK 19 und Claudin 4	47
3.4.2 CCNE, MAL2 und MGL.....	48
3.5 Expressionsmuster der unterschiedlichen Zelllinien.....	48
4. Diskussion	51
4.1 Real-Time PCR Ergebnisse	52
4.2 Markergene	53
4.2.1 Cytokeratin 19.....	53
4.2.2 Claudin 4 (CLDN-4)	53
4.2.3 Cycline E und MAL2	53
4.2.4 Mammaglobin (MGL)	54
4.3 Real-Time PCR als Methode	54
4.4 Implikation für weiterführende Forschung	55
4.5 Fazit	56
5. Zusammenfassung	58
6. Abkürzungsverzeichnis	60
7. Quellenverzeichnis	62
8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	74
8.1 Tabellen	74
8.2 Abbildungen.....	75
9. Eidesstattliche Versicherung.....	77
Danksagung	78

Einleitung

Im Jahr 2016 erkrankten, entsprechend dem alle zwei Jahre erscheinenden Bericht „Krebs in Deutschland“ des Robert Koch-Institutes, annähernd 482.500 Menschen der Bevölkerung in Deutschland an einem bösartigen Tumor (nicht-melanotischer Hautkrebs exkludiert). Hiervon ergibt sich wiederum eine Inzidenz von 98.810 registrierten Fällen für gynäkologische Tumorerkrankungen, wobei das Endometriumkarzinom mit 10.870 Neuerkrankungen die zweithäufigste gynäkologische Tumorentität darstellt, auf das Gebiet der weiblichen Geschlechtsorgane bezogen, sogar das Häufigste [1].

Trotz der besseren Prognose des Endometriumkarzinoms im Vergleich zu anderen gynäkologischen Tumorentitäten starben dennoch 2.579 Frauen deutschlandweit im Jahr 2013 an dieser malignen Tumorerkrankung [1, 2]. Deshalb ist es von großer Wichtigkeit, durch eine geeignete Therapie und vor allem durch das rechtzeitige Erkennen eines möglichen Fortschreitens der Erkrankung und der Tumorausbreitung entgegenzuwirken.

Ein möglicher Ansatzpunkt wäre der Nachweis von minimalen Tumorresiduen, sogenannten zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) im peripheren Blut. Dieser Aspekt stand in den letzten Jahren bereits stark im Fokus der onkologischen Forschung. Aufgrund der geringeren Invasivität und der eventuell frühzeitigen Detektion von minimalen Tumorresiduen im menschlichen Organismus könnte diese Methode auch eine interessante diagnostische Möglichkeit zur Reduktion von Rezidiven oder Bildung von Fernmetastasen darstellen. Somit würde die Prognose durch eine Anpassung oder weiterführende Therapie möglicherweise verbessert werden können.

In dieser Arbeit möchte ich eine Vorgehensweise zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen mithilfe der Real-Time PCR beleuchten und die, durch mehrere Versuche gewonnenen, Ergebnisse präsentieren.

1. Das Endometriumkarzinom

1.1 Epidemiologie

Das Endometriumkarzinom ist nach wie vor die häufigste maligne Erkrankung des weiblichen Genitaltrakts und weist weltweit eine Rate von 287.000 Neuerkrankungen pro Jahr auf [3]. In Deutschland wurde im Jahr 2011 eine Fallzahl von 11.010 Neuerkrankungen erfasst. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche altersstandardisierte Inzidenz für alle Bundesländer von 16,6/100 000 Einwohner [4]. Damit ist das Endometriumkarzinom mit 13% aller Malignome der vierthäufigste Tumor der Frau [3]. Innerhalb der letzten Jahre hat sich jedoch die Summe an Neuerkrankungen etwas vermindert, was auf den parallel stattgefundenen Anstieg von Hysterektomien, sowie der vermehrten Einnahme Gestagen-haltiger oraler Kontrazeptiva, zurück zu führen sein könnte [5]. Dies spiegelt sich auch in der veröffentlichten Inzidenz vom RKI für das Jahr 2013 wider. Hier ergab sich eine Zahl von 10.087 registrierte Fälle, welche sich durch einen leichten Rückgang der Neuerkrankungen abzeichnet [2]. Weltweit gibt es jedoch erhebliche Unterschiede in der Inzidenz. Hohe Raten an Neuerkrankungen wurden in Europa, UK, US, Kanada, Neuseeland und Australien dokumentiert, eine niedrigere Anzahl in Afrika, Mittel- und Südamerika und Asien [6]. Somit ist erkennbar, dass in Entwicklungsländern die meisten Risikofaktoren, wie zum Beispiel das metabolische Syndrom, eine Langzeit-Östrogenexposition oder Nulliparität, weniger häufig auftreten und folglich das Endometriumkarzinom eine seltenere Erkrankung ist [7].

Zwei Drittel der erkrankten Patienten befinden sich in der Postmenopause, hingegen sind nur 5% der erkrankten jünger als 40 Jahre. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt somit 65-70 Jahre [8]. 75% der Patientinnen werden laut den Daten des Tumorregisters bereits im FIGO I Stadium diagnostiziert. Daraus ergibt sich eine Fünfjahresüberlebensrate von etwa 73% und somit ist das Endometriumkarzinom im Vergleich zu anderen malignen Erkrankungen eine prognostisch günstigere Tumorform [5, 9].

Dennoch sterben jährlich ca. 42.000 Frauen weltweit an der Erkrankung, dies entspricht circa 1,9% aller durch Krebs verursachten Todesfälle [10]. In Deutschland wurde von der GeKiD im Jahr 2012 eine Fallzahl von 2.515 Todesfällen registriert [4].

1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Mittlerweile sind bereits einige verschiedene Faktoren bekannt, welche die Entstehung eines Endometriumkarzinoms begünstigen. Viele Risikofaktoren sind einem Ungleichgewicht zwischen einer Exposition von Östrogen und Progesteron zuzuschreiben. Nulliparität, opponierte reine Östrogentherapie, frühe Menarche und späte Menopause können mit einem erhöhten Risiko sowohl für das Typ I-, als auch für das Typ II-Endometriumkarzinom einhergehen. Kombinierte orale Kontrazeption, Multiparität, sowie Rauchen können als protektive Faktoren genannt werden [11-13].

Zusätzlich konnte ein erhöhtes Risiko bei zuvor bereits bestehenden anderen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden, wie beispielsweise beim sogenannten Lynch-Syndrom [14]. Einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, die vor allem mit kolorektalen, aber eben auch mit anderen Tumorentitäten einhergeht. Betroffene Frauen haben ein Risiko von 40-60% im Laufe ihres Lebens ein Endometriumkarzinom zu entwickeln [15-17].

Eine postmenopausale Hormonersatztherapie, in Form von Östrogensubstitution, erhöht hauptsächlich nur das Risiko ein Typ I Endometriumkarzinom zu entwickeln [12]. Ebenso weisen bisherige Forschungsergebnisse darauf hin, dass Frauen mit Diabetes mellitus Typ II im Gegensatz zu Frauen, die nicht an Diabetes mellitus erkrankt sind, ein circa zweifach erhöhtes Risiko haben an einem Endometriumkarzinom zu erkranken [18]. Weiterhin zeigt sich ein vermehrtes Risiko bei stark übergewichtigen Frauen. Neben einem höheren Level an endogenem Östrogen, welches das Endometrium durch eine erhöhte mitotische Aktivität der Zellen stimuliert, besteht zusätzlich ein Mangel an Progesteron [19, 20].

Auch das Polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) wird mit einem erhöhten Risiko zur Entstehung eines Endometriumkarzinoms in Verbindung gebracht. Ursächlich ist das wohl oft mit dem PCO Syndrom einhergehende metabolische Syndrom mit einem erhöhten Body Mass Index (BMI), Insulinresistenz und Hypercholesterinämie [21-25]. Auch die Hormone Estradiol und Estron, wichtige natürliche Östrogene, konnten bereits als karzinogen für den Menschen nachgewiesen werden [26-28].

Durch die prolongierte Exposition gegenüber Östrogenen kann eine Präkanzerose eines Typ I-Adenokarzinoms, die sogenannte Hyperplasie des Endometriums, entstehen. Es werden nach der neuen WHO-Einteilung zwei Untergruppen unterschieden [29]:

- Endometriumhyperplasie ohne Atypien
- Atypische Endometriumhyperplasie/EIN

Eine Progression zu einem endometrioden Endometriumkarzinom (Typ I) wurde bei den Endometrienhyperplasien ohne Atypien bei 1-4% beobachtet und ist somit gering. Bei atypischen Hyperplasien konnte jedoch ein deutliches höheres Risiko der Entwicklung eines endometrioden Adenokarzinoms mit circa 45% festgestellt werden [30-32].

Auf dem Boden der endometrialen intraepithelialen Neoplasie (EIN), einer Vorläuferläsion, entstehen hingegen die Mehrzahl der serösen Karzinome (Typ II) mit circa 89% [33].

Die gängige Therapie der Patientinnen mit atypischer Hyperplasie ist die operative Therapie per Hysterektomie aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Progression und der Sorge, dass ein bereits bestehendes Karzinom unentdeckt bleiben könnte [34, 35]. Eine orale Therapie mit Progesteron, wie zum Beispiel Medroxyprogesteron, gilt als konservative Therapie. Sie wird vor allem bei Hyperplasien ohne Atypien und bei Patientinnen, bei denen keine Operation indiziert oder aufgrund verschiedener Vorerkrankungen nicht möglich ist, angewandt [35-37].

Auf molekularer Ebene liegen bereits einige Erkenntnisse zum Entstehungsmechanismus vor. Endometrioides Karzinome (Typ I) sind assoziiert mit Mutationen im K-ras, PTEN und β -Catenin Gen [38, 39]. PTEN ist ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom 10 und führt zur Umgehung der Apoptose bei mutierten Zellen des Endometriums [40, 41]. K-ras wiederum ist ein Schlüsselonkogen in der EGFR Signalkaskade und beeinflusst bereits früh die Tumorentstehung [42]. β -Catenin ist ein Bestandteil des E-Cadherin/ β -Catenin-Komplexes und ist unter anderem essentiell für die Zelldifferenzierung und spielt auch eine wichtige Rolle im Rahmen der Signaltransduktion [39].

Ebenso konnte häufig eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) nachgewiesen werden [43]. Eine Mikrosatelliteninstabilität ist das Ergebnis einer defekten DNA-mismatch Reparatur von Basenfehlpaarungen, die bei der Replikation entstanden sind [41]. Dies wurde in allen Endometriumkarzinomtypen mit einer Häufigkeit von ungefähr 40% festgestellt, wobei dies mit circa 30% besonders oft bei Endometrioiden Adenokarzinomen (Typ I) vorkommt [44, 45].

Bei serösen Karzinomen (Typ II) sind gehäuft p53-Mutationen zu finden [38]. Das Tumorsuppressorgen p53 ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert und codiert für ein 53-kD Phosphoprotein, welches die DNA Integrität und den Zellzyklus reguliert [46]. Auch wird bei einem Fehler in der DNA Reparatur durch p53 die Apoptose eingeleitet [47]. Durch eine erhöhte Expression von mdm2, dem Gegenspieler von p53, kommt es zur Inhibierung des Tumorsuppressorgens und somit nicht zur Apoptose der mutierten Zellen [47, 48].

1.3 Pathohistologie und Klassifikation

Das Endometriumkarzinom wird von der World Health Organisation (WHO) in verschiedene histologische Subtypen eingeteilt [29, 49]:

- Endometrioides Adenokarzinom
- Endometrioides Adenokarzinom-Varianten
 - Variante mit plattenepithelialer Differenzierung
 - Villoglanduläre Variante
 - Sekretorischer Variante
 - Flimmerzellvariante
- Muzinöses Adenokarzinom
- Seröses Adenokarzinom
- Klarzelliges Adenokarzinom
- Gemischtes Karzinom
- Undifferenziertes Karzinom
 - Monomorpher Typ
 - Dedifferenzierter Typ
- Neuroendokrine Tumoren
 - Gut differenzierter neuroendokriner Tumor (Karzinoid)
 - Schlecht differenziertes kleinzelliges neuroendokrines Karzinom
 - Schlecht differenziertes großzelliges neuroendokrines Karzinom
- Andere Karzinome

Zu den Typ I Karzinomen zählen unter anderem das bereits genannte endometrioides Adenokarzinom mit seinen verschiedenen Varianten sowie das muzinöse Adenokarzinom [29]. Mit ungefähr 70-80% tritt das Endometrioides Adenokarzinom (Typ I) als häufigste Manifestation aller Endometriumkarzinome

auf. Weitere circa 10-25% fallen unter die Variante mit plattenepithelialer Differenzierung. [49, 50].

Die restlichen circa 5% der Manifestationen gehören in die Gruppe der Typ II Karzinome. Sowohl das seröse Karzinom als auch das klarzellige Karzinom werden in die Gruppe der Typ II Karzinome miteingefasst [29, 50].

Endometrioid Karzinome (Typ I) sind typischerweise östrogenabhängig, low-grade und die Prognose ist meistens gut. Typ II Karzinome haben wiederum eine eher schlechte Prognose, sprechen nicht gut auf Hormone an und sind meist high-grade [51].

Das histopathologische Grading für die Typ I Karzinome wird anhand des Differenzierungsgrades festgelegt und wird als G1, G2 oder G3 bezeichnet [52].

- G1 – gut differenziert
<5% solide Anteile, die nicht squamös oder morular erscheinen
- G2 – mäßig differenziert
6%-50% solide Anteile, die nicht squamös oder morular erscheinen
- G3 – schlecht differenziert / undifferenziert
>50% solide Anteile, die nicht squamös oder morular erscheinen

Zur Stadieneinteilung wird am häufigsten das International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) System verwendet, welches die Tumoreindringtiefe sowie den Differenzierungsgrad berücksichtigt [53]. Das FIGO Committee on Gynecologic Oncology empfahl bereits 1988 ein operatives Staging. Es wird nach der neuen Klassifikation wie folgt einteilt [50]:

Stadium	FIGO Klassifikation
I	Tumor begrenzt auf den Corpus uteri
IA	Tumor begrenzt auf das Endometrium oder infiltriert weniger als die Hälfte des Myometrium
IB	Tumor infiltriert die Hälfte oder mehr als des Myometriums
II	Tumor infiltriert das Stroma der Zervix, keine Ausbreitung jenseits des Uterus
III	Lokale und/oder regionäre Ausbreitung wie nachfolgend beschrieben:
IIIA	Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe (direkte Ausbreitung oder Metastasen)
IIIB	Vaginal- oder Parametriumbefall (direkte Ausbreitung oder Metastasen)
IIIC	Metastasen in Becken- und/oder paraaortalen Lymphknoten
IIIC1	Metastasen in Beckenlymphknoten
IIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten
IVA	Tumor infiltriert Blasen- und/oder Rektumschleimhaut
IVB	Fernmetastasen, einschließlich intraabdomineller Metastasen und Metastasen in inguinalen und/oder Beckenlymphknoten

Tab. 01: FIGO Klassifikation des Endometriumkarzinoms [50]

1.4 Klinik und Diagnostik

Die postmenopausale Blutung (PMB) tritt oft als ein Erstsymptom eines Endometriumkarzinoms auf und ist definiert als eine Blutung, die erst frühestens ein Jahr nach Eintreten der Menopause auftritt. In 10-15% der Fälle kann ein Endometriumkarzinom oder eine Hyperplasie der Grund für eine postmenopausale Blutung sein [54-57]. In 72% der Fälle wird ein Endometriumkarzinom durch eine solche abnormale Blutung frühzeitig und in einem niedrigen Stadium erkannt [58].

Beim Auftreten einer postmenopausalen Blutung sollte eine direkte diagnostische Abklärung erfolgen, um einen malignen Prozess ausschließen zu können. Die erste diagnostische Untersuchung der Wahl ist neben der gynäkologischen klinischen Untersuchung die transvaginale Sonographie. Bei der klinischen Untersuchung wird neben dem Alter, Dauer der Menopause, Anzahl der Schwangerschaften und Geburten, dem BMI (kg/m^2), Vorerkrankungen, aktueller Medikation, vor allem auch die Blutungshäufigkeit und -stärke beurteilt und dokumentiert. Bei der anschließenden transvaginalen Sonographie wird das Endometrium, der Uterus, die Adnexe und auch die Umgebung, inklusive Douglas Raum, beurteilt. Ziel ist es eine mögliche Ursache für die Blutung zu finden.

Vor allem die Dicke des Endometriums ist für die weiteren diagnostischen Schritte ein wichtiges Kriterium. Bei einer Dicke von $<4\text{mm}$ liegt die Wahrscheinlichkeit eines Endometriumkarzinoms bei 0,6% und ist somit nicht sehr hoch [59-61]. Hingegen konnte bei einer Endometriumsdicke von über 5mm bei 18,7% der Patientinnen ein Karzinom festgestellt werden. Wurden noch die hierbei festgestellten atypischen Hyperplasien und endometrialen Metastasen miteinberechnet lag die Zahl bei 20,2% [61]. Bei einem auffälligen Sonographieergebnis sollte der nächste Schritt eine Hysteroskopie mit Entnahme von Gewebe, einer sogenannten fraktionierten Abrasio mit sich anschließender Histologie, sein. Bei der fraktionierten Abrasio erfolgt eine Gewebeentnahme aus der Cervix und dem Corpus uteri per scharfer Kürette. Je nach sonstigen vorliegenden Befunden, dem Alter der Patientin und dem eventuell noch nicht

abgeschlossenen Familienwunsch erfolgt möglicherweise direkt eine Hysterektomie oder eine andere Form der Kontrolle oder Therapie [62, 63].

Bis jetzt konnte sich leider noch keine Screeningmethode als erfolgreich durchsetzen. Dennoch sollten Frauen, vor allem Patientinnen mit Übergewicht oder anderen potentiellen Risikofaktoren, über das Risiko der Entstehung eines Endometriumkarzinoms aufgeklärt werden. Ebenso sollten sie darauf hingewiesen werden, einen Arzt aufzusuchen, wenn etwa Symptome wie eine vaginale Blutung während oder nach dem Eintreten der Menopause auftritt [64].

1.5 Therapie und Prognose

In den letzten Jahren konnten durch verschiedene Studien und Untersuchungen einige wichtige Faktoren identifiziert werden, die einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose der an Endometriumkarzinom erkrankten Patientinnen zeigten [65]. Als wichtige Prognosefaktoren zeigten sich das Alter der Patientinnen bei Feststellung der Erkrankung, das Tumorstadium mit der Eindringtiefe ins Myometrium, sowie der histologische Zelltyp [65-68]. Eine positive peritoneale Spülzytologie konnte ebenfalls als prognostischer Faktor nachgewiesen werden [69]. Als weiterer relevanter Prognosefaktor gilt die Tumordifferenzierung, das Grading (G1, G2 und G3). Ein niedriges Grading zeigte ein deutlich besseres Outcome, als ein schlecht differenzierter Tumor und somit höheres Grading (G3) [70, 71].

Auf molekularer Ebene konnten bereits mehrere Faktoren, welche einen Einfluss auf die Prognose haben, ermittelt werden. Zum Beispiel konnte Her-2/neu als solch einer identifiziert werden [72]. Ebenso beeinflussen PTEN, p53, die PI3K/AKT/mTOR Kaskade, Angiogenese Marker und eine Mikrosatelliteninstabilität die Prognose des Endometriumkarzinoms [65]. Die operative Therapie mit Entfernung des Uterus und beider Ovarien gilt als die Standardtherapie für das Endometriumkarzinom im frühen Stadium und hat sich als sehr effektiv herausgestellt [64].

Es gibt heutzutage verschiedene mögliche operative Verfahren zur Durchführung der Hysterektomie und Adnexektomie. Die minimal invasiven Methoden stellen

die Laparoskopie oder Roboter-assistierte Operation dar. Zudem kann die Operation auch vaginal oder per Laparotomie durchgeführt werden. Die Laparoskopie hat sich jedoch als die für den Patienten schonendere Methode herausgestellt, mit weniger postoperativen Komplikationen, geringerem Blutverlust, kürzerem Krankenhausaufenthalt und einer allgemein besseren Lebensqualität im Vergleich zum größeren Eingriff, einer Laparotomie [64, 73-75].

Durch eine stadienabhängige operative Therapie wird vorgegeben welche Organe und welches Gewebe entfernt werden müssen. Während im Stadium pT1a, pT1b mit G1 und G2 eine pelvine und paraaortale Lymphonodektomie fakultativ ist, ist es bei den restlichen Stadien und G3 obligat. Eine kombinierte pelvine und paraaortale durchgeführte Lymphonodektomie wies ein höheres Gesamtüberleben der Patientinnen auf, als eine reine pelvine Lymphonodektomie [76]. Ab einem Stadium pT3a sollte zusätzlich noch eine Omentektomie, Debulking, sowie die Entnahme multipler Peritonealbiopsien durchgeführt werden [77].

Bei inoperablen Patientinnen mit Stadium I-III gibt es die Möglichkeit der primären Bestrahlungstherapie, welche eine Kombination aus lokaler vaginaler Brachytherapie und einer externen Hochvoltbestrahlung darstellt [78]. In den Stadien pT1a (G1) und pT1a (G2) hat sich aufgrund von geringeren vaginalen Implantationsmetastasen eine adjuvante Brachytherapie als klinisch nicht von hohem Nutzen dargestellt und wird somit nicht empfohlen. Hingegen wird im Stadium pT1a (G3), pT1b (G1) und pT1b (G2) eine adjuvante vaginale Brachytherapie als ein wirksames Verfahren gegen lokale Rezidive empfohlen und ist durch die geringere Toxizität mit weniger akuten Komplikationen, sowie Langzeitfolgen assoziiert. Einen Einfluss auf das Gesamtüberleben konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Überdies wird in den Stadien pT1c, pT2 und pT3 und pT4a laut Leitlinien zu einer Kombination aus Brachy – und Teletherapie geraten [77-80]. Bei einem sogenannten „high-risk“ Endometriumkarzinom (siehe Tabelle 02) wird jedoch eine kombinierte adjuvante Chemo – und Strahlentherapie als am wirksamsten eingeschätzt [81].

Eine Richtlinie zur Einteilung in „high-risk“ und „low-risk“ Endometriumkarzinom:

Patientendaten	"high-risk" Karzinom	"low-risk" Karzinom
Alter	≥ 60	< 60
Grading	≥ 2	< 2
Stadium	III – IV	I – II
Histologischer Typ	Serös und Klarzelliges Karzinom	Endometrioides Karzinom
Lymphovaskuläre Invasion	Ja	Nein
Tumorgröße	≥ 1/2 des Cavum uteri	< 1/2 des Cavum uteri
Myometriale Invasion	≥ 1/2	< 1/2
Parametrium Befall	Ja	Nein
Zervixstroma oder Vaginaler Befall	Ja	Nein
Positive Becken - oder paraaortalen Lymphknoten	Ja	Nein

Tab. 02: Einteilung in "high-risk" und "low-risk" Endometriumkarzinom [81]

1.5.1 Chemotherapie und Hormontherapie

In den Stadien III – IV gibt es die Möglichkeit einer adjuvanten Chemotherapie, die sich in mehreren Studien effektiver als eine alleinige Radiotherapie darstellte. Jedoch kann eine Chemotherapie im Gegensatz zu einer Radiotherapie zu mehr Nebenwirkungen, wie zum Beispiel niedrige Blutkörperchen, Neuropathie und Alopezie führen. Patientinnen die postoperativ eine Chemotherapie erhielten lebten um circa 25% länger im Vergleich zu den Patientinnen mit einer Radiotherapie [82]. Cisplatin, Carboplatin, Anthrazykline und Taxane sind die mit

am wirksamsten Mitteln beim Endometriumkarzinom, wobei eine kombinierte Therapie zu einem besseren Ansprechen führt [83]. Vor allem bei einer Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin konnte eine signifikante verbesserte Progressionsfreiheit und Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur Radiotherapie nachgewiesen werden [84].

Auch eine zusätzliche Kombination mit Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper der spezifisch an VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) bindet und somit die Angiogenese des Tumors hemmt, konnte in Studien als wirksam nachgewiesen werden [85]. Bei einem erneut aufgetretenen oder persistierenden Endometriumkarzinom konnte durch Bevacizumab eine Progressionsfreiheit von mindestens 6 Monaten erreicht werden [86].

Therapien, welche auf bestimmte molekulare Kaskaden zielen, zeigten sich ebenfalls als vielversprechend. So konnten einige Medikamente positive Effekte auf das Gesamtüberleben erreichen. Zum Beispiel Ixapebilon, ein Zytostatikum welches stabilisierend auf Mikrotubuli wirkt. Oder auch mTOR Inhibitoren wie Temsirolimus oder Everolimus sowie Erlotinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor mit Hemmung des EGFR (Epidermal Growth Factor – Rezeptor). Auch Trastuzumab, ein Medikament welches an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu bindet und bisher nur beim Mammakarzinom zum Einsatz kommt, könnte einen neuen Therapieansatz darstellen [87-90].

Frauen unter 40 Jahren machen circa 3-14% der an einem Endometriumkarzinom Erkrankten aus. Der teilweise noch bestehende Kinderwunsch dieser Patientinnen schließt eine Hysterektomie oft als Primärtherapie aus. Deshalb erhalten diese Patientinnen eine konservative Therapie mit einem oralen Progestagen zum Beispiel Medroxyprogesteronacetat (MPA) [91-93]. Aber auch bei Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien III – IV und rezidivierendem Karzinom kann MPA als wirksame orale Hormontherapie genutzt werden [94].

1.6 Markergene

Nach ausführlicher Literaturrecherche wurden fünf verschiedene Markergene für die weiteren Untersuchungen mithilfe der Real-Time PCR-Methode ausgewählt.

- Cyclin E (CCNE)
- Claudin-4 (CLDN-4)
- Cytokeratin 19 (CK 19)
- Myelin and lymphocyte protein 2 (MAL2)
- Mammaglobin (MGL)

1.6.1 Cytokeratin 19 (CK 19)

Cytokeratin 19 gehört zur Familie der Keratine, fibrilläre Proteine die als Strukturproteine dienen und dem Organismus mechanische Stabilität verleihen. Sie bilden eine wesentliche Komponente von Haaren, Nägeln und Kollagen [95]. CK 19 ist bereits als Marker für epitheliale Zellen verbreitet und wird vor allem zur Diagnostik bei Tumorerkrankungen verwendet. Besonders beim Mammakarzinom ist CK 19 ein vielfach eingesetztes Markergen [96, 97]. Auch zur Detektion von disseminierten Tumorzellen konnte bereits ein Nutzen von CK 19 als Markergen festgestellt werden [98]. Ebenso konnte Cytokeratin 19 als mRNA Marker zur Detektion von Lymphknotenmetastasen beim Endometriumkarzinom herangezogen werden [99].

1.6.2 Claudin 4 (CLDN-4)

Claudin 4 ist ein Membranprotein, als Teil der Claudinfamilie, welches eine wichtige Rolle bei den tight-junctions Formationen einnimmt [100]. Tight-junctions sind ein Komplex aus Proteinen, welche sich an der apikalen Seite der Zelle befinden und eine wichtige Rolle für den parazellulären Transport und die Zellpolarität spielen [101]. Der tight-junction protein Komplex besteht aus drei Typen integraler Membranproteine: den Claudinen (CLDN), Occludin und den junctionalen Adhäsionsmolekülen [102]. Wobei vor allem die Claudine essenziell für die Zusammensetzung und die Funktion des tight-junction Komplexes sind [101, 102]. Bei Unterschieden in der Expression von CLDN oder Veränderungen

in der Lokalisation des Proteins konnten bereits Zusammenhänge mit der Progression von Tumoren nachgewiesen werden [103]. CLDN-4 ist bereits als Biomarker für die Diagnostik im Rahmen des Endometriumkarzinoms untersucht und anerkannt [104, 105]. Vor allem beim endometrioiden Adenokarzinomen die eine hohe Expression an Claudin-3 und Claudin-4 aufwies konnte im Elektronenmikroskop eine Morphologiestörung der tight-junctions nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation bezüglich der Tumorprogression ins Endometrium sowie eine erhöhte myometriale Ausbreitung des Karzinoms [103].

1.6.3 Cyclin E (CCNE), MAL 2 und Mammaglobin (MGL)

Cyclin E gehört zu der Gruppe der Cycline (A, B, C, D und E), welche eine wichtige Rolle im Rahmen des Zellzyklus einnehmen, wobei CCNE am Übergang von der späten G1-Phase in die S-Phase beteiligt ist [106]. Cyclin ist ein Aktivator der cyclin-abhängigen Kinase (CDKs), welche bedeutend bei der Zellproliferation sind [107, 108]. Eine Dysregulation von Cyclin E konnte bereits mit verschiedenen Tumorentitäten in Verbindung gebracht werden. Unter anderem dem Mammakarzinom [109], dem Ovarialkarzinom [110] und dem Lungenkarzinom [111]. Weiters ist CCNE, als Komplex mit cdk2, mit der Karzinogenese und dem Krankheitsverlauf beim endometrioiden Adenokarzinom assoziiert [112, 113].

Das Gen MAL 2 (Myelin and lymphocyte protein 2) besteht aus 176 Aminosäuren und codiert für ein Transmembranprotein [114]. Es zeigte sich bei Untersuchungen einer Studie über zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit gynäkologischen Tumorerkrankungen, als diagnostischer Marker. Bei gesunden Patientinnen ergab sich kein Nachweis von MAL2, wogegen sich bei Frauen mit einem Karzinom eine vermehrte Expression des Markers zeigte [115]. Auch bereits beim Kolon- sowie Ovarialkarzinom konnte eine erhöhte Expression des Gens nachgewiesen werden [116, 117]

Das Mammaglobin (MGL) wurde initial bei Untersuchungen von Proteinexpressionen beim Mammakarzinom entdeckt [118]. Es wird zur Familie der Sekretoglobine gezählt und konnte sich bereits als immunhistochemischer Marker beim Mammakarzinom durchsetzen [118,119]. Jedoch scheint MGL nicht nur bei anderen gynäkologischen Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen, sondern vor allem auch beim endometrioiden Adenokarzinom [120]. Die Expression von Mammaglobin war im Vergleich zum normalen, gesunden Endometrium bei Karzinomen erhöht [121].

1.7 Zirkulierende Tumorzellen (CTCs)

Sogenannte circulating tumor cells (CTCs) sind einzelne Tumorzellen, welche sich vom Primärtumor ausgehend absiedeln und sich vor allem in den Lymph- und Blutgefäßen, aber auch in der Liquorflüssigkeit befinden können. Man geht davon aus, dass die CTCs der Ursprung von, den vom Primärtumor sich ausbildenden, Fernmetastasen sind [122, 123]. Das Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen konnte bereits bei verschiedenen Tumorentitäten, vor allem auch bei anderen gynäkologischen Tumorerkrankungen, zum Beispiel dem Mammakarzinom, als ein eigenständiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben nachgewiesen werden [124-129]. Bereits im Jahre 1869 wurden von Thomas Asworth die ersten veränderten Zellen im Blut, die eine tumorähnliche Morphologie zeigten, dokumentiert [130]. Anhand dieser Feststellung wurden von nachfolgenden Kollegen weitere Untersuchungen durchgeführt und als die ‚seed and soil‘ Hypothese veröffentlicht. Diese Hypothese besagt, dass bestimmte Tumorzellen (‚seed‘) eine spezifische Affinität zu den Organen und dem darin befindenden Milieu (‚soil‘) benötigen, um Metastasen bilden zu können [131,132].

Man geht davon aus, dass die zirkulierenden Tumorzellen sich bereits im Anfangsstadium der beginnenden Krebserkrankung loslösen und sich über den hämatogenen und lymphatischen Weg verbreiten [133, 134]. Die CTCs dringen anschließend in das Knochenmark ein, formieren sich als Tumorreservoir und werden zu den sogenannten disseminated tumor cells (DTCs) [135, 136].

Jedoch ist es heutzutage immer noch eine Herausforderung die CTCs mit einer geeigneten Methode im Blut nachzuweisen. Ein Grund hierfür ist die geringe Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen im Vergleich zu den vorhandenen Blutzellen [137]. Bisher steht zum Beispiel bereits eine offiziell von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassene Methode, das sogenannte „CellSearch® System“ von der Firma Veridex LLC, zur Verfügung. Diese ist ziemlich kostenintensiv und bisher nur für das metastasierte Mammakarzinom zugelassen [138].

Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems könnte die Anwendung der sehr gut durchführbaren, sehr sensitiven und kostengünstigen Real-Time PCR Methode sein. Aufgrund eines vom Epithel ausgehenden Primärtumors und den dazugehörigen CTCs, welche ebenso ein epitheliales Genexpressionsmuster aufweisen, könnte man diese durch die Real-Time PCR von den umgebenden Blutzellen unterscheiden. Diese sind Zellen mesenchymalen Ursprungs und weisen deshalb ein unterschiedliches Genexpressionsmuster im Vergleich zu den zirkulierenden Tumorzellen auf.

Aufgrund der in bereits einzelnen Studien nachgewiesenen Einfluss der CTCs auf die Prognose beim Endometriumkarzinom, vor allem bei den high-risk Patientinnen, könnte der Nachweis jener einen weiteren Ansatz in der Karzinomtherapie darstellen [139, 140].

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen und Tumorresiduen im Blut und Knochenmark ist bereits seit den letzten Jahren ein Schwerpunkt in der Brustkrebsforschung. Jedoch gibt es bei anderen gynäkologischen Tumorentitäten, vor allem auch beim Endometriumkarzinom, bisher nur wenig Studien, die diesen wichtigen Prognosefaktor untersuchen. Nach wie vor stellt der Nachweis jener CTCs immer noch eine technische Herausforderung dar, die weitere Untersuchungen fordern. Ein Nachweis solcher Tumorresiduen im Blut könnte helfen das Risiko einer eventuellen Fernmetastasierung einzuschätzen und zusätzlich entscheidend sein, ob bei jenen betroffenen Patientinnen individualisiert eine systemische Chemotherapie zusätzlich zur operativen Therapie in Frage käme. Auch im Rahmen einer Nachsorgeüberwachung könnte der Nachweis von CTCs dazu beitragen das Outcome durch rechtzeitiges therapeutisches Einschreiten zu verbessern.

Diese wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Schaffung einer Grundlage von Markergenexpressionen, mithilfe denen man durch weitere Untersuchungen CTCs bei Endometriumkarzinom-Patientinnen mittels der Real-Time PCR Methode nachweisen könnte. Hierfür wurden mehrere Gene, welche nach ausgiebiger Literaturrecherche bereits im Zusammenhang mit einem Endometriumkarzinom beschrieben wurden, untersucht. Ziel ist es ein Set aus Markergenen zu erstellen, welches anschließend für weitere Tests im Blut herangezogen werden kann. Zusätzlich soll diese Arbeit die Real-Time PCR als kostengünstige und sensitive Methode aufzeigen, die auch im klinischen Alltag unter alltäglichen Laborbedingungen Anwendung finden kann.

2. Methoden und Material

2.1 Zellkultur

Um geeignete Markergene zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Patientinnen, welche an einem Endometriumkarzinom erkrankt sind, zu finden wurden sechs verschiedene Endometriumkarzinomzelllinien untersucht. Dies erfolgte mithilfe der Real-Time PCR Methode durch Extraktion von mRNA und deren Umschreibung in cDNA.

2.1.1 Zelllinien

Die folgenden sechs Endometriumkarzinom-Zelllinien AN3CA, HEC-1-A, HEC-1-B, Ishikawa, KLE und RL-95-2 wurden für die Versuche eingesetzt. Die von den Firmen ATCC und ECACC erworbenen Zelllinien stammen von Patientinnen mit gesichertem Endometriumkarzinom und wurden mit DMEM, angereichert mit 10% Fetal Calf Serum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S), herangezüchtet. Nur für die KLE Zelllinie wurde stattdessen DMEM F-12, mit 10% FCS und 1% P/S, als Kulturmedium verwendet.

Zelllinie (Referenz)	Beschreibung	Tumorhistologie	Firma
AN3 CA (ATCC® HTB-111™)	Humane Endometriumkarzinomzelllinie adhärent	Adenokarzinom	ATCC
HEC-1-A (ATCC® HTB-112™)	Humane Endometriumkarzinomzelllinie adhärent	Adenokarzinom	ATCC
HEC-1-B (ATCC® HTB-113™)	Humane Endometriumkarzinomzelllinie, adhärent	Adenokarzinom	ATCC
Ishikawa ER+ (ECACC N. 99040201)	Humane Endometriumkarzinomzelllinie, adhärent	Adenokarzinom	ECACC
KLE (ATCC® CRL-1622™)	Humane Endometriumkarzinomzelllinie, adhärent	Adenokarzinom	ATCC
RL95-2 (ATCC® CRL-1671™)	Humane Endometriumkarzinomzelllinie, adhärent	Karzinom	ATCC

Tab. 03: Humane adhärenzte Endometriumkarzinomzelllinien Teil 1

Zelllinie (Referenz)	Alter des Spenders	Herkunft	Deponent	Zellcharakteristiken
AN3 CA (ATCC® HTB- 111™)	55	Europa	CJ Dawe	Aus einer Metastase eines Lymphknotens extrahiert
HEC-1-A (ATCC® HTB- 112™)	71	Europa	H Kuramoto	Von einem mäßig gut differenzierten Adenokarzinom (Grad 2) gewonnen; c-fos +; Rezeptorexpression: platelet activating factor (PFA)
HEC-1-B (ATCC® HTB- 113™)	71	Europa	H Kuramoto	Sind ein Unterstamm der HEC-1-A Zelllinie; von einem mäßig gut differenzierten Adenokarzinom (Grad 2) gewonnen; flachere Wachstumskurve
Ishikawa ER+ (ECACC N. 99040201)	39	Asien	A. Taylor	Verursachen ein Tumorwachstum eines gut differenzierten Adenokarzinoms in Labormäusen; Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptor
KLE (ATCC® CRL-1622™)	64	Europa	GR Richardson	Verursachen ein Tumorwachstum innerhalb 21 Tage in Labormäusen; zeigen Mikrovilli und Schlußleistenkomplexe; jedoch keine Drüsenformationen
RL95-2 (ATCC® CRL- 1671™)	65	Europa	DL Way	Expression von Östrogenrezeptor; besitzen α -Keratin, Schlußleistenkomplexe, Tonofilamente und Mikrovilli

Tab. 04: Humane adhärenzte Endometriumkarzinomzelllinien Teil 2

2.1.2 Kulturmedium

Material:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Dulbecco's MEM – F-12 (KLE Zelllinie)
- Pipettierhilfe
- Glaspipetten 10ml und 5ml
- Falconröhrchen 50ml
- Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
- Penicillin/Streptomycin Pulver
- Destilliertes Wasser
- Kühlschrank 4°C

Das benötigte Kulturmedium Dulbecco's MEM (500ml), für das Wachstum der Zelllinien AN3 CA, Ishikawa ER+, HEC 1-A, HEC 1-B und RL95-2, wurde unter sterilen Bedingungen mit 10% Fetal Calf Serum (50ml) und 1% Penicillin/Streptomycin (5ml) angereichert und anschließend mit Parafilm verschlossen. Das Kulturmedium wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Für die KLE Zelllinie wurde das DMEM-F-12 (500ml) mit 10% FCS (50ml) und 1% Penicillin/Streptomycin (5ml) verwendet.

2.1.3 Subkultivierung von Zelllinien

Material:

- Kulturflaschen mit Zelllinie
- Pipettierhilfe
- Glaspipetten 10ml und 5ml
- PBS
- Trypsin / EDTA
- Medium (DMEM + 10%FCS + 1%Penicillin/Streptomycin)
- Brutschrank (37°C und 5% CO₂)

Die Endometriumkarzinomzelllinien wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert, wobei das CO₂ der Konstanthaltung des pH-Wertes dient. Alle 5-7 Tage wurde eine Reduktion der Zellzahl durchgeführt, um gezielt die Zelldichte und das Wachstum der Zelllinien zu regulieren. Da es sich um adhärenzte Zelllinien handelt, musste zum Ablösen der Zellen von dem Kulturflaschenboden Trypsin/EDTA verwendet werden. Zur Kontaminationsvermeidung wurde unter einer sterilen Sicherheitswerkbank Hera Safe der Firma Thermo Fisher Scientific gearbeitet.

Für die weiteren Versuche wurden auch stetig neue Zellkulturflaschen aufgezogen um RNA isolieren zu können. Hierfür wurde zuerst das alte Kulturmedium beseitigt und der Rest durch Waschen mit PBS entfernt. Daraufhin wurde das Ablösen der Zellen durch Applikation von Trypsin vorgenommen. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von neuem Kulturmedium. Während ein Teil der Zellen verworfen wurde, wurde der andere Teil mit frischem Kulturmedium versetzt und für die weiteren Untersuchungen wieder im Brutschrank aufbewahrt.

2.2 RNA Isolierung

Material:

- PBS
- Cell scraper
- Trizol LS[®]
- Chloroform
- Falconröhren 10 ml
- Eppendorf Tubes
- Pipettierhilfe
- Glaspipetten (5ml)
- Pipettierspitzen (1000µl, 100µl und 10µl)
- Zentrifuge
- Isopropanol
- Ethanol 75%

- Destilliertes Wasser
- Minizentrifuge

Zur Isolierung der benötigten RNA aus den unterschiedlichen Zelllinien wurde eine Phenol/Chloroform – Extraktion mit Trizol LS[®] durchgeführt [141]. Während diesem Arbeitsschritt musste besonders vorsichtig und genau gearbeitet werden, um Kontaminationen durch RNasen zu vermeiden. Ribonucleasen sind Enzyme, welche die für den weiteren Versuch benötigte RNA durch Hydrolyse der 5'Esterbindung von Phosphodiester-Brücken abbauen [95]. Sie befinden sich in Körperflüssigkeiten- und auf Oberflächen, wie zum Beispiel auf Haut und Haaren, weshalb unter einer Sicherheitswerkbank mit Latex-Handschuhen und vorsichtigem Pipettieren gearbeitet wurde.

Als ersten Schritt wurde das Zellkultur-Medium abgegossen und die Karzinomzellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3ml Trizol LS[®] hinzugegeben und die Zellen mit dem cell scraper von dem Flaschenboden gelöst. Nun wurde die Lösung vorsichtig in ein Falconröhrchen überführt und das 0,2-fache Volumen der vorhandenen Menge an Chloroform hinzugegeben. Die Lösung wurde durch Schütteln gemischt, auf zwei Reaktionsgefäße (Tubes) verteilt und anschließend bei 4°C und 12000xg für 15 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich 3 Phasen: 1. Klare wässrige Phase (RNA), 2. Weiße Phase (Proteine), 3. Rosa Phase (Zellbestandteile). Die obere klare Schicht wurde vorsichtig abpipettiert, in ein Reaktionsgefäß gegeben und 800µl Isopropanol hinzugegeben. Die Probe wurde über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000xg und 4°C durchgeführt. Aufgrund der Zentrifugation wird die RNA ausgefällt und es entsteht ein sogenanntes RNA-Pellet. Der Überstand aus Isopropanol wurde vorsichtig abpipettiert, das Pellet mit 1ml 75%-Ethanol gewaschen und erneut bei 12000xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde erneut abpipettiert und das Pellet für 15 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurde ca. 10-30µl, je nach Pelletgröße, destilliertes Wasser zum Lösen des Pellets hinzugegeben.

2.2.1 Bestimmung der RNA Konzentration und Ratio im Photometer

Material:

- RNA-Proben
- Destilliertes Wasser (Leerprobe)
- Photometer Nanodrop (Implen)
- Pipetten
- Pipettierspitzen

Um eine genaue Aussage über die vorhandene Menge und Reinheit der Probe treffen zu können, wurde die Konzentration und Ratio (Protein/RNA-Quotient) der RNA-Probe mit einem Photometer der Firma Implen (Modell Nanodrop) gemessen. Die Konzentration wurde bei 260nm ermittelt und die Ratio ergibt sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 260nm und 280nm. Das Gerät wurde zuerst mit einer Leerprobe, bestehend aus 4µl destilliertem Wasser, kalibriert. Im Anschluss wurden 4µl RNA der jeweiligen Zelllinie auf den Applikator des Photometers pipettiert. Nachfolgend wurden anhand der optischen Dichte der Probe bei 260nm und 280nm die benötigten Werte, RNA - Konzentration und Ratio, ermittelt.

2.3 Reverse Transkription

2.3.1 Umrechnung für die Reverse Transkription Reaktion

Die Menge für einen einfachen Ansatz wurde wie folgt berechnet: 6µl RNA + 1µl Primer (Oligo dT) + 1µl Annealing Buffer + 10µl 2x First Strand Reaction Mix + 2µl Enzyme Mix. Dies ergab eine Gesamtmenge von 20µl.

Um die benötigte Erststrang-cDNA aus der bereits isolierten RNA für die PCR zu gewinnen, wurde mit dem SuperScript®III First-Strand Synthesis Super Mix, einem Kit des Herstellers Invitrogen, gearbeitet. Dieser Kit beinhaltet folgende Reagenzien:

- SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix
- 2X First-Strand Reaction Mix
- Annealing Buffer
- Oligo(dT)₂₀ (50µM)

Der SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix setzt sich zusammen aus einer M-MLV Reversen Transkriptase, welche die RNase H Aktivität reduziert und zugleich eine erhöhte Hitzebeständigkeit aufweist, sowie einem rekombinanten RNase Inhibitor [142, 143]. Dieser reduziert den Abbau der target-RNA durch Ribonuclease Kontamination. Im 2X First Strand Reaction Mix befinden sich 10 mM MgCl₂ und 1mM von jedem dNTP in einer Pufferlösung für eine Erststrangsynthese der cDNA. Mithilfe der eingesetzten Oligo(dT)₂₀ Primer wird die Bindung des Primers an das PolyA Ende der mRNA genutzt, um die cDNA Erststrangsynthese zu initiieren [143]. Die verwendete mRNA ist eine einzelsträngige RNA, welche für die jeweiligen gesuchten Gensequenzen codiert und wird durch die Reverse Transkriptase in die benötigte komplementäre Erststrang-cDNA umgewandelt. Dementsprechend kann im Weiteren die Expression der verschiedenen Markergene, in Form der umgeschriebenen cDNA, mithilfe der Real-Time PCR ermittelt werden.

Material:

- Isolierte RNA (4µg RNA in max. 6µl – einfache Reaktion)
(8µg RNA in max. 12µl – doppelte Reaktion)
- Super Script® III First-Strand Synthesis SuperMix
- Thermoblock (65°C, 50°C, 85°C)
- Pipetten
- Pipettenspitzen
- Gefäß mit Eis

Zur Vorbereitung wurden zunächst die Konzentrationen der benötigten RNA über den Dreisatz ausgerechnet (siehe Tab. 1), um diese dann durch Wasserzugabe auf ein Gesamtvolumen von 6µl, bzw. bei doppeltem Ansatz auf 12µl, zu bringen. Zuerst wurden alle RNA Proben zentrifugiert und der Thermo cyclcer auf 65°C erhitzt. Als nächsten Arbeitsschritt wurden die jeweilig errechnete RNA- und H₂O Menge in ein Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend, bei einfachem Ansatz, 1µl Primer und 1µl Annealing buffer in jedes einzelne Gefäß hinzugegeben. Nun wurden die Proben für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und nachfolgend direkt für 1 Minute in ein Gefäß mit Eis, zum Abkühlen der Probe, gelagert. Im Anschluss wurden 10µl 2X First Strand Reaction Mix und 2µl Enzyme Mix pro RNA Probe in die Reaktionsgefäße pipettiert. Alle Proben wurden zentrifugiert und anschließend für 50 Minuten bei 50°C im Thermocycler inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben bei 85°C für 5 Minuten erhitzt um die Polymerase Reaktion zu stoppen. Die gewonnene cDNA wurde für die Real-Time PCR bei -20°C aufbewahrt.

2.4 Gewebeverarbeitung und RNA Isolierung der Negativkontrolle

Um eine Aussagekraft über die vermehrte Genexpression von CCNE, CLDN-4, CK19, MAL2 und MGL durch eine Real-Time PCR beim Endometriumkarzinom zu erhalten, wurde eine Negativkontrolle in Form einer RNA Isolierung von stromalen und glandulären Zellen aus gesundem Endometriumsgewebe generiert. Das Endometriumsgewebe wurde von Patientinnen, welche mit der Gewebeentnahme einverstanden waren, während einer Operation zur Untersuchung der Fertilität entnommen. Die Proben wurden in DMEM-F-12 (10% FCS, 1% P/S) aufbewahrt und im Anschluss, wie von Fernandez-Shaw et al. 1992 [144] und Zhang et al 1995 [145] beschrieben, im Labor verarbeitet.

Material:

- Endometriumsgewebe von Patientinnen
- Kleine Petrischale
- DMEM-F-12 (10% FCS, 1% P/S)
- Skalpell
- Collagenase 1mg/ml
- Sieb (200µm, 40µm)
- Falconröhrchen 10 ml
- Pipettierhilfe
- Glaspipetten (5ml)
- HBSS (0,1% FCS)
- Trypsin/EDTA - Lösung
- Zentrifuge
- Trizol TS®
- Chloroform
- Tischzentrifuge

Das gewonnene Endometriumgewebe wurde zuerst mit einem Skalpell in 2-3mm große Stücke zerkleinert und anschließend mit 1 mg/ml Collagenase, in DMEM (10% FCS) gelöst, vermischt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte ein erneutes Zerkleinern durch eine Glaspipette und Filtrieren des Gewebes durch ein 200µm Sieb in ein Reaktionsgefäß (Falconröhrchen). Die aufgefangene Flüssigkeit wurde erneut filtriert, dieses Mal durch ein 40µm Zell-Sieb. Hierbei blieben die glandulären Zellen auf dem Filter haften, während sich die stromalen Zellen in der aufgefangenen Lösung befanden. Die Lösung mit den stromalen Zellen wurde als Nächstes bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert und darauffolgend 1-2 ml Trizol und das 0,2-fache Volumen der vorhandenen Menge an Chloroform hinzugegeben. Die weiteren Schritte erfolgten identisch zur RNA-Isolierung der Endometriumkarzinomzelllinien.

Zur Weiterverarbeitung der glandulären Zellen wurde der Filter mit 5ml HBSS (0,1% FCS) gewaschen und somit die Zellen vom Filter gelöst sowie in ein Falconröhrchen überführt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und das entstandene Pellet nachfolgend in 3ml HBSS Trypsin/EDTA (0,025%) – Lösung resuspendiert und bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert. Die Drüsenzellen wurden durch eine Glaspipette nochmal durchgespült und vereinzelt. Das vorher zugeführte Trypsin wurde durch Beimischen von 7ml DMEM-F12 (10% FCS, 1% P/S) zur Lösung mit den glandulären Zellen inaktiviert und erneut bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Als nächster Schritt wurde nun 1 ml Trizol und das 0,2-fache Volumen der vorhandenen Menge an Chloroform hinzu pipettiert. Weiterführend wurde wie bei der RNA-Isolierung von den Endometriumkarzinomzelllinien gearbeitet.

2.5 Real-Time PCR

Die Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur Ermittlung sowohl der relativen als auch der absoluten Menge eines DNA-Abschnittes herangezogen. Das aufgezeichnete Fluoreszenzsignal entsteht durch Anlagern von sogenannten „Reportern“, zum Beispiel Sybr® Green (DNA-Farbstoff) [146], an die während der Reaktion neu entstandene DNA. Auf diese Weise kann ein Rückschluss von dem registrierten ansteigenden Fluoreszenzsignal auf die Menge pro PCR Zyklus synthetisierter DNA gezogen werden. Gemessen wird somit der Intensitätsunterschied der Fluoreszenz für jeden einzelnen PCR Zyklus. Hierbei muss ein sogenannter Schwellenwert erreicht werden. Diesen nennt man C_T -Wert (threshold cycle) und wird definiert als der PCR Zyklus in welchem das Zielgen einen festgelegten „threshold“ (Schwellenwert) überwindet. Je schneller die Anzahl der synthetisierten DNA ansteigt und das Gen den Schwellenwert erreicht, desto höher exprimiert ist das untersuchte Zielgen [147, 148]. Die Real-Time PCR Reaktion liefert somit genaue Daten zur Menge der vorhandenen cDNA. Die hier verwendete Methode führte eine relative Quantifizierung der synthetisierten DNA in Echtzeit durch. Wobei hierfür eine Referenzprobe in Form eines Kontrollgens, zum Beispiel eines der häufig verwendeten Genen 18S, GAPDH oder β -Aktin, benötigt wird [149]. Bei den folgenden Untersuchungen wurde 18S als interne Kontrolle verwendet und das ermittelte Fluoreszenzsignal der gesuchten Gene normalisiert.

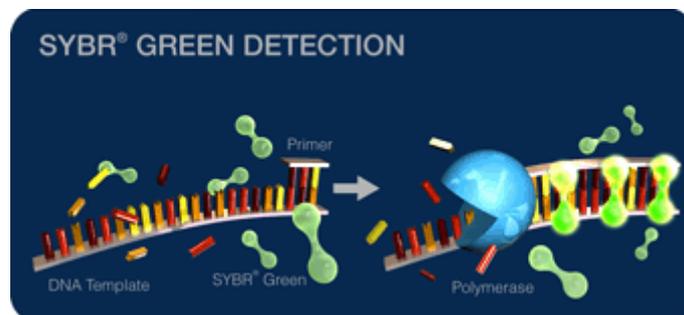


Abb. 01: Initiierung eines Fluoreszenzsignals mit Sybr® Green [150]

Zur Ermittlung der Expression der ausgewählten Markergene wurde die sogenannte TaqMan PCR verwendet, eine modifizierte Variante der Real-Time PCR, welche bereits 1991 entwickelt wurde. Die Taqman Methode verwendet die 5' – 3' Exonuclease-Aktivität der Taq DNA Polymerase zur Generation eines Signals während des Amplifikationsprozesses. Zusätzlich zu den für die PCR Methode benötigten Primern wird eine genspezifische Sonde verwendet und der Reaktion hinzugefügt. An dieser Sonde befindet sich an einem Ende ein sogenannter „Reporter“, welcher das Fluoreszenzsignal trägt, und an dem anderen Ende ein „Quencher“. Der „Quencher“ unterdrückt über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) das Fluoreszenzsignal des „Reporters“. Kommt es jedoch zu einer Bindung an die komplementäre Zielsequenz wird der „Reporter“ durch die verwendete Taq DNA Polymerase und deren 5' – 3' Exonuclease-Aktivität entfernt. Hierdurch entsteht ein Signal, welches von dem entsprechenden PCR-Gerät erfasst wird [151, 152].

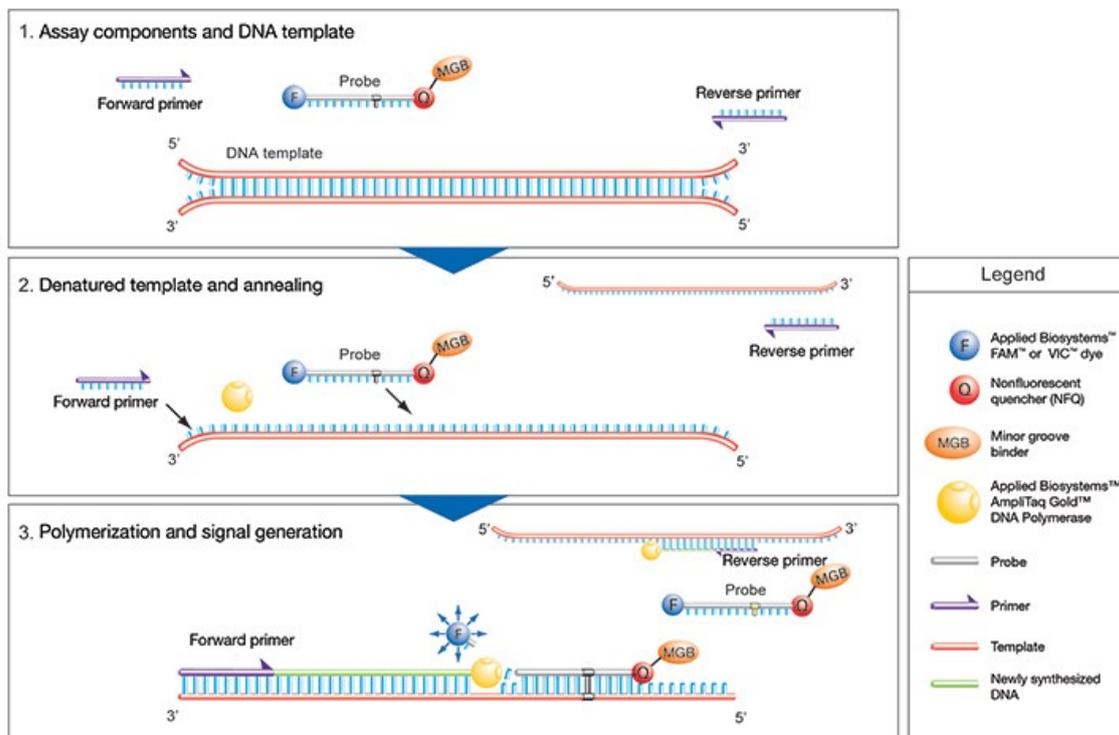


Abb 02: Ablauf einer TaqMan® Real-Time PCR [153]

Material:

- 96 Wells Mikrotiterplatte mit Barcode
- 7500 Fast Real-Time PCR Gerät
- Hergestellte cDNA
- TaqMan® Primer (CCNE, CLDN-4, CK19, MAL2, MGL und 18S)
- TaqMan® PCR Mastermix
- H₂O
- Adhäsionsfilm (Abdeckfolie)
- Pipetten
- Pipettenspitzen

Die Genexpression von CCNE, CLDN-4, CK19, MAL2 und MGL wurde für jedes Gen dreimal mit Hilfe einer Real-Time PCR Reaktion analysiert und mittels der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode untersucht und ausgewertet [154]. Bei dieser Methode wird die Fluoreszenz gemessen und die Unterschiede in der Intensität pro PCR Zyklus dargestellt. Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wurde das 7500 Fast Real-Time PCR Gerät von Applied Biosystems und die entsprechende Software (SDS Software V 1.3.1) verwendet.

Zuerst wurde eine Mikrotiterplatte mit 96-Wells und den benötigten Materialien für den Versuch vorbereitet. Als Erstes wurden 2µl der hergestellten cDNA in die jeweiligen Wells gegeben. Anschließend wurden 10µl TaqMan PCR Mastermix und 7µl H₂O in der für die gesamte Reaktionsplatte benötigten Menge in einem Eppendorfgefäß vorbereitet. Zusätzlich wurde 1µl Primer für das jeweilige gesuchte Gen mit dem Reaktionsmix vermischt. Von dieser Lösung wurden nun jeweils 18µl in die bereits mit cDNA gefüllten Wells hinzu pipettiert. Als endogene Kontrolle für die relative Quantifizierung wurde 18 S, eine ribosomale RNA, verwendet. Zum Schutz vor Verdampfung wurde die 96-Wellsplatte mit einem Adhäsionsfilm abgedeckt und anschließend in der Zentrifuge mit 300g für 1 Minute zentrifugiert. Nachfolgend wurde die Reaktionsplatte in das Gerät platziert und die Reaktion gestartet.

Der Temperaturablauf während der Real-Time PCR Reaktion war wie folgt: Zuerst 20 Sekunden bei 95°C und anschließend 40 Zyklen mit je 3 Sekunden bei 95°C und 30 Sekunden bei 60°C. Die verschiedenen Temperaturabläufe werden für die Denaturierung der cDNA, sowie zum Anlagern des Primers und der Elongation benötigt. Nach Beendigung des Versuches wurde mithilfe der SDS Software die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale analysiert und die CT-, Δ CT-, $\Delta\Delta$ CT- Werte sowie der Relative Quantification value (RQ-Wert) berechnet. Anschließend wurden die ausgearbeiteten Werte für jedes Gen in Microsoft Excel exportiert und aufgelistet.

Gene	Gene-specific primer (Bezeichnung)
18S	Hs_99999901_s1
CLDN4	Hs_00976831_s1
CCNE	Hs_00180319_m1
CK19	Hs_00761767_m1
MAL2	Hs_00294541_m1
MGL	Hs_00419570_m1

Tab. 05: Liste der benutzten TaqMan Primer von Applied Biosystems

Schritte	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1	95°C	20 Sekunden	1
2	95°C	3 Sekunden	40
	60°C	30 Sekunden	

Tab. 06: Temperaturverlauf der Real-Time PCR Reaktion

PCR	18S	18S	CLD N-4	CLD N-4	CK19	CK19	CCN E	CCN E	MAL 2	MAL 2	MGL	MGL
AN3	AN3	AN3	AN3	AN3	AN3	AN3	AN3	AN3	AN3	AN3	AN3	AN3
HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A	HEC 1A
HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B	HEC 1B
ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A	ISHI KAW A
KLE	KLE	KLE	KLE	KLE	KLE	KLE	KLE	KLE	KLE	KLE	KLE	KLE
RL95	RL95	RL95	RL95	RL95	RL95	RL95	RL95	RL95	RL95	RL95	RL95	RL95
NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV	NEG ATIV

Tab. 07: Anordnung der 96-wells Mikrotiterplatte, Real-Time PCR

2.6 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

2.6.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Chloroform p.a.	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's MEM	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's MEM - F-12	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
Ethanol p.a.	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Fetal bovine serum	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
Harks' Salt solution (HBSS)	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol p.a.	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kollagenase	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
TaqMan Primer	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
SuperScript III First Strand Synthesis Super Mix for qPCR	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
TaqMan Fast Universal PCR Mastermix (2x), No Amperase UNG	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
Trizol LS	Ambion	Carlsbad, Kalifornien, USA
Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% (w/v) in PBS ohne Ca²⁺	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland

Tab. 08: Auflistung der verwendeten Chemikalien

2.6.2 Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Abzug	Hera Safe	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Brutschrank 37°C und 5% CO₂	Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
CO₂ Flasche		Linde Group	München, Deutschland
Concentrator	5301	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Heizblock	Dri Block DB2A	Techne	Staffordshire, United Kingdom
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Comfort No Frost	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank 6°C	Glass Line	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland
Minizentrifuge	Centrifuge 5415	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Photometer	Nanodrop	Implen	München, Deutschland
Pipetten	Volumina: 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co KG	Wertheim, Deutschland
Real Time PCR Gerät	7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
Tischzentrifuge	Multifuge 3SR+/L-R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Vortex	Genie 2	Bender & Hobein GmbH	München, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge Stratos	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Tab. 09: Auflistung der verwendeten Geräte

2.6.3 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Firmensitz
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0,1ml	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
Multi Safe Seal Tubes, 1,5/1,7 ml	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Flacon Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Glaspipetten 5 ml, 10 ml	SARSTEDT AG & Co.	Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Pipettenspitzen, -10 µl, -100 µl, -1000 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Kulturflasche Falcon 250 ml	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Cell scraper	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäß 0,6 ml farblos	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischale Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Skalpell 22kGy	Feather Safety Razer Co.	Osaka, Japan
Gewebesieb 250 µm	Thermo Scientific	Rockford, Illinois, USA
Falcon Zellsieb 40 µm	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich

Tab. 10: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

3. Ergebnisse

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Methoden und Versuche erörtert.

Zunächst werden die relevanten Ergebnisse der RNA-Isolierung und Gewebeisolierung der Negativkontrolle dargestellt, gefolgt von den Messungsergebnissen der Real-Time PCR.

3.1 RNA Isolierung

Die RNA Isolierung aus den sechs unterschiedlichen Karzinomzelllinien erfolgte mittels der Phenol/Chloroform – Extraktion mit Trizol LS[®]. Es wurde durch genaues und sorgfältiges Arbeiten darauf geachtet eine Kontamination durch RNasen zu vermeiden. Ansonsten würde es zu einer Degradierung der bereits isolierten RNA kommen. Um die Reinheit und die Konzentration zu messen, welche für die weiteren Versuche essentiell waren, wurde eine photometrische Messung mit einem Nanodrop-Photometer der Firma Implen durchgeführt.

Anhand der Konzentration konnte man die benötigten Mengen für die weiterführenden Experimente errechnen. Die sogenannte Ratio stellte den Reinheitsgehalt der isolierten RNA dar und sollte idealerweise um den Bereich 1,7-2,0 liegen. Mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge konnten die geeigneten Konzentrationen, der teils in 20µl destilliertem Wasser aufgelösten RNA Pellets, für die nachfolgende Reverse Transkriptase Reaktion, gewonnen werden.

Nachfolgend nun die ermittelten Werte für die einzelnen Zelllinien:

Zelllinie	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Ratio
AN3 CA (ATCC® HTB-111™)	2,812	1,97
HEC-1-A (ATCC® HTB-112™)	2,246	1,94
HEC-1-B (ATCC® HTB-113™)	1,202	1,99
Ishikawa ER+ (ECACC N. 99040201)	2,634	1,97
KLE (ATCC® CRL-1622™)	2,148	1,97
RL95-2 (ATCC® CRL-1671™)	0,758	1,93

Tab. 11: Ergebnisse der RNA Isolierung

Die bei der RNA Isolierung ermittelten Konzentrations- und Ratiowerte zeigten eine ausreichende RNA-Quantität und -Qualität des gewonnenen Materials. Das gewonnene Material konnte aufgrund dieser guten Qualität für die Folgeversuche herangezogen werden.

3.2 Gewebeverarbeitung und RNA Isolierung der Negativkontrolle

Um eine geeignete Negativkontrolle für die Real-Time PCR Messung zu erhalten wurden unterschiedliche Endometriumgewebeproben von Patientinnen mit unauffälliger Pathologie nach den Methoden von Fernandez-Shaw et al. 1992 [131] und Zhang et al 1995 [132] verarbeitet.

Den ausgewählten Patientinnen wurde nach Aufklärung und Zustimmung eine Gewebeprobe während einer bereits geplanten Operation zur Fertilitätsuntersuchung entnommen.

Bei insgesamt wenig zur Verfügung stehenden Gewebematerial zur Gewinnung der Negativkontrolle, musste für die weiteren Versuche, aufgrund eines besseren Konzentrations/Ratio-Verhältnisses die gewonnene RNA der stromalen Zellen

verwendet werden. Bei den glandulären Zellen konnte auch nach mehreren Versuchen keine ausreichende Konzentration erreicht werden.

Zelllinie	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Ratio
Stromale Zellen (Endometrium)	0,896	1,96
Glanduläre Zellen (Endometrium)	0,086	1,87

Tab. 12: Ergebnisse RNA Isolierung der Negativkontrolle

3.3 Real-Time PCR

Um ein geeignetes Set an Markergenen für die Detektion von CTCs aus Blutproben von Endometriumkarzinom Patientinnen zu erstellen, wurde eine Real-Time PCR mit Hilfe von mRNA/cDNA von sechs unterschiedlichen humanen Endometriumkarzinomzelllinien und gesundem Endometriumgewebe durchgeführt (AN3 CA, HEC-1-A, HEC-1-B, Ishikawa, KLE und RL95-2).

Es wurden fünf unterschiedliche Gene untersucht, die bereits zuvor mit einem Endometriumkarzinom und einer darauffolgenden Metastasenbildung in Verbindung gebracht wurden (CCNE, CLDN-4, CK19, MAL2 und MGL). Ein hierbei erfasster RQ-Wert (Relative Quantification) von >1 zeigt eine Hochregulation des jeweiligen untersuchten Gens im Vergleich zum Referenzgewebe (gesundes Endometrium) an. Andererseits weist ein RQ-Wert <1 auf eine Herabregulierung des untersuchten Gens in Gegenüberstellung der Negativkontrolle hin.

3.4 Expression der untersuchten Markergene

Bei der Auswertung aller untersuchten Markergene im Vergleich (siehe Tabelle 13 und Abbildung 01) zeigten sich deutliche Unterschiede im Expressionsmuster der verschiedenen Endometriumkarzinomzelllinien. Eine tabellarische Übersicht mit

zusätzlichen Diagrammen im Anschluss zeigt die untersuchten Gene in den jeweiligen sechs unterschiedlichen Endometriumkarzinomzelllinien.

Markergene	RQ-Wert, AN 3 CA	RQ-Wert, HEC-1-A	RQ-Wert, HEC-1-B	RQ-Wert, Ishikawa	RQ-Wert, KLE	RQ-Wert, RL95-2
CCNE	0,045	8,938	40,56	15,215	9,807	2,582
MAL2	0,003	58,343	55,51	15,292	30,297	12,726
MGL	0,015	0,01	3.04e-004	0,008	5.83e-004	0,011
CK19	2,716	3,069	40,58	3,305	45,305	501,911
CLDN-4	7,063	118,349	86,12	42,771	11,693	3017,514

Tab. 13: Tabelle zur Genexpression aller untersuchten Markergenen

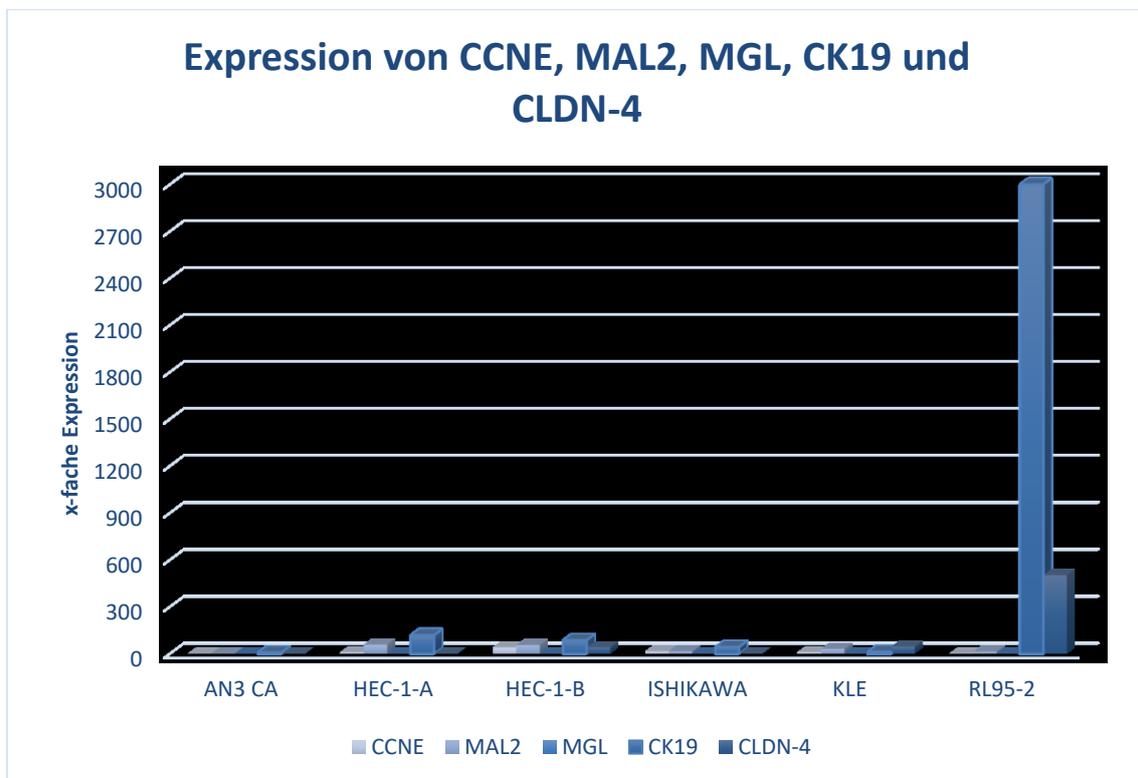


Abb. 03: Expression von CCNE, MAL2, MGL, CK19 und CLDN-4

3.4.1 CK 19 und Claudin 4

Bei der Auswertung der untersuchten Expressionslevel von CK 19 und CLDN-4 zeigte sich eine deutliche Hochregulierung der beiden Gene. Vor allem in der RL95-2 Zellreihe (CK 19: 501,91 und CDLN-4: 3017,51), aber auch in den anderen fünf Zelllinien konnte eine Hochregulierung festgestellt werden.

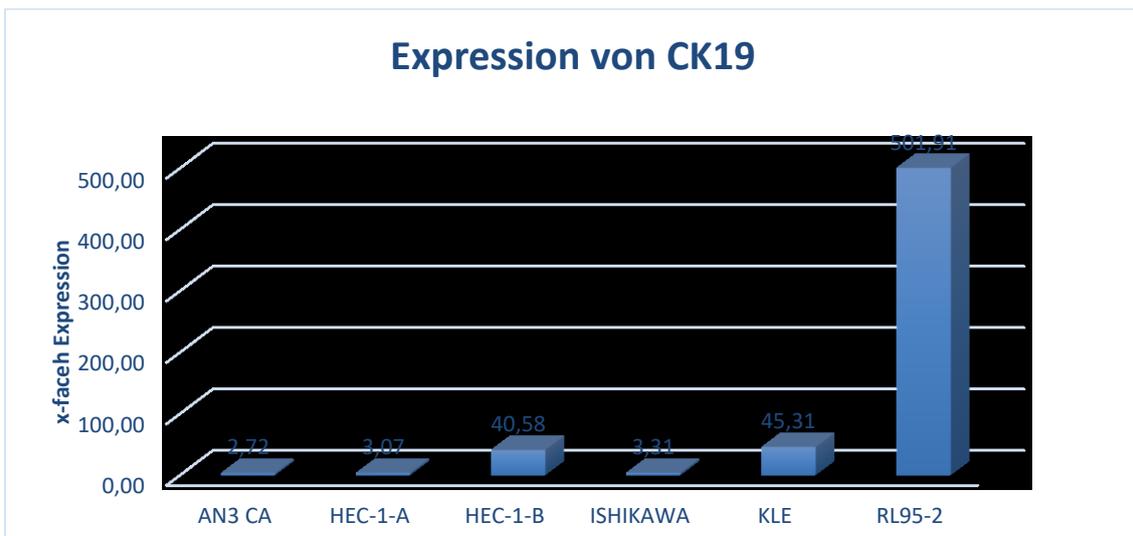


Abb. 04: Expression von CK19

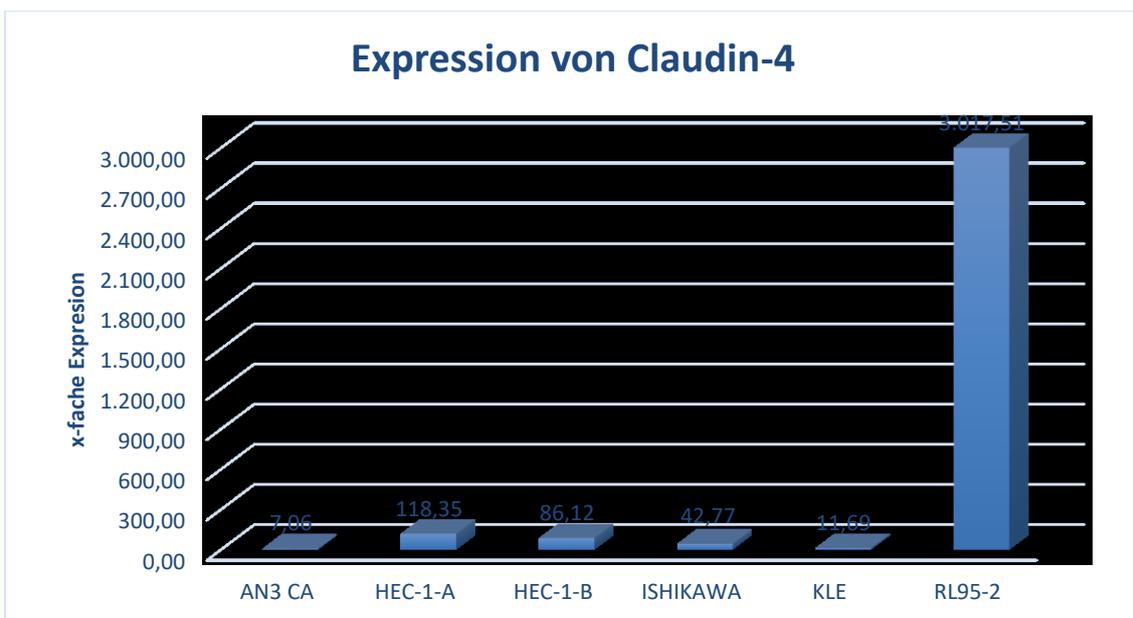


Abb. 05: Expression von CLDN-4

3.4.2 CCNE, MAL2 und MGL

Bei Betrachtung der RQ-Werte für die untersuchten Gene CCNE und MAL2 zeigten sich moderat erhöhte Expressionslevel als Zeichen einer Hochregulierung. Bei HEC-1-A (CCNE: 8,94 und MAL2: 58,34) und HEC-1-B (CCNE: 40,56 und MAL2: 55,51) wurden vergleichbare Expressionsmuster identifiziert. In der untersuchten AN3CA Zelllinie (CCNE: 0,05 und MAL2: 0,0) konnte jedoch im Vergleich keine Hochregulation festgestellt werden. Das Gen MGL wies bei den PCR-Reaktionen in allen Endometriumkarzinomzelllinien keine nachweisbare Hochregulierung auf (Ishikawa: 0,008 und RL95-2: 0.011).

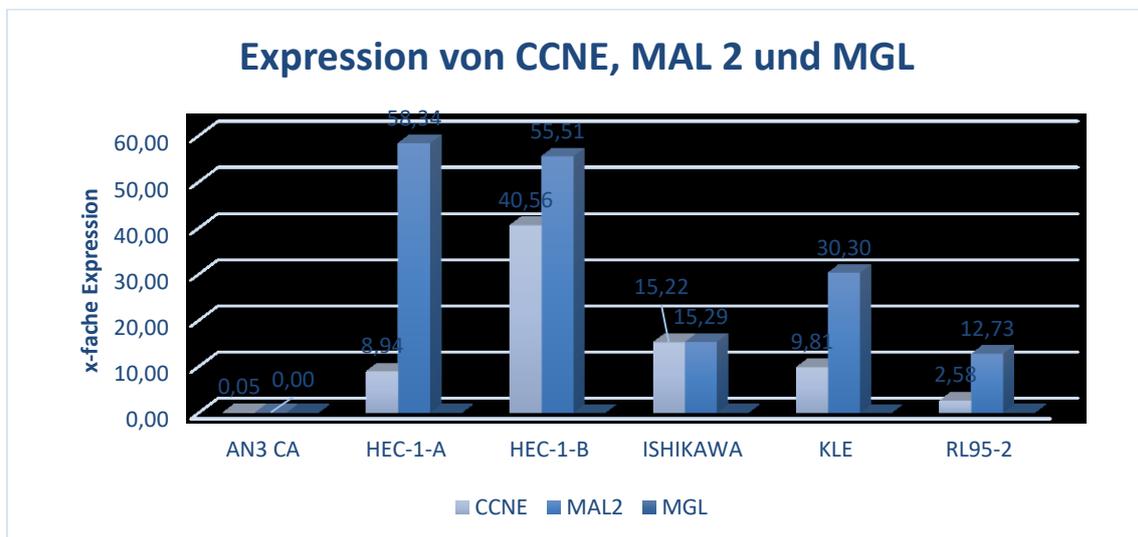


Abb. 06: Expression von CCNE, MAL2 und MGL

3.5 Expressionsmuster der unterschiedlichen Zelllinien

Aufgrund verschiedener Entitäten und der Gewinnung der unterschiedlichen Endometriumkarzinomzelllinien zeigte sich eine deutliche Varietät im Expressionsmuster und der Ausprägung der jeweiligen Genhochregulierungen. RL95-2 wies eine Hochregulierung in allen Genen, ausgenommen MGL, auf, wobei besonders das ausgeprägte Expressionslevel von CK 19 (501,19) und CLDN-4 (3017,51) auffällig sind.

HEC-1-A und HEC-1-B zeigten eine deutliche Kohärenz in der Genexpression. CLDN-4 wiederum konnte in der HEC-1-A (3,07) Zelllinie deutlich geringer nachgewiesen werden, als bei den untersuchten HEC-1-B (86,12) Expressionsmuster. Zusätzlich wiesen HEC-1-B Zelllinien eine erkennbar höhere Expressionsausprägung von CCNE (40,56) auf.

Betrachtet man das Genexpressionsmuster der Ishikawa Zelllinie, so zeigten sich Unterschiede zu den restlichen untersuchten Zelllinien. Das Gen CK 19 war wie in den meisten anderen Zelllinien hochreguliert, CLDN-4 zeigte jedoch nur eine geringfügig ausgeprägte Hochregulierung im Vergleich. MGL war wie in den restlichen Endometriumkarzinomzelllinien ebenfalls nicht hochreguliert und kaum exprimiert.

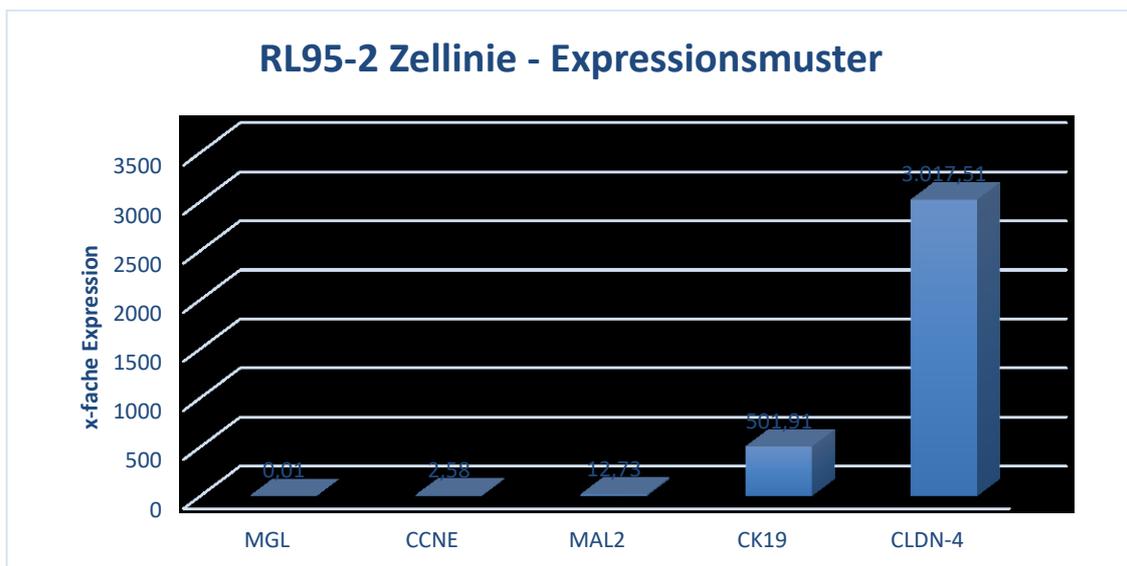


Abb. 07: Expressionsmuster der RL95-2 Zelllinie

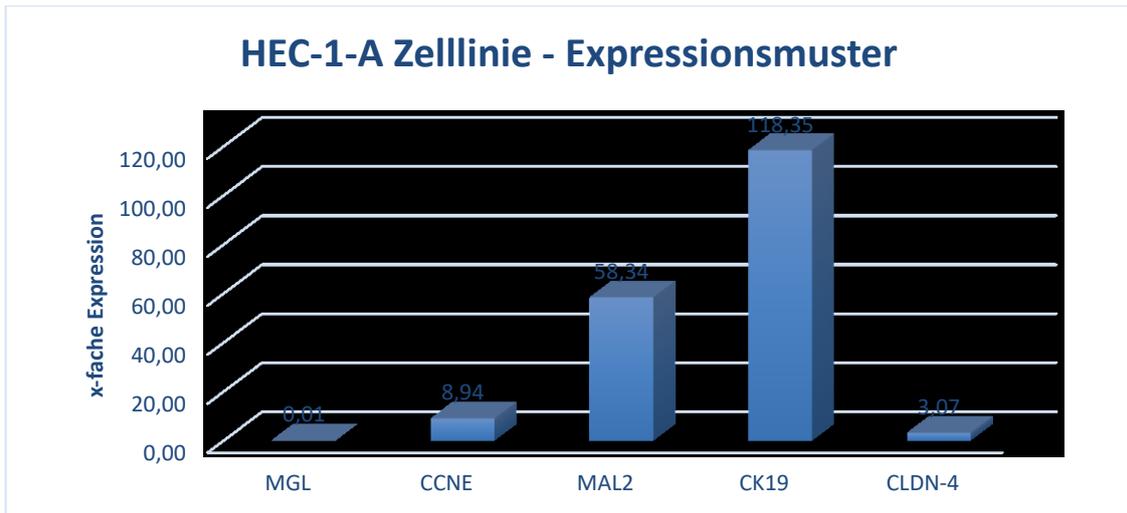


Abb. 08: Expressionsmuster der HEC-1-A Zelllinie

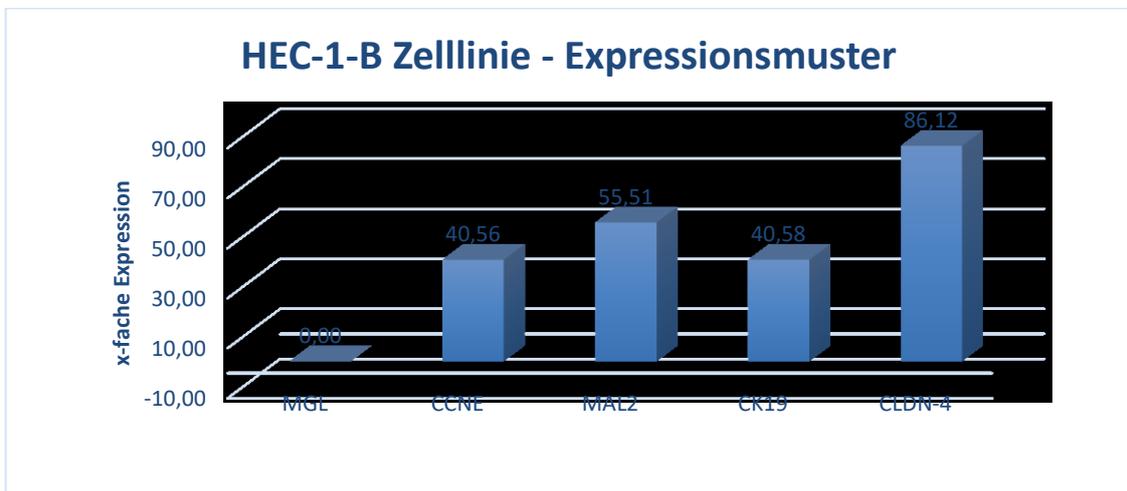


Abb. 09: Expressionsmuster der HEC-1-B Zelllinie

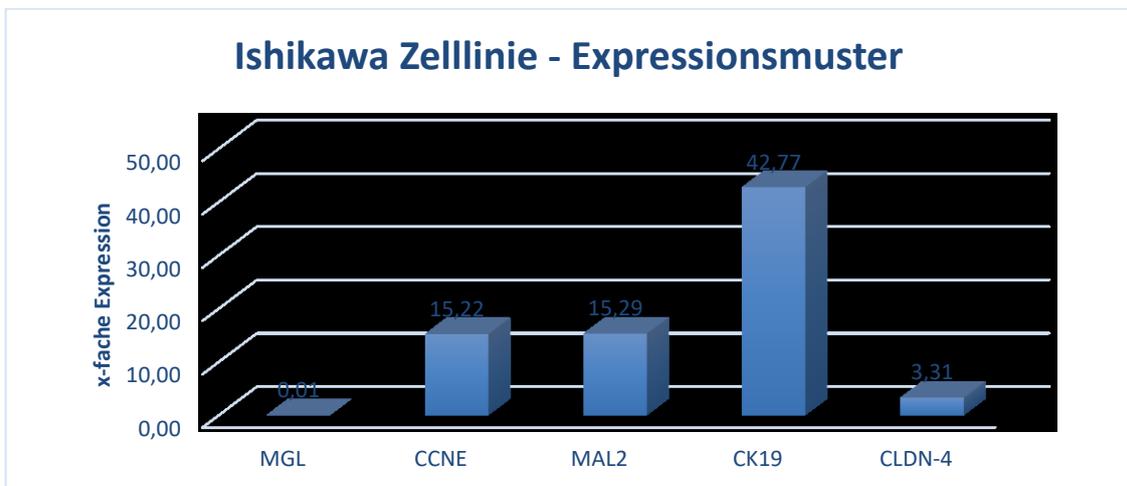


Abb. 10: Expressionsmuster der Ishikawa Zelllinie

4. Diskussion

Diese Arbeit soll die Methode der Real-Time PCR und deren mögliche Einsatzmöglichkeit in Bezug auf den Nachweis von Markergenen beim Endometriumkarzinom aufzeigen. Im ersten Teil der Diskussion wird auf die Ergebnisse der Real-Time PCR eingegangen. Im Anschluss wird über die möglichen weiteren Forschungsschritte anhand der erlangten Ergebnisse diskutiert.

4.1 Real-Time PCR Ergebnisse

Das Endometriumkarzinom ist der vierthäufigste Tumor der Frau und zählt zu den prognostisch günstigen Tumorerkrankungen. Jedoch versterben, trotz meist ausführlicher operativer Therapie, jährlich etwa 42.000 Patientinnen weltweit an einem Endometriumkarzinom [10]. Eine mögliche Ursache könnten minimale Tumorresiduen in Form von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) darstellen.

Diese CTCs befinden sich vor allem in Blut- und Lymphgefäßen und bilden möglicherweise im Laufe der Erkrankung Fernmetastasen aus, welche die Prognose erheblich verschlechtern [122, 123]. Somit könnte der Nachweis jener CTCs im Blut von erkrankten Patientinnen gegebenenfalls die Voraussage einer eventuellen Metastasierung ermöglichen.

In den durchgeführten Untersuchungen ergaben sich zum Teil große Unterschiede in der Ausprägung der Expression der ausgewählten Gene. Auch die einzelnen Zelllinien zeigten ein unterschiedliches Genexpressionsmuster. Eine solche Varietät bei den Ergebnissen der verschiedenen Gene könnte die klinische Situation bei den unterschiedlichen Patientenproben mit divergierenden Tumorcharakteristiken darstellen.

Besonders die Zelllinien HEC-1-A und HEC-1B wiesen zum Teil ein sehr ähnliches Expressionsmuster der untersuchten Gene auf. Als Hintergrund dieser Beobachtung ist die gemeinsame Herkunft, mit HEC-1-B als Unterstamm von HEC-1-A, der beiden Zelllinien anzunehmen.

Im Kontrast zu den anderen fünf untersuchten Zelllinien zeigte die Ishikawa-Zellreihe ein differierendes Genexpressionsmuster auf. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte die Herkunft der Spenderin der Karzinomzellen sein. Die Ishikawa-Zelllinie wurde von einer Patientin aus Asien entnommen und kultiviert. Im Gegensatz hierzu stammen alle anderen entnommenen Zelllinien von kaukasischen Spenderinnen. Dies könnte auf eine mögliche unterschiedliche genetische Entstehungsweise des Endometriumkarzinoms auf den verschiedenen Kontinenten hinweisen, sowie auch auf potenziell differierende Umwelteinflüsse oder Risikofaktoren, die eine Karzinomentstehung initiieren.

Ein weiterer Grund könnte das junge Alter der Ishikawa-Zellen-Spenderin sein. Mit 39 Jahren kann man von einer prämenopausalen Frau ausgehen, wogegen die anderen Spenderinnen mit einer Altersspanne von 55-71 Jahren eher bereits postmenopausal waren. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Karzinomentstehung bei dieser Patientin einen anderen genetischen Hintergrund und eine damit verbundene abweichende Tumorgenese aufweist. Solch eine Annahme spiegelte sich in den Real-Time PCR Ergebnissen wider.

4.2 Markergene

Die Gene, welche die durchschnittlich höchste Expression in den untersuchten Zelllinien aufwiesen, waren CK 19 und CLDN-4. Jedoch zeigten sich bei CCNE und MAL2 auch eine deutliche Hochregulierung in den meisten Endometriumkarzinomzelllinien. Beim Mammaglobin zeigte sich als einziges Markergen keine erhöhte Expression in den durchgeführten Untersuchungen.

4.2.1 Cytokeratin 19

Cytokeratin 19 ist ein bereits etablierter Marker für epitheliale Zellen und wurde vor allem zur Diagnostik beim Mammakarzinom bereits vielfach eingesetzt [96, 97]. Aber auch bei anderen Tumorarten wurde dieses Gen bereits als potenzieller Marker identifiziert. Beim Endometriumkarzinom konnte dieses Markergen sogar bereits zur Detektion von Lymphknotenmetastasen verwendet werden [99, 155].

Die Ergebnisse der Real-Time PCR, die eine hohe Genexpression in allen sechs Zelllinien aufweist, zeigt dass CK 19 als möglicher geeigneter Marker zur Detektion von CTCs beim Endometriumkarzinom herangezogen werden kann.

4.2.2 Claudin 4 (CLDN-4)

Ebenso zeigte sich durch das Expressionsmuster von Claudin-4, dass jenes Gen einen geeigneten Marker für die Diagnostik und zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen darstellt. Es zeigte sich eine Hochregulation in allen Zelllinienreihen. Möglicherweise kommt es bei Hochexpression dieses Gens zur Veränderung der tight-junctions-Formationen und somit zu einer Morphologiestörung, die eine Tumorentstehung begünstigen könnte. Auch bei der myometrialen Ausbreitung des Karzinoms konnte bei Untersuchungen eine positive Korrelation festgestellt werden [103]. Dies sind Indizien dafür, dass dieses Gen sich als potenzieller Genmarker für weitere Forschung eignen könnte. CLDN-4 wurde bereits zuvor mehrfach als Biomarker im Rahmen der Tumordiagnostik beim Endometriumkarzinom untersucht [104, 105].

4.2.3 Cyclin E und MAL2

CCNE und MAL2 wiesen ebenfalls eine insgesamt erhöhte Genexpression in fast allen sechs Endometriumkarzinomzelllinien, mit Ausnahme von AN3-CA, auf. Bereits durchgeführte Untersuchungen zeigten eine Assoziation von Cyclin E mit der Karzinogenese und dem Krankheitsverlauf beim endometrioiden Adenokarzinom [112, 113]. Auch weitere Gene der Cyclin-Familie, zum Beispiel Cyclin A, konnten bereits als potenzielle Marker identifiziert werden [156]. Dies zeigt nochmal das Potenzial auf, dass die verschiedenen Gene, welche in der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen und somit als Genmarker möglicherweise geeignet wären [106]. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich wären hier bestimmt förderlich.

Das Gen MAL2 konnte bereits bei einer Studie zu CTCs bei gynäkologischen Tumorerkrankungen als diagnostischer Marker festgestellt werden [115]. Die Ergebnisse der Real-Time PCR Methode konnten diese Feststellung und den

Zusammenhang mit einem Endometriumkarzinom möglicherweise weiter bestärken.

4.2.4 Mammaglobin (MGL)

Das Gen Mammaglobin (MGL) konnte leider in keiner der Zelllinien mit erhöhter Expression nachgewiesen werden.

Jedoch konnte bereits in einer Studie zu gynäkologischen Tumoren in 57% der Fälle MGL als exprimiertes Gen beim endometrioiden Adenokarzinom mithilfe einer Immunhistochemischen Färbung von Tumorpräparaten festgestellt werden [115].

Eine mögliche Ursache für die fehlende Expression könnte also eine frühe Degradierung der MGL-mRNA bei der Umschreibung zur cDNA darstellen. Hierdurch konnte bei der Real-Time PCR keine genügende DNA Menge detektiert werden und es ergab sich somit keine Hochregulierung von MGL. Dies weist auf eine mögliche Limitierung der Methode hin und könnte vielleicht durch die Verwendung von RNA von Genen mit längerer Halbwertszeit umgangen werden. Hierdurch wäre eine bessere Detektierung möglich.

Ein weiterer Grund könnte laut durchgeführten Untersuchungen einer Studie sein, dass nicht wie angenommen eine Überexpression, sondern eine niedrige Expression oder sogenannte Downregulierung von Mammaglobin mit einem höheren Tumorgrading korreliert [157].

4.3 Real-Time PCR als Methode zur Detektierung von CTCs

Die Real-Time PCR könnte eine gute und kostengünstige Methode zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen darstellen. Die Herausforderung besteht darin ein geeignetes Set an Markergenen für den Nachweis der CTCs zu finden. In den Experimenten dieser Arbeit konnten bereits 4 Gene als mögliche Biomarker für weitere Untersuchungen eruiert werden.

Allen voran könnten sich CK19 und CLDN-4 als potenzielle Markergene zur Detektion von CTCs beim Endometriumkarzinom durchsetzen. Die niedrige

Expression von MGL ist womöglich ein Hinweis auf die eventuelle Limitation der Methodik bei manchen Markergenen, möglicherweise aufgrund einer kurzen Halbwertszeit der extrahierten mRNA. Hier könnten weitere unterstützende Untersuchungstechniken Klarheit über die Expression von, zum Beispiel MGL, schaffen.

Ein möglicher Ansatz könnte die Kombination mit einem standardisierten Verfahren, zum Beispiel mit einem von der FDA zugelassenen Methode, das CellSearch® System, sein [138].

4.4 Implikation für weiterführende Forschung

Anhand der erlangten positiven Ergebnisse mit Hilfe der Real-Time PCR und dem Nachweis einer hohen Expression einiger Markergene stellt diese Methode eine gute Möglichkeit zur Detektion von zirkulieren Tumorzellen und auch weiteren Markergenen dar. Vor allem CK 19 und Claudin 4 konnten sich bei den durchgeführten Untersuchungen als potenzielle Marker positiv hervorheben und im Hinblick auf das Generieren eines Sets an Markergenen von großem Interesse sein. Aber auch CCNE und MAL2 zeigten ein erhöhtes Expressionsmuster und könnten sich für die Detektion von CTCs als hilfreich erweisen.

Von zusätzlichem Interesse im Rahmen weiterführender Forschung könnte zum Beispiel die Expression der Östrogenrezeptoren ER α , ER β 1 und ER β 2 sein. Diese Rezeptoren zeigten bereits in einer Studie einen möglichen Zusammenhang mit der Tumorgenese und Prognose eines Endometriumkarzinoms vom endometrioiden Typ [158].

Auch weitere Gene der Cytokeratin-Familie könnten potenzielle Marker zur Diagnostik von CTCs darstellen. Bereits beim Mammakarzinom dienten zum Beispiel CK 8 und CK 18 als mögliche Nachweise von minimalen Tumorresiduen im Blut [159]. Für zukünftige Forschung wäre es von Interesse ein breiteres Spektrum an Markergenen zu identifizieren, um so einen effektiveren Nachweis der CTCs zu ermöglichen. Insbesondere wäre der Nachweis weitere Gene essenziell, um ein repräsentatives heterogenes Set an Markergenen zu entwickeln.

Als weiterer Untersuchungsschritt sollten die exprimierten Markergene bei Karzinompatientinnen, die zum Beispiel bereits eine Operation als Primärtherapie erhalten haben, im Blut getestet werden. Diese Methode konnte bereits bei Frauen mit einem Mammakarzinom nach adjuvanter Therapie angewendet werden [160]. Hiermit wäre es möglich vorhandene zirkulierende Tumorzellen frühzeitig zu detektieren und die entsprechende Therapie zur Begrenzung einer Ausdehnung der Tumorerkrankung und zur Reduktion einer Metastasenbildung einzuleiten.

Ein erwägenswerter Therapieansatz wäre zum Beispiel eine systemische Therapie in Rahmen einer Chemotherapie oder einer targeted-Therapie in Form von Antikörpern nach abgeschlossener operativer Entfernung des Karzinoms.

4.5 Fazit

Die hier angewandte Real-Time PCR kann sich zukünftig als eine Methode zur Detektion von minimalen Tumorresiduen in Form von zirkulierenden Tumorzellen etablieren. Als positive Aspekte der Real-Time PCR lassen sich besonders hervorheben, dass die Methode kostengünstiger ist im Vergleich zu den bisher eingesetzten Systemen, zum Beispiel dem „CellSearch® System“ von der Firma Veridex LLC. Weiterhin kann eine Real-Time PCR in einem relativ überschaubaren kurzen Zeitraum in fast jedem klinischen Labor unter Normalbedingungen durchgeführt werden. Dies könnte somit eine breite Verwendung der Methodik zum Nachweis der CTCs ermöglichen.

Im Vordergrund der Untersuchungen steht zurzeit noch das Generieren eines geeigneten Sets an Markergenen, welche zuverlässig das Detektieren von zirkulierenden Tumorzellen ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten bereits zwei potenzielle Markergene (CK19 und CLN-4) hervorbringen und stellen somit einen guten Ausgangspunkt für weiterführende Forschung dar.

Die bei den Untersuchungen verwendete Negativkontrolle wurde aus Gewebeproben von gesunden prämenopausalen Frauen im Rahmen einer Fertilitätsdiagnostik verwendet. Jedoch entstehen die meisten Endometriumkarzinome postmenopausal. Somit hätten sich Gewebeproben von

postmenopausalen Frauen noch besser geeignet. Auch konnten nicht ausreichend glanduläre Zellen isoliert werden, wodurch auf stromale Zellen zurückgegriffen wurde. Das endometrioides Adenokarzinom ist jedoch ein Tumor epithelialen Ursprung, somit wäre dies auch noch ein weiterer Ansatzpunkt zur Verbesserung der Methodik, um ein geeignetes Set an Markergenen zu generieren. Man sollte hier nochmal versuchen eine Negativkontrolle mittels epitheliale Drüsengewebe zu gewinnen und die Ergebnisse dann miteinander vergleichen.

Weiterhin gilt es festzustellen in welcher Relation die erhöhte Expression eines Markergens zu der Anzahl an vorhandenen Tumorzellen im Blut steht. Dieser methodische Ansatz wurde bereits mit Blutproben bei adjuvanten Mammakarzinompatientinnen durchgeführt und könnte als Leitfaden für die weiteren Untersuchungen dienen [159].

Falls die Real-Time PCR Methode Einsatz im klinischen Bereich findet, müsste eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden, sowie eine entsprechende Konsequenz aus den erlangten Untersuchungen gezogen werden. Ob beispielsweise bei detektierten minimalen Tumorresiduen eine weiterführende Therapie mit einer Chemo- oder Antikörpertherapie den Patientinnen einen Vorteil in der Form von verlängerter Überlebenszeit oder länger erhaltener Lebensqualität erbringen würde. Ebenso bedarf es einer Anpassung der bisher bestehenden Therapieleitlinien bei positivem Nachweis von CTCs im Blut. Denn bislang gibt es noch keinen eindeutigen Therapiekonsens bei Patientinnen mit nachgewiesenen CTCs beim Endometriumkarzinom.

5. Zusammenfassung

Das Endometriumkarzinom zählt mit 10.870, vom Robert Koch-Institut im Jahr 2013 in Deutschland registrierten, Neuerkrankungen zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen der Frau. Trotz der nicht selten besseren Prognose als bei anderen Tumorentitäten sterben dennoch weltweit jährlich circa 42.000 Patientinnen an den Folgen eines Endometriumkarzinoms.

Ein möglicher Grund hierfür könnte, ungeachtet einer erfolgreich durchgeführten operativen Primärtherapie, die Bildung von Fernmetastasen im Verlauf der Erkrankung sein.

Eine der gängigen Theorien zur Metastasenbildung geht davon aus, dass sich bereits früh einzelne Zellen vom Primärtumor ablösen und als sogenannte zirkulierende Tumorzellen (CTCs) ins Blut- und Lymphsystem gelangen. Die CTCs wiederum haben die Fähigkeit sich an anderen Stellen des menschlichen Organismus festzusetzen und ebendort zur Bildung von Fernmetastasen führen.

In der vorliegenden Dissertation wurden unterschiedliche Markergene mithilfe einer TaqMan® Real-Time PCR am Zellmodell untersucht. Es wurden Markergene ausgewählt, die bereits in der Literatur und in verschiedenen Untersuchungen mit dem Endometriumkarzinom in Verbindung gebracht wurden.

Die verwendeten Zelllinien (AN3CA, HEC-1-A, HEC-1-B, Ishikawa, KLE und RL-95-2), als Modellsystem dienend, sind durchweg Karzinomzelllinien vom endometrioiden Typ. Dieses Typ I – Endometriumkarzinom stellt mit 80% die häufigste Manifestation dar. Die untersuchte Genexpression der verschiedenen Markergene soll die erste Grundlage zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen beim Endometriumkarzinom im Blut darstellen.

Hierfür wurden fünf verschiedenen Markergene in sechs unterschiedlichen Zelllinien mittels der Real-Time PCR Methode untersucht. Um aussagekräftige Ergebnisse zur Expression von Cyclin E (CCNE), Myelin and lymphocyte Protein 2 (MAL2), Mammaglobin (MGL), Cytokeratin 19 (CK19) und Claudin-4 (CLDN-4) zu erhalten, wurde zuerst RNA aus allen Karzinomzelllinien isoliert und im nächsten Schritt in cDNA, mittels Reverser Transkriptase, umgeschrieben.

Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle, mit pathologisch unauffälligem Endometriumgewebe von gesunden Patientinnen entnommen, generiert.

Daraufhin wurde eine Real-Time PCR mithilfe von TaqMan® Primern zur Ermittlung der Genexpression durchgeführt. Die Real-Time Polymerasekettenreaktion (Real-Time PCR) diente als Methode zur Quantifizierung der relativen Menge eines zuvor umgeschriebenen cDNA-Abschnittes. Als Kontroll- und Referenzgen wurde hierzu 18S verwendet.

Vor allem CK19 und CLDN-4 wiesen eine stark erhöhte Expression bei fast allen Zelllinien auf und könnten sich als wichtige Markergene zum Nachweis von CTCs durchsetzen. Auch CCNE und MAL2 zeigten eine Hochregulierung im Vergleich zur Negativkontrolle und würden ebenfalls potenzielle Markergene für die Detektion beim Endometriumkarzinom darstellen. Vorzugsweise sollte ein Set aus verschiedenen Markergenen zum sicheren und zuverlässigen Nachweis von CTCs mithilfe der Real-Time PCR generiert werden.

Es sollten in Zukunft noch weitere Markergene, zum Beispiel die Östrogenrezeptoren ER α , ER β 1 und ER β 2 oder weitere Gene der Cytokeratin-Familie, untersucht und die Expression jener beim Endometriumkarzinom ermittelt werden.

Die Real-Time PCR stellt somit eine kostengünstige und sensitive Methode zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen dar und könnte in Zukunft Anwendung im klinischen Alltag finden. Hierdurch könnte eine beginnende Metastasierung oder Bildung eines Rezidivs frühzeitig durch eine Blutentnahme im Rahmen der Nachsorge erkannt werden. Ebenso gilt es im Verlauf die Therapieleitlinien gemäß der in der Untersuchung ermittelten Ergebnisse anzupassen. Beim Nachweis von CTCs im Blut in der Nachsorge der erkrankten Frauen könnte eine systemische Therapie, als kombinierte Radiochemotherapie oder auch Antikörpertherapie, die Formierung von Metastasen verhindern und somit das Outcome erheblich verbessern.

Der nächste Schritt wird nun die Feststellung weiterer verwendbarer Markergene mittels der Real-Time PCR Methode im Modellsystem sein, um ein geeignetes Set zur Detektion von CTCs zu ermitteln. Hiermit soll anschließend der Nachweis jener Markergene, mit Testung verschiedener Kombinationen, im Blutmaterial der an Endometriumkarzinom erkrankten Patientinnen erfolgen.

6. Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex
BMI	Body Mass Index
CCNE	Cycline E
cdk2	cyclin-dependent Kinase 2
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Cytokeratin
CLDN	Claudin
CTC	zirkulierende Tumorzellen
CT-Wert	cycle treshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTC	disseminierte Tumorzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EIN	Endometriale intraepitheliale Neoplasie
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FIGO	Federation of Gynecology and Obstetrics
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GeKiD	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor

MAL	Myelin and lymphocyte protein
mdm2	Mouse double minute 2 homolog (Protoonkogen)
MgCl	Magnesiumchlorid
MGL	Mammaglobulin
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PMB	Postmenopausale Blutung
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RKI	Robert Koch - Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RQ-Wert	Relative Quantification – Wert
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

7. Quellenverzeichnis

1. Barnes, B. and K. Kraywinkel, *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2017.
2. Barnes, Benjamin, et al. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016.
3. Schmidt, D. and L. Kiesel, *Neues zur Epidemiologie und Ätiologie des Endometriumkarzinoms*. *Der Onkologe*, 2012. **18**(10): p. 844-852.
4. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., *Fallzahlen 2011*, www.gekid.de, [abgerufen am 27.4.2015]
5. Kurzeder, C., G. Sauer, and R. Kreienberg, *Epidemiologie des Endometriumkarzinoms*. *Der Gynäkologe*, 2007. **40**(1): p. 10-13.
6. Purdie, D.M. and A.C. Green, *Epidemiology of endometrial cancer*. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2001. **15**(3): p. 341-354.
7. Amant, F., et al., *Endometrial cancer*. *Lancet*, 2005. **366**(9484): p. 491-505.
8. Weyerstahl, T. and M. Stauber, *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2013: Georg Thieme Verlag.
9. Fleisch, M.C. and H.G. Bender, *Epidemiologie des Endometriumkarzinoms*. *Der Onkologe*, 2003. **9**(11): p. 1195-1201.
10. Engelhard, K., *Endometriumkarzinom*. *Der Radiologe*, 2011. **51**(7): p. 596-601.
11. Setiawan, V.W., et al., *Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors?* *J Clin Oncol*, 2013. **31**(20): p. 2607-18.
12. Yang, H.P., et al., *Endometrial Cancer Risk Factors by 2 Main Histologic Subtypes The NIH-AARP Diet and Health Study*. *American journal of epidemiology*, 2013. **177**(2): p. 142-151.
13. Sherman, M.E., et al., *Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas*. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 1997. **10**(10): p. 963-968.
14. Ali, A.T., *Risk factors for endometrial cancer*. *Ceska Gynekol*, 2013. **78**(5): p. 448-59.
15. Barrow, E., J. Hill, and D.G. Evans, *Cancer risk in Lynch Syndrome*. *Fam Cancer*, 2013. **12**(2): p. 229-40.
16. Tafe, L.J., E.R. Riggs, and G.J. Tsongalis, *Lynch syndrome presenting as endometrial cancer*. *Clin Chem*, 2014. **60**(1): p. 111-21.

17. Wang, Y., et al., *Lynch syndrome related endometrial cancer: clinical significance beyond the endometrium*. J Hematol Oncol, 2013. **6**: p. 22.
18. Friberg, E., et al., *Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis*. Diabetologia, 2007. **50**(7): p. 1365-1374.
19. Austin, H., et al., *Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution*. Cancer Res, 1991. **51**(2): p. 568-72.
20. Key, T.J. and M.C. Pike, *The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk*. Br J Cancer, 1988. **57**(2): p. 205-12.
21. Harris, H.R. and K.L. Terry, *Polycystic ovary syndrome and risk of endometrial, ovarian, and breast cancer: a systematic review*. Fertil Res Pract, 2016. **2**: p. 14.
22. Barry, J.A., M.M. Azizia, and P.J. Hardiman, *Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(5): p. 748-58.
23. Chittenden, B.G., et al., *Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review*. Reprod Biomed Online, 2009. **19**(3): p. 398-405.
24. Haoula, Z., M. Salman, and W. Atiomo, *Evaluating the association between endometrial cancer and polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod, 2012. **27**(5): p. 1327-31.
25. Crosbie, E.J., et al., *Body mass index, hormone replacement therapy, and endometrial cancer risk: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(12): p. 3119-30.
26. Cancer, I.A.f.R.o., *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Supplement 7*. Lyon (France): IARC, 1987: p. 280-285.
27. Agency, I., *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, vol. 72: Hormonal contraception and postmenopausal hormone therapy*. Lyon (France): IARC, 1999: p. 474-530.
28. Liehr, J.G., *Is Estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen?1*. Endocrine Reviews, 2000. **21**(1): p. 40-54.
29. Zaino, R., et al. "Tumours of the uterine corpus: epithelial tumours and precursors." *WHO classification of tumours of female reproductive organs* (2014): 125-126.
30. Horn, L-C., et al. "Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment." *International Journal of Gynecologic Cancer* 14.2 (2004): 348-353.

31. Baak, J. P. A., et al. "Assessment of the risk on endometrial cancer in hyperplasia, by means of morphological and morphometrical features." *Pathology-Research and Practice* 188.7 (1992): 856-859.
32. Kurman, R.J., P.F. Kaminski, and H.J. Norris, *The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients.* *Cancer*, 1985. **56**(2): p. 403-12.
33. Ambros, R.A., et al., *Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation.* *Hum Pathol*, 1995. **26**(11): p. 1260-7.
34. Clark, T.J., D. Neelakantan, and J.K. Gupta, *The management of endometrial hyperplasia: an evaluation of current practice.* *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006. **125**(2): p. 259-64.
35. Trimble, C.L., et al., *Management of endometrial precancers.* *Obstet Gynecol*, 2012. **120**(5): p. 1160-75.
36. Epplein, M., et al., *Endometrial hyperplasia risk in relation to recent use of oral contraceptives and hormone therapy.* *Ann Epidemiol*, 2009. **19**(1): p. 1-7.
37. Emarh, M., *Cyclic versus continuous medroxyprogesterone acetate for treatment of endometrial hyperplasia without atypia: a 2-year observational study.* *Arch Gynecol Obstet*, 2015. **292**(6): p. 1339-43.
38. Sherman, M.E., *Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach.* *Mod Pathol*, 2000. **13**(3): p. 295-308.
39. Matias-Guiu, X., et al., *Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma.* *Hum Pathol*, 2001. **32**(6): p. 569-77.
40. Banno, K., et al., *Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics.* *J Obstet Gynaecol Res*, 2014. **40**(8): p. 1957-67.
41. Risinger, J.I., et al., *PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers.* *Cancer Res*, 1997. **57**(21): p. 4736-8.
42. Xiong, J., et al., *The clinical significance of K-ras mutation in endometrial "surface epithelial changes" and their associated endometrial adenocarcinoma.* *Gynecol Oncol*, 2016. **142**(1): p. 163-168.
43. Caduff, R.F., et al., *Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma.* *The American Journal of Pathology*, 1996. **148**(5): p. 1671-1678.
44. Huang, H.N., et al., *Ovarian and endometrial endometrioid adenocarcinomas have distinct profiles of microsatellite instability, PTEN expression, and ARID1A expression.* *Histopathology*, 2015. **66**(4): p. 517-28.

45. Eto, T., et al., *Modal variety of microsatellite instability in human endometrial carcinomas*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(2): p. 353-63.
46. Lee, Kyu Eun, et al. "*Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer.*" Japanese journal of clinical oncology **33**(4), 2003: p. 173-179.
47. Konstantinos, K., et al., *Expression of p53 in imprint smears of endometrial carcinoma*. Diagn Cytopathol, 2014. **42**(5): p. 416-22.
48. Albitar, L., et al., *Consequences of the loss of p53, RB1, and PTEN: relationship to gefitinib resistance in endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2007. **106**(1): p. 94-104.
49. Kurman, Robert J., et al. *WHO classification of tumours of female reproductive organs*. IARC, 2014.
50. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): *Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom*, Langversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 032/034-OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom/>
51. Kelly, M.G., et al., *Type 2 Endometrial Cancer is Associated With a High Density of Tumor-Associated Macrophages in the Stromal Compartment*. Reprod Sci, 2015. **22**(8): p. 948-53.
52. Amant, F., M.R. Mirza, and C.L. Creutzberg, *Cancer of the corpus uteri*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2012. **119**, **Supplement 2**: p. S110-S117.
53. Shepherd, J.H., *Revised FIGO staging for gynaecological cancer*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 1989. **96**(8): p. 889-892.
54. Breijer, M.C., et al., *Diagnostic strategies for postmenopausal bleeding*. Obstet Gynecol Int, 2010. **2010**: p. 850812.
55. Clark, T.J., et al., *Investigating postmenopausal bleeding for endometrial cancer: cost-effectiveness of initial diagnostic strategies*. Bjog, 2006. **113**(5): p. 502-10.
56. Gredmark, T., et al., *Histopathological findings in women with postmenopausal bleeding*. Br J Obstet Gynaecol, 1995. **102**(2): p. 133-6.
57. Lidor, A., et al., *Histopathological findings in 226 women with post-menopausal uterine bleeding*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1986. **65**(1): p. 41-3.
58. Tiffen, J.M. and S.M. Mahon, *Educating women regarding the early detection of endometrial cancer--what is the evidence?* Clin J Oncol Nurs, 2006. **10**(1): p. 102-4.

59. Salman, M.C., et al., *Role of postmenopausal bleeding pattern and women's age in the prediction of endometrial cancer*. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2013. **53**(5): p. 484-8.
60. Goldstein, R.B., et al., *Evaluation of the woman with postmenopausal bleeding: Society of Radiologists in Ultrasound-Sponsored Consensus Conference statement*. J Ultrasound Med, 2001. **20**(10): p. 1025-36.
61. Gull, B., et al., *Transvaginal ultrasonography of the endometrium in women with postmenopausal bleeding: is it always necessary to perform an endometrial biopsy?* Am J Obstet Gynecol, 2000. **182**(3): p. 509-15.
62. van Hanegem, N., et al., *The accuracy of endometrial sampling in women with postmenopausal bleeding: a systematic review and meta-analysis*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2016. **197**: p. 147-155.
63. Clark, T.J., et al., *Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia: a systematic quantitative review*. Jama, 2002. **288**(13): p. 1610-21.
64. Morice, P., et al., *Endometrial cancer*. The Lancet. **387**(10023): p. 1094-1108.
65. Binder, P.S. and D.G. Mutch, *Update on prognostic markers for endometrial cancer*. Womens Health (Lond), 2014. **10**(3): p. 277-88.
66. Zaino, R.J., et al., *Pathologic models to predict outcome for women with endometrial adenocarcinoma: the importance of the distinction between surgical stage and clinical stage--a Gynecologic Oncology Group study*. Cancer, 1996. **77**(6): p. 1115-21.
67. Lurain, J.R., et al., *Prognostic factors associated with recurrence in clinical stage I adenocarcinoma of the endometrium*. Obstet Gynecol, 1991. **78**(1): p. 63-9.
68. Han, K.H., et al., *Prognostic factors for tumor recurrence in endometrioid endometrial cancer stages IA and IB*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(21): p. e6976.
69. Lee, B., et al., *Influence of positive peritoneal cytology on prognostic factors and survival in early-stage endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis*. Jpn J Clin Oncol, 2016. **46**(8): p. 711-7.
70. Creasman, W.T., et al., *Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A gynecologic oncology group study*. Cancer, 1987. **60**(8 Suppl): p. 2035-41.
71. Morrow, C.P., et al., *Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecologic oncology, 1991. **40**(1): p. 55-65.

72. Kalogiannidis, I., et al., *HER-2/neu is an independent prognostic factor in type I endometrial adenocarcinoma*. Arch Gynecol Obstet, 2014. **290**(6): p. 1231-7.
73. Janda, M., et al., *Quality of life after total laparoscopic hysterectomy versus total abdominal hysterectomy for stage I endometrial cancer (LACE): a randomised trial*. The Lancet Oncology, 2010. **11**(8): p. 772-780.
74. Lu, Q., et al., *Comparison of laparoscopy and laparotomy for management of endometrial carcinoma: a prospective randomized study with 11-year experience*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(11): p. 1853-9.
75. Lumsden, M.A., et al., *A randomised comparison and economic evaluation of laparoscopic-assisted hysterectomy and abdominal hysterectomy*. Bjog, 2000. **107**(11): p. 1386-91.
76. Todo, Y., et al., *Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis*. The Lancet, 2010. **375**(9721): p. 1165-1172.
77. AGO, D., D. Diagnostik, and T. des Endometriumkarzinoms, *Interdisziplinäre S2-Leitlinie*. AWMF. **32**: p. 034.
78. Hehr, T., et al., *Strahlentherapie des Endometriumkarzinom*. Der Onkologe, 2003. **9**(11): p. 1227-1233.
79. Knocke, T.H., et al., *Primary treatment of endometrial carcinoma with high-dose-rate brachytherapy: results of 12 years of experience with 280 patients*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. **37**(2): p. 359-65.
80. Poulsen, H.K., et al., *[Patients with early stages of endometrial cancer should be spared adjuvant radiotherapy. Danish Endometrial Cancer Group]*. Ugeskrift for laeger, 1997. **159**(22): p. 3403-3407.
81. Bie, Y., Z. Zhang, and X. Wang, *Adjuvant chemo-radiotherapy in the "sandwich" method for high risk endometrial cancer--a review of literature*. BMC Womens Health, 2015. **15**: p. 50.
82. Galaal, K., et al., *Adjuvant chemotherapy for advanced endometrial cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(5): p. Cd010681.
83. Tirmazy, S.H., et al., *Chemotherapy for advanced endometrial cancer with carboplatin and epirubicin*. Anticancer Res, 2014. **34**(7): p. 3793-8.
84. Randall, M.E., et al., *Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 2006. **24**(1): p. 36-44.

85. Simpkins, F., et al., *A phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced and recurrent endometrial carcinoma (EMCA)*. *Gynecol Oncol*, 2015. **136**(2): p. 240-5.
86. Aghajanian, C., et al., *Phase II trial of bevacizumab in recurrent or persistent endometrial cancer: a Gynecologic Oncology Group study*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(16): p. 2259-65.
87. Bregar, A., K. Robison, and D.S. Dizon, *Update on the chemotherapeutic management of endometrial cancer*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2014. **12**(10): p. 659-65.
88. Dizon, D.S., *Treatment options for advanced endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2010. **117**(2): p. 373-81.
89. Diver, E.J., et al., *The Therapeutic Challenge of Targeting HER2 in Endometrial Cancer*. *Oncologist*, 2015. **20**(9): p. 1058-68.
90. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2015, 23. Auflage*. 2015
91. Park, J.Y. and J.H. Nam, *Progestins in the fertility-sparing treatment and retreatment of patients with primary and recurrent endometrial cancer*. *Oncologist*, 2015. **20**(3): p. 270-8.
92. Tangjitgamol, S., S. Manusirivithaya, and J. Hanprasertpong, *Fertility-sparing in endometrial cancer*. *Gynecol Obstet Invest*, 2009. **67**(4): p. 250-68.
93. Gallup, D.G. and R.J. Stock, *Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger*. *Obstet Gynecol*, 1984. **64**(3): p. 417-20.
94. Thigpen, J.T., et al., *Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a dose-response study by the Gynecologic Oncology Group*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(6): p. 1736-44.
95. Horton, H.R., et al., *Biochemie 4. Auflage*. 2008: Pearson Studium.
96. Tryfonidis, K., et al., *Detection of circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the blood and the mitotic index of the primary tumor have independent prognostic value in early breast cancer*. *Clin Breast Cancer*, 2014. **14**(6): p. 442-50.
97. Datta, Y.H., et al., *Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction*. *J Clin Oncol*, 1994. **12**(3): p. 475-82.
98. Noack, F., et al., *A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications*. *Int J Biol Markers*, 2000. **15**(1): p. 100-4.

99. Nagai, T., et al., *A new diagnostic method for rapid detection of lymph node metastases using a one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in endometrial cancer.* *Ann Surg Oncol*, 2015. **22**(3): p. 980-6.
100. Konecny, G.E., et al., *Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear-cell, and endometrioid endometrial cancer.* *Gynecol Oncol*, 2008. **109**(2): p. 263-9.
101. Turksen, Kursad, and Tammy-Claire Troy. "Barriers built on claudins." *Journal of cell science* 117.12 (2004): 2435-2447.
102. Schneeberger, Eveline E., and Robert D. Lynch. "The tight junction: a multifunctional complex." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286.6 (2004): C1213-C1228.
103. Pan, X. Y., et al. "Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue." *International Journal of Gynecologic Cancer* 17.1 (2007): 233-241.
104. Pan, X.Y., et al., *Study of claudin-4 in the diagnosis and treatment of endometrial carcinoma.* *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2013. **48**(10): p. 768-71.
105. Jin, Y., et al., *Regulation of claudin-4 gene expression in endometrial adenocarcinoma Ishikawa cell line by progesterone.* *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2012. **47**(5): p. 368-72.
106. Galderisi, U., F.P. Jori, and A. Giordano, *Cell cycle regulation and neural differentiation.* *Oncogene*, 2003. **22**(33): p. 5208-19.
107. Harashima, Hirofumi, Nico Dissmeyer, and Arp Schnittger. "Cell cycle control across the eukaryotic kingdom." *Trends in cell biology* 23.7 (2013): 345-356.
108. Malumbres, Marcos, and Mariano Barbacid. "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." *Nature reviews cancer* 9.3 (2009): 153.
109. Gao, Sheng, Jing-Jing Ma, and Cheng Lu. "Prognostic value of cyclin E expression in breast cancer: a meta-analysis." *Tumor Biology* 34.6 (2013): 3423-3430
110. Nam, E. J., and YoungTae Kim. "Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer." *International Journal of Gynecologic Cancer* 18.6 (2008): 1169-1182.
111. Huang, Li-nian, et al. "Meta-analysis for cyclin E in lung cancer survival." *Clinica Chimica Acta* 413.7-8 (2012): 663-668.
112. O'Hara, A.J. and D.W. Bell, *The genomics and genetics of endometrial cancer.* *Adv Genomics Genet*, 2012. **2012**(2): p. 33-47.

113. Kato, N., et al., *Immunohistochemical expression of cyclin E in endometrial adenocarcinoma (endometrioid type) and its clinicopathological significance*. *Cancer Res Clin Oncol*, 2003. **129**(4): p. 222-6.
114. Eguchi, Daiki, et al. "MAL2 expression predicts distant metastasis and short survival in pancreatic cancer." *Surgery* 154.3 (2013): 573-582.
115. Obermayr, E., et al., *Assessment of a six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 666.
116. Byrne, Jennifer A., et al. "MAL2 and tumor protein D52 (TPD52) are frequently overexpressed in ovarian carcinoma, but differentially associated with histological subtype and patient outcome." *BMC cancer* 10.1 (2010): 497.
117. Shrout, J., et al. " β 2 microglobulin mRNA expression levels are prognostic for lymph node metastasis in colorectal cancer patients." *British journal of cancer* 98.12 (2008): 1999.
118. Watson, Mark A., and Timothy P. Fleming. "Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer." *Cancer research* 56.4 (1996): 860-865.
119. Ni, Jian, et al. "All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12. 2 and form a dense cluster." *Annals of the New York Academy of Sciences* 923.1 (2000): 25-42.
120. Hagemann, I.S., J.D. Pfeifer, and D. Cao, *Mammaglobin expression in gynecologic adenocarcinomas*. *Hum Pathol*, 2013. **44**(4): p. 628-35.
121. Classen-Linke, Irmgard, et al. "Mammaglobin 1: not only a breast-specific and tumour-specific marker, but also a hormone-responsive endometrial protein." *Histopathology* 61.5 (2012): 955-965.
122. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(6): p. 448-456.
123. Franken, B., et al., *Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(5): p. R133.
124. Cristofanilli, M., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. *Semin Oncol* 1, 2006. **33**(3 Suppl 9): p. S9-14.
125. Mu, Z., et al., *Detection and Characterization of Circulating Tumor Associated Cells in Metastatic Breast Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(10).
126. Josefsson, A., et al., *Circulating Tumor Cells as a Marker for Progression-free Survival in Metastatic Castration-naive Prostate Cancer*. *Prostate*, 2017. **77**(8): p. 849-858.

127. Maas, M., et al., *Circulating tumor cells and their role in prostate cancer*. Asian J Androl, 2017.
128. Cohen, S.J., et al., *Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2009. **20**(7): p. 1223-9.
129. Ligthart, S.T., et al., *Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67148.
130. Ashworth, T., *A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death*. Aust Med J., 1869. **14**: p. 146.
131. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
132. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. 1889. Cancer Metastasis Rev, 1989. **8**(2): p. 98-101.
133. Zieglschmid, V., C. Hollmann, and O. Bocher, *Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2005. **42**(2): p. 155-96.
134. Stathopoulou, A., et al., *Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: comparison of CK-19, CEA and maspin as detection markers*. Anticancer Res, 2003. **23**(2c): p. 1883-90.
135. Fehm, T., et al., *Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(3): p. 942-7.
136. Banys, M., et al., *Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow May Affect Prognosis of Patients With Gynecologic Malignancies*. International Journal of Gynecological Cancer, 2009. **19**(5): p. 948-952.
137. Ghossein, R.A., S. Bhattacharya, and J. Rosai, *Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(8): p. 1950-60.
138. Veridex LLC *CellSearch (R)*. 2015, <https://www.cellsearchctc.com> [abgerufen am 17.11.2015]
139. Bogani, G., et al., *Detection of circulating tumor cells in high-risk endometrial cancer*. Anticancer Res, 2015. **35**(2): p. 683-7.
140. Alonso-Alconada, L., et al., *Molecular profiling of circulating tumor cells links plasticity to the metastatic process in endometrial cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 223.
141. Simms, D., P.E. Cizdziel, and P. Chomczynski, *TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA*. Focus, 1993. **15**(4): p. 532-535.
142. Krug, M.S. and S.L. Berger, [33] *First-strand cDNA synthesis primed with oligo(dT)*, in *Methods in Enzymology*. 1987, Academic Press. p. 316-325.

143. Life Technologies Corporation, *Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix*. 2010,
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18080400> [abgerufen am 04.05.2016]
144. Fernandez-Shaw, S., et al., *Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres*. Hum Reprod, 1992. **7**(2): p. 156-61.
145. Zhang, L., M.C. Rees, and R. Bicknell, *The isolation and long-term culture of normal human endometrial epithelium and stroma. Expression of mRNAs for angiogenic polypeptides basally and on oestrogen and progesterone challenges*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 1)**: p. 323-31.
146. Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer, *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. Anal Biochem, 1997. **245**(2): p. 154-60.
147. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
148. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
149. Suzuki, T., P.J. Higgins, and D.R. Crawford, *Control selection for RNA quantitation*. Biotechniques, 2000. **29**(2): p. 332-7.
150. SABiosciences. *Initiierung eines Fluoreszenzsignals mit Sybr® Green*, <http://www.sabiosciences.com/sybrgreenmastermix.php>
151. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
152. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques, 2005. **39**(1): p. 75-85.
153. Thermo Fisher Scientific, *Ablauf einer TaqMan® Real-Time PCR*, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html>
154. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
155. Fanfani, Francesco, et al., *"One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA): A fast molecular test based on CK19 mRNA concentration for assessment of lymph-nodes metastases in early stage endometrial cancer."* PloS one **13**(4), 2018.

156. Shih, Hsien-Chang, et al., *"Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator."* Human pathology **34**(5), 2003: p. 471-478.
157. Supernat, Anna, et al., *"A multimarker qPCR platform for the characterisation of endometrial cancer."* Oncology reports **31**(2), 2014: p. 1003-1013.
158. Zannoni, G.F., et al., *The expression ratios of estrogen receptor alpha (ERalpha) to estrogen receptor beta1 (ERbeta1) and ERalpha to ERbeta2 identify poor clinical outcome in endometrioid endometrial cancer.* Hum Pathol, 2013. **44**(6): p. 1047-54.
159. Andergassen, U., et al., *Real-Time qPCR-Based Detection of Circulating Tumor Cells from Blood Samples of Adjuvant Breast Cancer Patients: A Preliminary Study.* Breast Care (Basel), 2016. **11**(3): p. 194-8.
160. Kolbl, A.C., et al., *New Marker Genes for Real-Time PCR-based Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients.* Anticancer Res, 2016. **36**(6): p. 3211-6.

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

8.1 Tabellen

Tab. 01: FIGO Klassifikation des Endometriumkarzinoms

Seite 13, **Quelle:** Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): *Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom*, Langversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 032/034 OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom/>

Tab. 02: Einteilung in "high-risk" und "low-risk" Endometriumkarzinom

Seite 17, **Quelle:** Bie, Y., Z. Zhang, and X. Wang, Adjuvant chemo-radiotherapy in the "sandwich" method for high risk endometrial cancer--a review of literature. *BMC Womens Health*, 2015. 15: p. 50.

Tab. 03: Humane adhärenzte Endometriumkarzinomzelllinien Teil 1

Seite 25

Tab. 04: Humane adhärenzte Endometriumkarzinomzelllinien Teil 2

Seite 26

Tab. 05: Liste der benutzten TaqMan Primer von Applied Biosystems

Seite 38

Tab. 06: Temperaturverlauf der Real-Time PCR Reaktion

Seite 38

Tab. 07: Anordnung der 96-wells Mikrotiterplatte, Real-Time PCR

Seite 39

Tab. 08: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Seite 40

Tab. 09: Auflistung der verwendeten Geräte

Seite 41

Tab. 10: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Seite 42

Tab. 11: Ergebnisse der RNA Isolierung

Seite 44

Tab. 12: Ergebnisse RNA Isolierung der Negativkontrolle

Seite 45

Tab. 13: Tabelle zur Genexpression aller untersuchten Markergene

Seite 46

8.2 Abbildungen

Abb.01: Initiierung eines Fluoreszenzsignals mit Sybr® Green

Seite 35, **Quelle:** Webseite SABiosciences //

<http://www.sabiosciences.com/sybrgreenmastermix.php>

Abb 02: Ablauf einer TaqMan® Real-Time PCR

Seite 36, **Quelle:** Website ThermoFisher Science //

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/how-taqman-assays-work.html>

Abb. 03: Expression von CCNE, MAL2, MGL, CK19 und CLDN-4

Seite 46

Abb. 04: Expression von CK19

Seite 47

Abb. 05: Expression von CLDN-4

Seite 47

Abb. 06: Expression von CCNE, MAL2 und MGL

Seite 48

Abb. 07: Expressionsmuster der RL-95-2 Zelllinie

Seite 49

Abb. 08: Expressionsmuster der HEC-1-A Zelllinie

Seite 50

Abb. 09: Expressionsmuster der HEC-1-B Zelllinie

Seite 50

Abb. 10: Expressionsmuster der Ishikawa Zelllinie

Seite 50

9. Eidesstattliche Versicherung

Lisa-Marie Victor

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Real-Time PCR Markergene beim endometrioiden Adenokarzinom

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.

Lisa-Marie Victor

München, 12.11.2019

Danksagung

Ich möchte mich zu aller erst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke für die Bereitstellung meines interessanten Arbeitsthemas und die Möglichkeit der Promotion bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen zwei tollen und immer hilfsbereiten Betreuern bedanken. Bei Ulrich Andergassen, der stets ein offenes Ohr für Fragen hatte und es mir ermöglichte meine ersten Erfahrungen auf medizinischen Kongressen zu sammeln. Bei Alexandra Kölbl, dass sie mich geduldig in die Welt der Laborarbeit eingeführt hat und auch wenn nicht immer alles gleich problemlos lief trotzdem stets hilfsbereit und engagiert war. Es war wirklich eine sehr lehrreiche und schöne Zeit bei euch im Forschungsteam.

Besonders möchte ich mich bei meinen wunderbaren Eltern bedanken. Sie haben mich das ganze Studium über, sowie auch hier bei meiner Doktorarbeit, immer mit vollem Einsatz unterstützt. Danke für alles.

Auch möchte ich meiner restlichen Familie danken, die mich stets tatkräftig unterstützt und bei jeglichen Prüfungen mitgefiebert hat.

Großer Dank gilt auch Jutta Thoman und Julia Beese, die mir nicht nur bei der Überarbeitung der Doktorarbeit geholfen haben, sondern auch so jederzeit für mich da waren und einfach wirklich Freunde sind, wie man es sich nur wünschen kann.

Abschließend möchte ich mich bei all jenen bedanken die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet haben und mich immer unterstützt haben.