

**Untersuchung von Methylierungsmarkern für den Nachweis von
Ovarialkarzinomen anhand von Bauchraumspülflüssigkeiten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Patricia Irma Herta Rothen
geboren am 07.10.1995 in Bonn

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Ingo B. Runnebaum, Jena
2. apl. Prof. Dr. med. Thomas Ernst, Jena
3. Prof. Dr. med. habil. Christoph Thomssen, Halle (Saale)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.11.2021

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	1
<i>Zusammenfassung</i>	3
<i>1. Einleitung</i>	5
1.1. Das Ovarialkarzinom	5
1.1.1. Epidemiologie, Risikofaktoren und Prognose	5
1.1.2. Prognosefaktoren, Stadieneinteilung, Symptomatik und Diagnostik	6
1.1.3. Ursprung des Tumorgewebes	9
1.1.4. Histologische Subtypen	10
1.1.5. Früherkennung des OvCa	12
1.1.6. Therapie des OvCa	14
1.2. Zellfreie Tumor-DNA und deren Relevanz für das Ovarialkarzinom	15
1.3 Epigenetik: DNA-Methylierung	18
1.3.1 DNA-Methylierung und CpG-Inseln	18
1.3.2. Tumorspezifische DNA-Methylierung	19
1.4. Biomarker für das Ovarialkarzinom	21
<i>2. Ziele der Arbeit</i>	26
<i>3. Methodik</i>	27
3.1. Materialien	27
3.1.1. Patientenproben	27
3.1.2. Chemikalien.....	27
3.1.3. Geräte.....	28
3.1.4. Kommerzielle Kits und Enzyme.....	28
3.1.5. Primerpaare für qMSP-Analysen.....	29
3.1.6. Software.....	30
3.2. Methoden	30
3.2.1. DNA-Isolierung.....	30
3.2.1.1. <i>Isolierung zellfreier DNA mittels Natriumiodid</i>	30
3.2.1.2. <i>DNA-Isolierung aus Gewebe- und Zellmaterial</i>	31
3.2.2. Messung der Nukleinsäurekonzentration.....	32
3.2.3. Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA (gDNA).....	32
3.2.4. Methylierungsanalysen zur Detektion des OvCa.....	34
3.2.4.1. <i>Kandidatensuche und Datenbankrecherche</i>	34

3.2.4.2. <i>Design methylierungsspezifischer Primerpaare</i>	35
3.2.4.3 <i>Optimierung methylierungsspezifischer Primerpaare</i>	35
3.2.4.4. <i>DNA-Methylierung zur Herstellung von Kontrollen und Standards</i>	36
3.2.4.5. <i>Quantitative methylierungsspezifische PCR</i>	37
3.2.5. Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.6 Statistische Auswertung.....	40
4. Ergebnisse	42
4.1. Etablierung und Auswahl der qMSP-Primerpaare	42
4.2. Testung zur analytischen Sensitivität und Reproduzierbarkeit	46
4.3. MSP-Primerpaare als Methylierungsmarker zum Nachweis von Ovarialkarzinomproben in cfDNA	49
4.4. Relative Quantifizierung der Methylierung in cfDNA anhand MSP-Primer	54
4.5. Vergleich der Methylierung der Marker in cfDNA, Primärtumor und Zellen der Bauchraumflüssigkeit	60
4.6. Bewertung potenzieller Einflussfaktoren der DNA-Methylierung	65
4.6.1. Patientinnenalter	65
4.6.2. FIGO-Stadium	66
4.6.3. Histologischer Subtyp.....	67
4.6.4. Zustand nach Chemotherapie und Rezidive	68
4.7. Vergleich der Methylierungsmarker mit Zytologie	70
5. Diskussion	73
5.1. Präanalytik und Bisulfit-Behandlung	73
5.1.1. Präanalytik	73
5.1.2. Bisulfit-Behandlung.....	74
5.2. Kandidatensuche	75
5.3. Etablierung der MSP-Primerpaare und qMSP	76
5.4. Reproduzierbarkeitstestung und qMSP-Analyse	78
5.5. MSP-Primerpaare als Methylierungsmarker zur Differenzierung von Ovarialkarzinomen und benignen Erkrankungen anhand von cfDNA	79
5.5.1. Sensitivität und Spezifität der Methylierungsmarker	79
5.5.2. Kombination der Methylierungsmarker mit der Zytologie.....	81
5.5.3. Relative Quantifizierung der cfDNA-Methylierung.....	82

5.5.4. Benigne Kontrollproben	83
5.5.5. Maligne Proben.....	85
5.6. Vergleich mit bekannten diagnostischen Biomarkern für das Ovarialkarzinom	86
5.7. Untersuchung der Zellpellet- und Gewebeprobe n	87
5.7.1. Vergleich von cfDNA, Zellpellet und Gewebeprobe n	87
5.7.2. Intratumorale Heterogenität.....	89
5.8. Einflussfaktoren der DNA-Methylierung	90
5.9. Zukünftige Anwendungen von „Liquid Biopsies“	91
6. Schlussfolgerungen.....	95
Literatur- und Quellenverzeichnis	97
Anhang	I
Anhang Tabellen	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Ehrenwörtliche Erklärung	VII

Abkürzungsverzeichnis

Hinweis: Bei Abkürzungen aus dem Englischen und Nichtübereinstimmung der Abkürzung mit der deutschen Definition wird erst die englische Bedeutung in kursiv, dann die deutsche Bedeutung angegeben, getrennt durch einen Gedankenstrich.

°C	Grad Celsius	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> – Desoxyribonukleinsäure
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate		
5mC	5-Methylcytosin	DNMT	DNA-Methyltransferase
Abb.	Abbildung	dsDNA	doppelstrangige DNA
Aq. dest.	<i>Aqua destillata</i> (lat.) – destilliertes Wasser	dt.	Deutsch
Abs.	Abschnitt	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Absiedl.	Absiedlung	engl.	Englisch
bp	Basenpaare	et al.	et alii
BRCA	<i>breast cancer</i> – Brustkrebs, in Bezug auf das BRCA-Gen	Erk.	Erkrankung
BS-DNA	Bisulfit-DNA	evtl.	eventuell
bzw.	beziehungsweise	FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> – Int. Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde
C	Cytosin	Fs.	Fortsetzung
Ca	<i>carcinoma</i> – Karzinom	g	Gramm
ca.	circa	gDNA	genomische DNA
CA125	<i>cancer antigen 125</i> – Krebs- Antigen 125	ggü.	gegenüber
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i> – carcinoembryonales Antigen	H ₂ O	Wasser
cfDNA	<i>cell-free DNA</i> – zellfreie DNA	HBOC	hereditäres Brust- Ovarialkarzinom-Syndrom
CNV	<i>copy number variation</i> – Kopienzahlvariation	HCl	Hydrogenchlorid
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid	HE	Hämatoxylin-Eosin
Ct	<i>cycle threshold</i> – Schwellenwertzyklus	HE4	humanes Epididymis-Protein 4
ctDNA	<i>circulating tumor DNA</i> – zirkulierende Tumor-DNA	HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> – hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
CV	<i>coefficient of variation</i> – Variationskoeffizient	i.d.R.	in der Regel
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	IGF-II	<i>Insulin-like growth factor 2</i> – Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2
d.h.	das heißt	KI	Konfidenzintervall

l	Liter	rpm	<i>revolutions per minute</i> –
M	molar		Umdrehungen je Minute
max.	maximal	RT	Raumtemperatur
MBD-Protein	Methyl-CpG-Bindedomäne-Protein	S.	Seite
mg	Milligramm	SAM	S-Adenosylmethionin
mind.	mindestens	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> – Natriumdodecylsulfat
ml	Milliliter	SEN	Sensitivität
mm	Millimeter	SLE	systemischer Lupus erythematoses
mM	Millimolar	sog.	sogenannt
MMS	multimodales Screening	SPE	Spezifität
MSP	methylierungsspezifische PCR	T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur o. Hybridisierungstemperatur
MW	Mittelwert	Tab.	Tabelle
ng	Nanogramm	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
nm	Nanometer	T _m	Schmelztemperatur
nmol	Nanomol	TNM	Tumor-(<i>Nodes</i>)Lymphknoten- Metastasen-Klassifikation
OP	Operation	TVU	transvaginaler Ultraschall
OR	Odds-Ratio	U	Enzymeinheit
OvCa	ovarian cancer – Ovarialkarzinom	µg	Mikrogramm
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase	µl	Mikroliter
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – Polymerase Kettenreaktion	µM	Mikromolar
pg	Pikogramm	µmol	Mikromol
pmol	Pikomol	USS	Ultraschall-Screening
PPV	<i>positive predictive value</i> – positiv prädiktiver Wert	V	Volt
PT	Primärtumor	v.a.	vor allem
qMSP	quantitative methylierungsspezifische PCR	vs.	versus
qPCR	quantitative PCR	WHO	<i>World Health Organization</i> – Weltgesundheitsorganisation
RNA	<i>ribonucleic acid</i> – Ribonukleinsäure	xg	relative Zentrifugalkraft
ROCA	<i>Risk of Ovarian Cancer Algorithm</i> – OvCa-Risiko Algorithmus	z.B.	zum Beispiel
		Z.n.	Zustand nach

Zusammenfassung

Patricia Irma Herta Rothen

„Untersuchung von Methylierungsmarkern für den Nachweis von Ovarialkarzinomen anhand von Bauchraumspülflüssigkeiten“

Das Ovarialkarzinom (OvCa) wird aufgrund von unspezifischer Symptomatik sowie fehlender Früherkennung in >70% der Fälle im Spätstadium diagnostiziert. Dies trägt zu der hohen Mortalitätsrate und der niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate, die in Deutschland nur 43% beträgt, bei. Die Möglichkeiten der Bildgebung sind ebenfalls in vielen Fällen nicht ausreichend, um ovarielle Raumforderungen sicher zu differenzieren, wodurch es in der Regel zu intraoperativen OvCa-Diagnosen kommt. Der bisher am besten etablierte Biomarker für das OvCa, CA125, eignet sich eher zur Verlaufskontrolle, und vier richtungsweisende Studien, die durch Kombination von CA125 und transvaginaler Sonographie versuchten, ein diagnostisches OvCa-Screening zu etablieren, konnten keine ausreichende Mortalitätsreduktion nachweisen, sodass ein Screening für das OvCa nach wie vor nicht empfohlen wird. Aufgrund der genannten Schwierigkeiten bei der initialen Diagnosestellung des OvCa bieten Marker zur Detektion von DNA-Methylierung in zellfreier DNA (cfDNA) eine potenzielle neue und spannende minimal-invasive diagnostische Alternative. Bei der DNA-Methylierung kommt es sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Kontext zur epigenetischen Modifikation der Erbsubstanz, welche die Gentranskription beeinflussen kann. Unabhängige genomweite vergleichende Methylierungsanalysen von OvCa- sowie Normalgewebe zeigten übereinstimmend eine Hypermethylierung von mindestens 30 Genen beim OvCa, und der Nachweis von tumorspezifischer DNA-Methylierung anhand von cfDNA wurde schon für verschiedenste Tumorentitäten erforscht. Präoperative Methylierungsmarker für cfDNA könnten somit zur Differenzierung von unklaren ovariellen Raumforderungen beitragen und zu einer Optimierung der Therapieplanung führen.

Basierend darauf war das Ziel dieser Arbeit die Etablierung von methylierungsspezifischen Markern zur Differenzierung von OvCa und benignen Erkrankungen. Anhand der genomweiten Methylierungsanalysen wurden zehn der 30 identifizierten Kandidatengene zur Untersuchung in dieser Arbeit ausgewählt. Für sechs dieser Gene wurden quantitative methylierungsspezifische PCR-(qMSP)-*Assays* zur Detektion der Methylierung in zellfreier DNA (cfDNA) aus Bauchraumspülflüssigkeiten entwickelt. Diese Marker wurden an cfDNA von OvCa (n=74) sowie von benignen gynäkologischen Erkrankungen (n=61) in einem Etablierungs- und Validierungsset auf Hypermethylierung untersucht. Die klinischen Proben wurden mittels DNA-Isolierung und Bisulfit-Behandlung vorbereitet, damit die Detektion der DNA-Methylierung anhand qMSP

möglich war. Zusätzlich wurden das Patientinnenalter, die Histologie, das FIGO-Stadium und eine vorherige Chemotherapie als potenzielle Einflussfaktoren des Methylierungsstatus untersucht und die Methylierungsmarker mit der zytologischen Diagnostik verglichen und kombiniert. Schließlich wurden Unterschiede im Methylierungsstatus zwischen der cfDNA, dem Zellpellet und dem Tumorgewebe beschrieben und die intratumorale Heterogenität der Gewebeproben untersucht. Diese Untersuchungen sollen zu einem besseren Verständnis der Bedeutung von DNA-Methylierung beim OvCa und der potenziellen Einflussfaktoren beitragen.

Anhand der qMSP-Ergebnisse konnte in der OvCa-Probengruppe ein signifikant höherer Anteil methylierter Proben und quantitativ eine stärkere Methylierung im Vergleich zu den benignen Proben nachgewiesen werden. Die sechs untersuchten Marker erreichten eine Sensitivität (SEN) von 45–89% und eine Spezifität (SPE) von 51–100% bei der Differenzierung von OvCa und benignen Erkrankungen und konnten signifikant zwischen diesen Gruppen unterscheiden (Odds-Ratios 2,9–22,8; $p < 0.05$). Dabei waren die Werte für SEN und SPE vergleichbar zur Zytologie (SEN 63%; SPE 87%). Die einzelnen Marker sowie die Markerkombinationen wurden in einem Etablierungs- und Validierungsprobenset bewertet, und trotz einiger Unterschiede der SEN und SPE zwischen den Probensets war eine signifikante Unterscheidung der OvCa-Proben und benignen Proben mit fünf der sechs Marker in beiden Probensets gegeben. Durch die Kombination der Marker miteinander sowie mit der Zytologie ließen sich SEN und SPE im Validierungsset auf 85% bzw. 100% steigern. Die Untersuchung der intratumoralen Heterogenität des Tumorgewebes ergab tendenziell ein eher, aber nicht ausschließlich homogenes Methylierungsmuster. Das Patientinnenalter, das FIGO-Stadium, die Histologie sowie eine vorherige Chemotherapie konnten weitestgehend als Einflussfaktoren der Methylierung ausgeschlossen werden.

Die Methylierungsmarker dieser Arbeit ermöglichten anhand von cfDNA aus Bauchraumspülungen eine signifikante Differenzierung von OvCa und benignen gynäkologischen Erkrankungen. Insbesondere durch Markerkombination und Einschluss des Zytologie-Ergebnisses ließ sich die SEN/SPE steigern, und es könnte zukünftig eine minimal-invasive Unterscheidung von Raumforderungen anhand von cfDNA möglich sein. Patientinnen könnten somit von einer weniger invasiven Diagnostik und genaueren, leitliniengerechten und prognoserelevanten Therapieplanung profitieren.

1. Einleitung

1.1. Das Ovarialkarzinom

1.1.1. Epidemiologie, Risikofaktoren und Prognose

Das Ovarialkarzinom, auch Eierstockkrebs genannt, macht 3,1% aller bösartigen Neubildungen bei Frauen in Deutschland aus. Das Lebenszeitrisko, an einem malignen Tumor des Ovars zu erkranken, beträgt 1,3%. In Deutschland erkranken ca. 7.350 Frauen pro Jahr, dabei beträgt das mittlere Erkrankungsalter 68 Jahre. Bezogen auf maligne Erkrankungen der weiblichen Geschlechtsorgane ist das OvCa die zweithäufigste Erkrankung nach dem Endometriumkarzinom (Gebärmutterkörperkrebs). Die hohe Mortalität des OvCa betont dessen klinische Relevanz trotz niedriger Erkrankungsrate: Das OvCa steht an fünfter Stelle der Todesursachen durch Krebserkrankungen bei Frauen mit 5,2% aller Krebssterbefälle und an erster Stelle der Krebssterbefälle durch Krebserkrankungen der weiblichen Geschlechtsorgane. (RKI und GEKID 2019) Die relative 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) ist in Deutschland mit 43% vergleichsweise niedrig, liegt jedoch weltweit sogar nur zwischen 30% und 40%. Die internationalen Schwankungen kommen dadurch zustande, dass der Diagnosezeitpunkt und die Stadienverteilung zwischen den Ländern stark variieren (Allemani et al. 2015, RKI und GEKID 2019). Die 5-JÜR hängt stark von dem Stadium des OvCa zum Diagnosezeitpunkt ab: Wird das OvCa in einem frühen Stadium entdeckt (FIGO I – IIA), ist die 5-JÜR mit 60% bis über 90% noch relativ hoch, im späten Stadium (T3 bzw. FIGO III – IV) beträgt sie hingegen nur ca. 40% (Pfisterer und du Bois 2002, Heintz et al. 2006, Burges und Schmalfeldt 2011). Die niedrige durchschnittliche relative 5-JÜR wird dadurch plausibel, dass über 70% der OvCa erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden (Allemani et al. 2015, RKI und GEKID 2019).

Es wird vermutet, dass die Mechanismen der Ovulation eine Rolle in der Entstehung des OvCa spielen, da in zahlreichen Studien Risikofaktoren identifiziert wurden, die mit einer Vervielfachung von ovulatorischen Zyklen auftreten. Ebenso werden einige „Schutzfaktoren“ vermutet, welche auf einer Verminderung von ovulatorischen Zyklen basieren (Runnebaum und Stickeler 2001, Yang-Hartwich et al. 2014). Aktuell konnte auch ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl von Ovulationszyklen und dem OvCa-Risiko nachgewiesen werden, sodass eine Zunahme von 300 auf 500 ovulatorische Zyklen im Leben fast zu einer Verdopplung des OvCa-Risikos führte (Hazard Ratio 1,92) (Trabert et al. 2020). Ein wichtiger Schutzfaktor des OvCa, d.h. ein Faktor, der das Erkrankungsrisiko senkt, ist die Einnahme von Ovulationshemmern (i.d.R. orale Kontrazeptiva) über mehrere Jahre (IARC 1999, Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian et al. 2008). Frauen mit Multiparität haben im Vergleich mit

Frauen, die keine Kinder geboren haben, ein niedrigeres Risiko, und Stillen wirkt ebenso protektiv (Runnebaum und Stickeler 2001, Tsilidis et al. 2011, Luan et al. 2013). Weiterhin weisen Frauen, welche sich einer Tubenligatur zur Sterilisation oder einer opportunistischen bilateralen Salpingektomie unterzogen haben, auch eine Reduktion des Erkrankungsrisikos auf (Cibula et al. 2011, Chen et al. 2018). Als Risikofaktoren für das OvCa gelten eine frühe Menarche, eine späte Menopause und Nulliparität (Runnebaum und Stickeler 2001, Pieta et al. 2012, Gong et al. 2013), hormonelle Therapie in der Menopause (Collaborative Group On Epidemiological Studies Of Ovarian et al. 2015), Adipositas (Olsen et al. 2007) und Endometriose (Wilbur et al. 2017).

Der Großteil der OvCa tritt sporadisch auf, dennoch sind ungefähr 20 – 25% durch Keimbahnmutationen bedingt (Flaum et al. 2020), hauptsächlich durch BRCA1/2-Mutationen im Zusammenhang mit dem Brust-Ovarialkarzinom-Syndrom (HBOC) oder durch diverse Mutationen im Rahmen des HNPCC-Syndroms (Pfisterer und du Bois 2002), und es werden zunehmend weitere Risikogene identifiziert. Mutationsanalysen in unselektierten OvCa-Patientinnen aus Deutschland zeigen einen Anteil von ca. 26% der OvCa mit Keimbahnmutationen in Risikogenen, ca. 21% haben eine Keimbahnmutation der BRCA1/2-Gene (Harter et al. 2017). Bei hereditären OvCa fallen v.a. eine positive Familienanamnese (Verwandte mit OvCa oder Mamma-Ca) und ein relativ frühes Erkrankungsalter auf, obwohl diese Selektionskriterien zur Auswahl von OvCa-Patientinnen für genetische Testung unzureichend sind (Harter et al. 2017, Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Frauen mit einer genetischen Prädisposition für das OvCa weisen ein erhöhtes Lebenszeitrisiko von bis zu 59% (bei BRCA1 Mutation) auf (Mavaddat et al. 2013).

1.1.2. Prognosefaktoren, Stadieneinteilung, Symptomatik und Diagnostik

Die wichtigsten Prognosefaktoren des OvCa sind das Tumorstadium zum Diagnosezeitpunkt und der postoperative Tumorrest (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Die Tatsache, dass mehr als 70% der OvCa erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt werden, erklärt die relativ schlechte Prognose mit einer niedrigen Überlebensrate. Das OvCa wird anhand der FIGO- und TNM-Kriterien in vier Hauptkategorien eingeteilt, welche in Tab. 1 (S. 7) dargestellt werden; von einem fortgeschrittenen Stadium spricht man i.d.R. ab einem FIGO IIB Stadium, in dem sich der Tumor intraperitoneal im kleinen Becken (FIGO IIB) und darüber hinaus (FIGO III) ausgebreitet hat, bis hin zur Ausbildung von Fernmetastasen (FIGO IV) (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Tab. 1: System zur Einteilung des Ovarialkarzinoms

FIGO- und adaptierte TNM-Klassifikation des Ovarial- und Tuben- sowie des primären Peritonealkarzinoms (Meinhold-Heerlein et al. 2015).

TNM Klassifikation	FIGO-Stadium	Diagnose
T₁	I	Tumor begrenzt auf Ovarien oder Tuben
T_{1a}	IA	Tumor begrenzt auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt), Ovar-/Tubenoberfläche tumorfrei, keine malignen Zellen im Aszites oder in der Peritoneallavage (Spülzytologie negativ)
T_{1b}	IB	Tumor begrenzt auf beide Ovarien (Kapsel intakt) oder Tuben (Serosa intakt), Ovar-/Tubenoberfläche tumorfrei, Spülzytologie negativ
T_{1c}	IC	Tumor auf ein oder beide Ovarien oder Tuben begrenzt mit folgender Unterteilung:
T_{1c1}	IC1	Chirurgisch/operativ bedingte Kapsel-/Serosaruptur
T_{1c2}	IC2	Präoperative Kapsel-/Serosaruptur oder Tumor an Ovarial-/Tubenoberfläche
T_{1c3}	IC3	Nachweis maligner Zellen im Aszites oder in der Peritoneallavage
T₂	II	Tumorbefall einseitig oder beidseitig mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken, oder primäres Peritoneal-Ca
T_{2a}	IIA	Ausbreitung auf und/oder Tumorimplantate an Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T_{2b}	IIB	Ausbreitung auf andere intraperitoneale Gewebestrukturen im kleinen Becken
T₃	III	Tumorbefall einseitig oder beidseitig oder primäres Peritoneal-Ca mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder regionale Lymphknotenmetastasen (LK-MTS)
T_{3N1}	IIIA1	Ausschließlich regionäre LK-MTS
T_{3N1a}	IIIA1i	Regionäre LK-MTS ≤ 10mm im größten Durchmesser
T_{3N1b}	IIIA1ii	Regionäre LK-MTS >10mm im größten Durchmesser
T_{3a}	IIIA2	Mikroskopische Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne regionäre LK-MTS
T_{3b}	IIIB	Makroskopische Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens, größte Ausdehnung bis maximal 2cm, mit oder ohne regionäre LK-MTS
T_{3c}	IIIC	Makroskopische Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens, größte Ausdehnung von mehr als 2cm, mit oder ohne regionäre LK-MTS (einschließlich Tumorausbreitung auf der Leber-/Milzkapsel ohne Parenchyembefall des Organs)
M₁	IV	Fernmetastasen (Ausnahme peritonealer Metastasen)
M_{1a}	IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie und/oder histologische Sicherung des Pleurabefalls
M_{1b}	IVB	Parenchymmetastasen und/oder Metastasen in extraabdominellen Organen
Erklärung zu N: Regionäre Lymphknoten		
N_x		Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N₀		Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N₁		Regionale Lymphknotenmetastasen (N _{1a} größter Durchmesser ≤ 10mm, N _{1b} größter Durchmesser > 10mm)

Ein wesentliches diagnostisches Problem des OvCa ist das Fehlen spezifischer klinischer Symptome in den frühen Erkrankungsstadien, d.h. es gibt meistens ein langes symptomfreies Intervall vor der Diagnose. Bezugnehmend auf verschiedene retrospektive Studien fallen Frauen mit einem OvCa erst im Verlauf des fortschreitenden Krankheitsprozesses durch Beschwerden wie Völlegefühl, Blähungen, Müdigkeit, unklare abdominelle Schmerzen oder Beschwerden, Zunahme der Miktionsfrequenz und Zunahme des Bauchumfangs (z.B. aufgrund von Aszites) auf (Goff 2012, Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Da dies unspezifische und nicht strikt gynäkologische Symptome sind, kommt es oft zu einem Zeitverzug, bevor der Verdacht auf ein OvCa gestellt wird und weitere diagnostische Maßnahmen eingeleitet werden. In vielen Fällen wird eine ovarielle Raumforderung durch einen Tumor erst zufällig bei einer gynäkologischen Routineuntersuchung entdeckt. 5% bis 10% der Frauen bleiben bis zur Diagnose sogar asymptomatisch (Bankhead et al. 2005). Ein Symptom, das sich bei vielen der Frauen entwickelt, oft aber erst operativ auffällt, ist Aszites (pathologische Flüssigkeitsansammlung im Bauchraum) mit intraperitonealer Tumorausbreitung. Es tritt bei OvCa-Patientinnen laut verschiedener Studien mit einer Häufigkeit von 30 bis 78% auf und kommt deutlich häufiger in fortgeschrittenen Stadien vor (Ayantunde und Parsons 2007, Ayhan et al. 2007, Huang et al. 2013a). Sowohl das Auftreten von Aszites als auch eine große Menge an Aszites (> 1800ml) sind prognostisch relevant und mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Huang et al. 2013a). Weitere Prognosefaktoren, die bei der Diagnose und Therapie berücksichtigt werden sollten, sind das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin, das Tumorgrading, die Durchführung einer leitliniengerechten Therapie und der histologische Subtyp (siehe 1.1.4. Histologische Subtypen) (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Bei einem kombinierten Auftreten der oben genannten Symptome, vor allem bei Frauen über 50 Jahren, sollte demnach eine gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung und eine transvaginale Sonographie durchgeführt werden. Weiterführend können bildgebende Verfahren wie CT, PET und MRT zur Beurteilung der Tumorausdehnung, zur differenzialdiagnostischen Abklärung und zur Einschätzung von zusätzlichen Faktoren wie Aszites, Peritonealinfiltration und Lymphknotenmetastasen genutzt werden. Dennoch dienen diese apparativen diagnostischen Maßnahmen hauptsächlich der Ersteinschätzung der Raumforderung, da benigne ovarielle Erkrankungen wie z.B. Ovarialzysten relativ häufig auftreten und unter Anwendung dieser diagnostischen Methoden von OvCa schwierig abzugrenzen sind (Chudecka-Glaz 2015, Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Bei Verdacht auf einen Ovarialtumor muss folglich ein operatives Staging in Form einer Laparotomie veranlasst werden. Für die endgültige Diagnosestellung mit histologischer Sicherung und Tumorstaging müssen Biopsien aus allen

auffälligen Stellen im Abdomen und Peritonealbiopsien aus unauffälligen Regionen sowie eine Peritonealspülzytologie erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Insbesondere bei anamnestischem Verdacht auf ein hereditäres OvCa sollte der Patientin eine genetische Beratung und Testung empfohlen werden, allgemein sollte jeder OvCa-Patientin eine genetische Beratung und Testung angeboten werden. Patientinnen mit einer nachgewiesenen Keimbahnmutation in einem Hochrisikogen sollten über die Möglichkeit einer prophylaktischen bilateralen Salpingo-Oophorektomie zur Senkung des Erkrankungsrisikos beraten werden (Harter et al. 2017, Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

1.1.3. Ursprung des Tumorgewebes

Die Ovarien oder Eierstöcke gehören zu den inneren weiblichen Geschlechtsorganen und liegen paarig intraperitoneal im kleinen Becken in der sogenannten *Fossa ovarica* (lat.). Sie sind durch Bindegewebe mit den Eileitern (lat. *Tubae uterinae*), der Gebärmutter (lat. *Uterus*) und der seitlichen Beckenwand verbunden. Der Aufbau eines Ovars wird aufgeteilt in ein gefäßreiches Mark (lat. *Medulla ovarii*) und eine 1 – 3 mm dicke Rinde (lat. *Cortex ovarii*), in welcher bei der geschlechtsreifen Frau die Follikelreifung im Rahmen des Menstruationszyklus stattfindet. Die Effektorhormone des Menstruationszyklus Progesteron und Östrogen werden ebenso im Ovar von den Follikeln gebildet. Bei der monatlichen Ovulation (Eisprung) gelangt i.d.R. eine Eizelle vom Ovar in die *Tuba uterina*, welche die Eizelle zur Gebärmutter transportiert und gleichzeitig den Ort der Befruchtung darstellt. Als Hohlorgan besteht der Eileiter aus einer dreischichtigen Wand mit einer inneren Schleimhautschicht (lat. *Tunica mucosa*), einer Muskelfaserschicht (lat. *Tunica muscularis*) sowie einer bindegewebigen äußeren Schicht (lat. *Tunica serosa*), die letztlich mit einschichtigem Peritonealepithel überzogen ist. Die Drüsen- und Flimmerzellen (in der *Tunica mucosa*) sowie die vielen Muskelschichten der Eileiter ermöglichen den gerichteten Sekretstrom der Eizelle zur Gebärmutter. Die genannten Funktionen unterstreichen die essenzielle Bedeutung des Ovars und der Eileiter für das hormonelle Gleichgewicht und die Fertilität der geschlechtsreifen Frau. (Aumüller et al. 2010)

Das Ovar ist außen von einer bindegewebigen Organkapsel, der *Tunica albuginea* (lat.), umgeben. Diese ist nochmals von einem einschichtigen kubischen Peritoneum bedeckt, welches beim Ovar als Keimepithel bezeichnet wird. Zwischen Ovar und Eileiter wird das Peritonealepithel an dem *Ostium abdominale tubae uterinae* (lat.) unterbrochen und somit besteht eine Verbindung zur Bauchhöhle. Hier findet die Abgabe der Eizelle vom Ovar an den Eileiter statt. (Aumüller et al. 2010)

Das Tumorgewebe des klinisch am Ovar lokalisierten Tumors kann verschiedene Ursprünge haben. Die frühere Annahme, dass sämtliche OvCa ihren Ursprung im Keimepithel haben, wurde

in den letzten Jahren der Forschung stark bestritten. Neben dem Keimepithel kann das Tumorgewebe vom Epithel der Eileiter, der Gebärmutter, der Zervix und des Darms entspringen (Dubeau 2008, Kurman und Shih Ie 2011, Yang-Hartwich et al. 2014). Es wird vermutet, dass die Ovulation mit Ruptur des Ovariepithels und nachfolgenden Reparaturmechanismen sowie lokaler Inflammation und der Freisetzung ovarieller Hormone und Wachstumsfaktoren die Entstehung, den Transport, die Anheftung und die Proliferation maligner Zellen der genannten Ursprungsgewebe am Ovar begünstigt (Yang-Hartwich et al. 2014). Vor allem die lokale Entzündungsreaktion am rupturierten Ovariepithel mit Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen führt zu oxidativem Zellstress und Zellschäden, welche eine mutagene Wirkung haben können (Ness und Cottréau 1999). Aufgrund der verschiedenen Ursprungsgewebe gibt es eine ausführliche histologische Differenzierung des OvCa, welche in Abschnitt „1.1.4. Histologische Subtypen“ beschrieben wird. 90% der Ovarialtumore sind epitheliale Tumore und werden demnach als „Ovarialkarzinom“ bezeichnet. Viel seltener treten Tumore der Keimzellen oder Keimstrang-/Stromazellen auf (Davidson und Trope 2014, Hauptmann et al. 2014). Klassifiziert werden Tuben- und Peritoneal-Ca gemeinsam mit dem OvCa nach WHO und FIGO, da sie die Genese und Histomorphologie teilen (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Das OvCa breitet sich vor allem durch sog. passive Dissemination, also peritoneale Zirkulation und Streuung von Tumorzellen von der Tumoroberfläche, aus, was oft zur Bildung von Aszites führt. Es wird aber ebenso eine Metastasierung über hämatogene und lymphatische Wege beschrieben (Yeung et al. 2015).

1.1.4. Histologische Subtypen

Aufgrund der unterschiedlichen Ursprungsgewebe und Zellmorphologien wird das OvCa mittlerweile als Überbegriff für eine heterogene Gruppe von malignen Tumoren, die am Ovar lokalisiert sind, benutzt (Meinhold-Heerlein und Hauptmann 2014). Histologisch, also je nach mikroskopischer Zellmorphologie der Tumorzellen, wird das OvCa hauptsächlich in seröse (ca. 70%), endometrioid (ca. 10%), klarzellige (12 – 13%) und muzinöse (3%) OvCa unterteilt, und dies bildet die Grundlage für die WHO-Klassifikation der epithelialen OvCa (McCluggage 2011, Rojas et al. 2016, Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Die histologische Differenzierung hängt stark mit dem Ursprungsgewebe zusammen – seröse OvCa entstammen dem Keimepithel des Ovars oder der Eileiter, muzinöse gehen auf den Gastrointestinaltrakt zurück und endometrioid und klarzellige OvCa werden mit der Endometriose des Endometriums assoziiert (Vaughan et al. 2011). Somit ist das Entstehungs- und Erkrankungsrisiko je nach histologischem Subtyp auch sehr unterschiedlich: Während eine erhöhte Anzahl an ovulatorischen Zyklen das Lebenszeitrisiko für seröse, endometrioid und klarzellige OvCa erhöht und eine Rolle in deren Entstehung spielen

könnte, konnte dies für muzinöse OvCa nicht nachgewiesen werden (Trabert et al. 2020). Für das muzinöse OvCa wiederum wurde Zigarettenrauchen als Risikofaktor identifiziert, während es für endometrioiden und klarzelliges OvCa eine eher protektive Wirkung zeigte (Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian et al. 2012).

Seröse OvCa werden je nach Grad der Kernatypien und Mitoserate nochmals in zwei verschiedene Subtypen unterteilt – in *low-grade* seröse Karzinome (LGSC) und *high-grade* seröse Karzinome (HGSC). *Low-grade* seröse OvCa sind gut differenziert, genetisch eher stabil und entwickeln sich vermutlich von einem serösen Borderline-Tumor, während *high-grade* seröse OvCa schlecht differenziert und genetisch instabil mit ausgeprägten Chromosomenaberrationen sind, eine höhere Teilungsrate mit ausgeprägten Kernatypien aufweisen und eher vom distalen Teil der Eileiter ausgehen (McCluggage 2011, Hauptmann et al. 2014). Diese Subtypen sind als zwei distinkte Subtypen des serösen OvCa zu verstehen und nicht als zwei Malignitätsstufen desselben Tumors. Prognostisch schneidet das *high-grade* OvCa deutlich schlechter als das *low-grade* OvCa ab und ist mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert (McCluggage 2011).

Die histologischen Subtypen unterscheiden sich genetisch und prognostisch und beeinflussen die Therapieentscheidungen, weswegen teilweise auch eine typspezifische Malignitätsgraduierung empfohlen wird (Hauptmann et al. 2014, Micci et al. 2014, Cuellar-Partida et al. 2016, Flaum et al. 2020). Beispielsweise haben muzinöse und endometrioiden OvCa eine bessere Prognose als *high-grade* seröse OvCa, allerdings spricht das *high-grade* seröse OvCa deutlich besser auf Chemotherapie an als das muzinöse OvCa (Prat 2012). Die unterschiedliche Prognose lässt sich zumindest teilweise auch durch die Stadienverteilung erklären; während die deutliche Mehrheit der fortgeschrittenen OvCa als serös einzustufen ist, ist die Häufigkeit von serösen, endometrioiden und klarzelligem OvCa im frühen Stadium noch relativ homogen verteilt. Muzinöse OvCa sind ebenso häufiger in frühen Stadien aufzufinden (McCluggage 2011).

Borderline-Tumoren sind nicht-invasiv wachsende Ovarneoplasmen mit atypischer Epithelproliferation, welche sich ausgehend von benignen Zystadenomen entwickeln. Sie stellen Vorläuferläsionen für gut differenzierte OvCa dar, haben aber ein niedriges Malignitätspotenzial und eine gute Prognose (Meinhold-Heerlein und Hauptmann 2014, Rojas et al. 2016). Borderline-Tumoren werden ebenso wie das OvCa histologisch differenziert und sind bis zu 95% serös oder muzinös (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Jahrelang wurden die histologischen Subtypen des OvCa zur Klassifizierung zusätzlich nach einem von Kurman und Shih in 2004 vorgeschlagenem Modell einer von zwei Gruppen zugeteilt: Typ I- oder Typ II-Tumoren. Typ I-Tumoren entwickeln sich über definierte Vorstufen (Vorläuferläsionen aus Borderline-Tumoren oder Endometriose) und sind gut differenziert. Sie stellen ca. 25% aller OvCa dar und enthalten v.a. *low-grade* seröse OvCa, endometrioiden /

klarzellige / muzinöse OvCa sowie maligne Brenner-Tumoren (sehr seltene Tumoren, bestehen aus Epithel vom Transitionalzelltyp). Typ II-Tumoren entwickeln sich vom Epithel der Eileiter oder des Ovars und sind schlecht differenziert, wachsen aggressiv und sind hochmaligne. Sie stellen ca. 75% aller OvCa dar, sind für ca. 90% der Mortalität beim OvCa verantwortlich, und zeigen eine hohe Assoziation mit p53-Mutationen. Zu dieser Gruppe gehören vor allem die *high-grade* serösen OvCa, Karzinosarkome und die undifferenzierten OvCa (Shih Ie und Kurman 2004). Mit zunehmendem Verständnis der molekulargenetischen, morphologischen und prognostischen Heterogenität der OvCa, vor allem der Typ-I-Tumoren, wurde dieses Modell jedoch in den letzten Jahren überarbeitet und zunehmend für eine genauere Differenzierung nach histologischen, molekulargenetischen und immunhistochemischen Merkmalen verlassen (Kurman und Shih Ie 2016, Salazar et al. 2018, Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

1.1.5. Früherkennung des OvCa

Aufgrund der schwierigen Diagnosestellung in frühen Stadien des OvCa und der dementsprechend hohen Mortalität wird die Frage nach der Möglichkeit eines Screenings für das OvCa (im Sinne einer sekundären Prävention) in der Forschung rege besprochen und analysiert. Ein optimales Screening sollte den Tumor in einem möglichst frühen Stadium, welches mit einer hohen 5-JÜR einhergeht, detektieren. Aufgrund der niedrigen Inzidenz des OvCa müsste die Screening-Methode eine sehr gute Trennung zwischen Betroffenen und Nicht-Betroffenen ermöglichen, sodass es weder zu einer hohen Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen bei Nicht-Betroffenen kommt, noch OvCa übersehen werden.

Laut dem „Leitlinienprogramm Onkologie 2020 für Maligne Ovarialtumoren“ gab es bisher vier richtungsweisende große Screening-Studien, die in den nachfolgenden Absätzen einzeln aufgeführt werden. Bei allen vier Studien bekamen asymptotische Frauen, die aufgrund ihres höheren Alters (ungefähr > 50 Jahre) als Risikogruppe eingeschlossen wurden, ein jährliches Screening für OvCa mit transvaginaler Sonographie (TVU) oder einer Kombination derer mit Messung des CA125-Serumlevels, und wurden mit einer Kontrollgruppe ohne Intervention verglichen (Kobayashi et al. 2008, Buys et al. 2011, van Nagell et al. 2011, Jacobs et al. 2016). CA125 ist mit einer SEN von ca. 86%, gemessen im Serum von OvCa-Patientinnen < 6 Monate vor Diagnosestellung, bis heute der beste Biomarker für das OvCa (Menon et al. 2014). Zusammenfassend liefern diese Studien jedoch die Evidenz, dass ein generelles Screening zu diesem Zeitpunkt nicht durchgeführt werden sollte, da ein Screening mit CA125 und TVU bisher keine eindeutige Mortalitätsreduktion nachweisen konnte (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). In einer Studie in Japan wurden ungefähr 80.000 postmenopausale Frauen gleichermaßen in eine Screening-Gruppe und eine Kontrollgruppe randomisiert. Die Screening-Gruppe wurde mit TVU

und Messung des CA125-Wertes im Serum im Rahmen ihrer jährlichen gynäkologischen Untersuchung untersucht. Bei auffälliger Ultraschall- und/oder Blutuntersuchung wurde meist eine operative Evaluierung unternommen. In dieser Studie zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Detektion von OvCa zwischen den beiden Gruppen. In der Screening-Gruppe wurde ein höherer Anteil an FIGO I OvCa detektiert (63% vs. 38% in der Kontrollgruppe), jedoch erbrachte die Stadieneinteilung keine statistische Signifikanz. Die Studie konnte nicht belegen, dass ein solches Screening zu empfehlen wäre und die Auswirkungen des Screenings auf die Mortalität der OvCa-Patientinnen wurden nicht konkretisiert. (Kobayashi et al. 2008)

Bei dem *University of Kentucky Ovarian Cancer Screening Trial* bekamen die Frauen in der Screening-Gruppe eine jährliche Ultraschalluntersuchung. Es wurde das OvCa-Stadium zum Diagnosezeitpunkt und das Überleben der Patientinnen evaluiert. Die Screening-Methode ergab zwar eine SEN von 86,4% und eine SPE von 98,8%, der positive prädiktive Wert (PPV) erreichte jedoch lediglich 20%. Die 5-JÜR war in der Screening-Gruppe mit 84,6% signifikant höher als bei den Patientinnen ohne Screening (5-JÜR 53,7%). Die verbesserte Überlebensrate wird dadurch erklärt, dass bei den Frauen in der Screening-Gruppe das OvCa in einem früheren Stadium detektiert wurde – 70% der OvCa in der Screening-Gruppe gehörten zum FIGO-Stadium I/II, in der Kontrollgruppe waren es hingegen nur 27%. Aufgrund des sehr niedrigen PPV konnte diese Screening-Methode jedoch auch nicht als allgemeines OvCa-Screening empfohlen werden. (van Nagell et al. 2011)

Die PLCO-Krebsscreening-Studie (vom engl. *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian*) untersuchte ebenso die Auswirkung eines jährlichen Screenings mit TVU und CA125-Messung bei ca. 78.000 Frauen auf die OvCa-spezifische Mortalität. Hierbei konnte zwischen Screening- und Kontrollgruppe kein statistisch signifikanter Unterschied im Stadium zum Diagnosezeitpunkt festgestellt werden und es wurden überwiegend OvCa im fortgeschrittenen Stadium (77% in der Screening-Gruppe) detektiert. Eine signifikante Mortalitätsreduktion konnte nicht erzielt werden, auch nach einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 19 Jahren (Median 14,7 Jahre) (Pinsky et al. 2016). Die Rate falsch-positiver Befunde war mit 5% vergleichbar mit Mammographie-Screenings, allerdings führte ein falsch-positiver Befund bei diesem Screening zu deutlich mehr invasiver, operativer Diagnostik und assoziierten medizinischen Komplikationen. (Partridge et al. 2009, Buys et al. 2011)

In der größten Studie, der UKCTOCS (vom engl. *UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening*), wurden über 202.000 Frauen in drei Studiengruppen randomisiert: Die erste Gruppe bekam jährlich ein multimodales Screening (MMS) mit CA125-Messung und, je nach Risikoeinschätzung, TVU. Im Gegensatz zur PLCO-Studie, bei der ein *Cut-off*-Wert zur Bewertung der CA125-Messung benutzt wurde, wurde CA125 hier longitudinal gemessen; es

wurden also Veränderungen im Zeitverlauf beachtet und anhand des ROC-Algorithmus (kurz ROCA, vom engl. *Risk of Ovarian Cancer Algorithm*) interpretiert. Die zweite Gruppe bekam als einzige Maßnahme ein jährliches Screening mit TVU (USS, vom engl. *ultrasound screening*). Die dritte Gruppe verblieb als Kontrollgruppe gänzlich ohne Screening-Maßnahmen. Hier konnte eine Mortalitätsreduktion beider Screening-Verfahren (15% bei MMS und 11% bei USS) gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden, welche für die MMS Gruppe statistisch signifikant wurde, wenn prävalente Fälle ausgeschlossen wurden (20%ige Mortalitätsreduktion, $p < 0,05$). Die SEN des MSS war mit 88,6% besser als die des USS (65,8%). Die Rate falsch-positiver Fälle konnte ebenfalls relativ niedrig gehalten werden – für jedes detektierte OvCa wurden zwei der Fälle beim MMS und zehn der Fälle beim USS fälschlicherweise aufgrund eines positiven Screenings operiert. Die Notwendigkeit, prävalente Fälle auszuschließen, um ein signifikantes Ergebnis zu erzielen, wurde von der Leitlinie Onkologie 2020 als kritisch bewertet, sodass diese Studie noch keine ausreichende Evidenz einer Mortalitätsreduktion durch ein Screening-Verfahren bietet. (Menon et al. 2014, Jacobs et al. 2016, Leitlinienprogramm Onkologie 2020)

Zusammenfassend deutet ein multimodales Screening-Verfahren wie bei dem UKCTOCS auf eine Möglichkeit der Mortalitätsreduktion hin, die Evidenz ist bis dato aber nicht deutlich genug, um eine generelle Empfehlung eines Screenings zu begründen. Dafür gab es innerhalb der angeführten Studien zu viele falsch-positive Befunde mit nachfolgenden Operationen, sodass gesunde Frauen den Komplikationen einer Operation und den psychologischen Auswirkungen einer möglichen Krebsdiagnose ausgesetzt wurden. In dem Sinne hat noch keine der Studien eindeutig bewiesen, dass die Vorteile eines Screenings (Mortalitätsreduktion, frühere Diagnose) die Nachteile (Auswirkungen einer hohen Rate an falsch-positiven Befunden) überwiegen. (Reade et al. 2013, Menon et al. 2014, Force et al. 2018)

1.1.6. Therapie des OvCa

Die Therapie des OvCa besteht im Wesentlichen aus einer operativen Tumoresektion und einer adjuvanten Chemotherapie. Als operativer Standard beim frühen OvCa gilt die Längsschnittlaparotomie mit Peritonealzytologie und Exstirpation von Uterus, beiden Adnexen, infragastrischem/-kolischem Omentum majus, pelvinen und paraaortalen Lymphknoten, systematischen Peritonealbiopsien sowie allen weiteren makroskopisch sichtbaren Tumormanifestationen, sodass eine möglichst komplette makroskopische Tumoresektion erzielt werden kann. Bei fortgeschrittenen OvCa ist das Ziel ebenfalls eine makroskopisch vollständige Tumoresektion mit Exstirpation aller befallenen Strukturen. Eine systematische pelvine/paraaortale Lymphonodektomie soll in diesem Fall nur bei klinischem Verdacht auf Lymphknotenbefall oder makroskopischem Tumorrest erfolgen. Eine fertilitätserhaltende

Operation mit *In-situ*-Verbleib des Uterus und kontralateralem Ovar bei einem unilateralen OvCa FIGO I nach fachgerechtem Tumorstaging ist auf Wunsch der Patientin möglich. Mit Ausnahme eines gut differenzierten OvCa im FIGO-Stadium IA sollten alle frühen OvCa eine adjuvante systemische platinhaltige Chemotherapie mit Carboplatin über sechs Zyklen erhalten. Bei einem fortgeschrittenen OvCa wird die adjuvante Chemotherapie durch Paclitaxel im Rahmen einer Kombinationschemotherapie ergänzt, zusätzlich kann eine Therapie mit dem Antikörper Bevacizumab erwogen werden. Eine Erhaltungstherapie nach Abschluss der Primärtherapie soll nur bei Patientinnen mit FIGO III/IV *high-grade* OvCa und nachgewiesener BRCA-Mutation erfolgen. Hier zeigte eine Erhaltungstherapie mit dem PARP-Inhibitor Olaparib eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (Moore et al. 2018, Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Die leitliniengerechte Therapie mit komplettem operativen Staging und Tumorresektion ohne Rest (R0) sowie adjuvante Chemotherapie hat prognostische Bedeutung und wirkt sich positiv auf das Gesamtüberleben aus (du Bois et al. 2009b). Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) untersuchte die Versorgung von OvCa-Patientinnen in Deutschland (du Bois et al. 2001) und international (du Bois et al. 2009a) und konnte zeigen, dass die Versorgung und dementsprechend das Therapieergebnis zwischen verschiedenen Kliniken stark schwanken. Patientinnen in Deutschland hatten eine höhere Chance auf eine leitliniengerechte Therapie in Schwerpunkt- oder Universitätskliniken, bei Teilnahme der Klinik an zertifizierten Therapiestudien und bei Behandlung durch ein therapeutisches Team mit viel Erfahrung und Übung bei der OvCa-Behandlung (du Bois et al. 2001). International hatten Institutionsfaktoren wie die Behandlung durch Ärzte mit Spezialisierung in gynäkologischer Onkologie, Studienteilnahme der Klinik, Größe der Klinik und Status als Schwerpunkt- oder Universitätsklinikum eine nachvollziehbar positive und prognostisch relevante Auswirkung auf die Durchführung einer leitliniengerechten Therapie im Sinne eines kompletten Tumorstagings, einer kompletten Tumorresektion und einer adjuvanten Chemotherapie (du Bois et al. 2009a).

1.2. Zellfreie Tumor-DNA und deren Relevanz für das Ovarialkarzinom

1948 wurde zellfreie DNA (cfDNA, vom engl. *cell-free DNA*) zum ersten Mal in einer Publikation von Mandel und Metais als freie Nukleinsäure im menschlichen Blutplasma beschrieben (Mandel und Metais 1948). Seitdem hat sie insbesondere an Bedeutung in der Pränatal- und Tumordiagnostik gewonnen, nachdem 1989 ctDNA (zirkulierende Tumor-cfDNA) im Plasma von Krebspatienten (Stroun et al. 1989) und 1997 fetale cfDNA bei Schwangeren (Lo et al. 1997) detektiert wurde. cfDNA tritt fragmentiert in unterschiedlichen Fragmentlängen auf; die Fragmentierung der cfDNA durch Desoxyribonukleasen und deren Freisetzung aus der Zelle wird

vor allem durch apoptotische und nekrotische Vorgänge erklärt, aber auch aktive Mechanismen werden beschrieben (Stroun et al. 2000). cfDNA tritt im gesunden Organismus durch physiologische Apoptose von Zellen auf und kann auch bei Zellstress durch Trauma, Sepsis oder im Rahmen von proinflammatorischen Erkrankungen wie SLE oder Myokardinfarkten erhöht sein (Kim et al. 2014). In der Pränataldiagnostik ermöglicht cfDNA im Rahmen von NIPT (nicht-invasive pränatale genetische Tests) eine nicht-invasive genetische Untersuchung des Fetus durch eine Blutprobe der Schwangeren. Somit wird das Komplikationsrisiko eines invasiven Eingriffes wie z.B. einer Amniozentese umgangen (Jiang und Lo 2016).

In der Onkologie gab es seit der Entdeckung von ctDNA mehrere Erkenntnisse. Ähnlich wie die cfDNA wird ctDNA von Tumorzellen hauptsächlich apoptotisch und nekrotisch freigesetzt; durch die rapide Proliferation von Tumorzellen kommt es in Tumorgewebe häufiger als in gesunden Zellen zu Bereichen der Mangelversorgung mit nachfolgendem Absterben der Zellen. Es wird auch eine spontane Freisetzung von Nukleinsäuren aus Tumorzellen beschrieben (Stroun et al. 2000, Stroun et al. 2001, Schwarzenbach et al. 2011).

Die ctDNA unterscheidet sich aber von der physiologischen cfDNA in mehreren Aspekten – Fragmentlänge, Konzentration und genetische Veränderungen. Eine Messung der cfDNA-Fragmentlängen (hier wird nicht zwischen cfDNA und ctDNA unterschieden) von gesunden Kontrollpersonen und Pankreaskarzinom-Patienten fand Fragmentlängen von 185 – 200bp in gesunden Kontrollpersonen und kürzere Fragmente bei den Pankreaskarzinom-Patienten (Giacona et al. 1998). Das gehäufte Auftreten kürzerer cfDNA-Fragmente bei verschiedenen Krebsentitäten wurde mittlerweile in vielen anderen Studien beschrieben; bei einer Untersuchung von Patienten mit Melanomen fand man beispielsweise v.a. cfDNA mit einer Länge von 132 – 145bp im Gegensatz zu 165bp bei Kontrollpersonen. Durch Längenselektion der Fragmente ließ sich dann im Umkehrschluss ctDNA bei Lungenkrebs-Patienten besser von der physiologischen cfDNA trennen (Underhill et al. 2016).

Im Hinblick auf die Konzentrationsunterschiede physiologisch und pathologisch freigesetzter cfDNA untersuchte eine Studie im Jahr 2014 die cfDNA-Konzentration in Patienten mit Magenkrebs; es zeigte sich in Magenkrebspatienten eine signifikant höhere Konzentration an cfDNA im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen sowie auch eine signifikant höhere cfDNA-Konzentration bei Magenkrebs im fortgeschrittenen Stadium gegenüber Frühstadien. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Verringerung der cfDNA-Konzentration postoperativ nach Tumorresektion (Kim et al. 2014). Eine weitere Studie beschrieb ebenso eine Verringerung der cfDNA-Konzentration nach präoperativer Chemotherapie eines Rektum-Ca, sodass der Gebrauch von cfDNA als Prognosefaktor und Marker für die Therapieverlaufskontrolle denkbar wäre (Agostini et al. 2011). Auch bei anderen Krebsentitäten wie z.B. Lungenkrebs wurde eine

signifikant höhere Konzentration an cfDNA gegenüber gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (Stroun et al. 2000, Kamat et al. 2010, Salvi et al. 2016).

Nicht nur die Konzentration an cfDNA, sondern auch genetische/epigenetische Veränderungen in ctDNA sind von Relevanz und könnten zur Tumordiagnostik angewendet werden – Untersuchungen von ctDNA im Blut zeigten in verschiedenen Studien die gleichen genetischen/epigenetischen Alterationen wie im Tumor, z.B. Mutationen, CNVs (vom engl. *copy number variations*), Mikrosatelliteninstabilität oder CpG-Insel-Methylierung (Jiang und Lo 2016, Salvi et al. 2016).

Die Entnahme von Körperflüssigkeiten, wie z.B. Serum, Plasma, Urin oder Peritonealflüssigkeit, und die molekularpathologische Untersuchung von cfDNA, stellen eine mögliche minimal-invasive Alternative oder Ergänzung zur Gewebebiopsie dar, welche „*Liquid Biopsy*“ (dt. flüssige Biopsie) genannt wird (Dahl und Kloten 2015). *Bettegowda et al.* veröffentlichten 2014 Untersuchungen von ctDNA von 640 Patienten mit verschiedenen Krebsentitäten, bei denen unter anderem bei 206 Patienten mit metastasiertem Kolorektal-Ca eine *Liquid Biopsy* gleichzeitig mit einer Gewebeprobe auf die klinisch relevante KRAS-Genmutation untersucht wurde. Es zeigte sich bei der *Liquid Biopsy* eine SEN von 87,2% und SPE von 99,2% sowie eine 95%ige Konkordanz zwischen *Liquid Biopsy* und Gewebeprobe mit hoher Signifikanz (Bettegowda et al. 2014).

Darüber hinaus ist es möglich, dass eine *Liquid Biopsy* von ctDNA im Gegensatz zu einer Gewebebiopsie des Primärtumors (PT) vollständigere Informationen über das Tumorgenom und dessen epigenetische Veränderungen liefert, v.a. bei metastasierten Krebserkrankungen. Die Arbeitsgruppe von *Butler et al.* untersuchte zwei Patienten mit metastasierten Krebserkrankungen und fand in der cfDNA sowie in Metastasenbiopsien gemeinsame relevante Mutationen, welche im PT-Gewebe jedoch nicht vorkamen (Butler et al. 2015). Die Ursache für dieses Phänomen ist vermutlich die intratumorale Heterogenität, die dazu führt, dass sich Biopsien vom PT und Absiedlungen auf epigenetischer/genetischer Ebene nicht immer gleichen. Studien der Genomsequenzierung von Tumoren haben gezeigt, dass Tumoren komplexe Zellmassen mit verschiedenen Zellarten sind – neben Tumorzellen finden sich auch mesenchymale und endovaskuläre Zellen sowie Immunzellen (Sun und Yu 2015). Auch die Zellen innerhalb eines Zellverbandes unterscheiden sich in ihrer Molekulargenetik. Durch eine stärkere genomische Instabilität, vermehrte epigenetische Veränderungen, unterschiedliche Genexpression und auch zell-extrinsische Einflüsse kommt es in einem Tumor und dessen Absiedlungen bzw. Metastasen zu heterogenen Zellen; dies wird als intratumorale Heterogenität bezeichnet (Sun und Yu 2015). Intratumorale Heterogenität entsteht auf zeitlicher sowie räumlicher Basis und somit treten

zwischen Absiedlungen und dem PT auch molekulargenetische Unterschiede auf. Aufgrund dessen ist eine einzelne Gewebeprobe eines Tumors zur Einschätzung des molekulargenetischen Profils, Herstellung von spezifischen Tumormarkern und Planung von individualisierter Therapie evtl. nicht ausreichend (Gerlinger et al. 2012). Dies könnte einen Vorteil der *Liquid Biopsy* gegenüber der Gewebebiopsie darstellen.

Beim OvCa konnten die bisherigen Studien zur cfDNA-Konzentration bestätigt werden – in zwei Studien konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an cfDNA bei Patientinnen mit OvCa signifikant höher als bei Patientinnen mit benignen ovariellen Tumoren und Kontrollpersonen war (Zachariah et al. 2008, Kamat et al. 2010). Da es beim OvCa hauptsächlich zur Streuung in die Bauchhöhle kommt, ist es realistisch, dass ctDNA auch in die Peritonealflüssigkeit oder den Aszites gelangt. Eine Untersuchung von ctDNA anhand p53-Mutationen bei OvCa-Patientinnen zeigte eine höhere ctDNA-Detektionsrate in der Peritonealflüssigkeit als im Plasma/Serum (Swisher et al. 2005). Anhand der ctDNA-Untersuchungen konnten sogar einige OvCa im Frühstadium bei noch unauffälliger Peritonealzytologie entdeckt werden. ctDNA im Serum/Plasma trat deutlich seltener auf und wurde beim OvCa mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert (Swisher et al. 2005).

1.3 Epigenetik: DNA-Methylierung

1.3.1 DNA-Methylierung und CpG-Inseln

Epigenetische Veränderungen werden als mitotisch und/oder meiotisch vererbare Veränderungen des Chromatins und der Genfunktion, welche nicht auf eine Veränderung der eigentlichen DNA-Sequenz zurückzuführen sind, definiert (Bird 2002, Jones et al. 2015). Es dient als Überbegriff für Veränderungen wie Histonmodifikation, nichtkodierende (mikro-)RNA und DNA-Methylierung (Jones et al. 2015).

DNA-Methylierung findet an CpG-Dinukleotiden (5'-CpG-3') statt. Dabei wird eine Methyl-Gruppe von SAM (S-Adenosyl-Methionin) kovalent an die fünfte Stelle des Pyrimidinringes des Cytosins gebunden (Hervouet et al. 2018). CpG-Dinukleotide finden sich vereinzelt im Genom und sind meistens methyliert, kommen aber auch gehäuft in sog. CpG-Inseln vor, welche >200bp lang sind, einen GC-Gehalt (Guanin-Cytosin-Gehalt) von über 50% beinhalten, eine erhöhte CpG-Dichte (beobachtet/erwartet >0,6) haben und v.a. in der Promotorregion von Genen aufzufinden sind. Die CpG-Inseln treten in Assoziation mit den Promotorregionen von ca. 70% der konstitutiv exprimierten und gewebsspezifischen Gene im Genom auf, tragen zur Regulierung der transkriptionellen Genaktivität bei und sind in gesunden somatischen Zellen i.d.R. unmethyliert (Bird 1986, Jones und Baylin 2002, Saxonov et al. 2006, Jones et al. 2015). Trotzdem spielt die

CpG-Insel-Methylierung eine wichtige Rolle für die entwicklungs- und gewebsspezifische Genexpression in biologischen Vorgängen wie der embryonalen Entwicklung, der genomischen Prägung (allelspezifische Genexpression), der X-Chromosom-Inaktivierung, der Unterdrückung von Transposons und dem Altern (Jones et al. 2015, Hervouet et al. 2018). Im höheren Alter kommt es zu einer allgemeinen, genomweiten Hypomethylierung und CpG-Insel-spezifischen Hypermethylierung. Der Methylierungsstatus bestimmter CpG-Inseln ist stark altersabhängig, sodass er sogar als Altersindikator genutzt werden kann, als sog. epigenetische Uhr (Jones et al. 2015).

Die Hypermethylierung der CpG-Inseln in Promotorregionen von Genen kann jedoch über eine Verhinderung der Gentranskription zu einem Verlust der Genfunktion, der Gen-Stillegung (vom engl. *gene silencing*), führen und derart – bei Vorkommen in der Promotorregion eines Tumorsuppressorgens – die Tumorentstehung begünstigen (Jones und Baylin 2002). Dadurch gewinnt die DNA-Methylierung an klinischer Relevanz und ist ein vieluntersuchtes Thema der aktuellen Forschung (Baylin und Jones 2011, Klutstein et al. 2016).

DNA-Methylierung wird durch Enzyme namens DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert, wovon mehrere Subgruppen bekannt sind: DNMT3A und DNMT3B sind hauptsächlich für *De-novo*-Methylierungen in der Embryogenese und DNMT1 für die Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus während der Replikation verantwortlich, jedoch kooperieren die Gruppen miteinander und teilen sich diese Funktionen zu einem gewissen Grad auch (Jones und Baylin 2002, Jeong et al. 2009, Hervouet et al. 2018). Die Konzentration von DNMTs in somatischen Zellen unterliegt einer gewissen Regulierung – methylierte CpG-Dinukleotide stabilisieren die Bindung von DNMT3A/B an Nukleosomen und garantieren so die Weitergabe des Methylierungsmusters an Tochterzellen, während in Abwesenheit von Methylierung die Bindung weitestgehend verhindert wird und die ungebundenen DNMT3A/Bs abgebaut werden, um aberrante *De-novo*-Methylierung zu verhindern (Sharma et al. 2011). Bei der Tumorentstehung durch DNA-Methylierung kommt es zu einer Dysregulation dieses Systems und *De-novo*-Methylierungen werden durch virale Onkoproteine und andere Komplexe wie Proteine der Polycomb-Gruppe, welche die DNA-Bindung der DNMTs begünstigen, verursacht – jedoch ist der genaue Vorgang noch nicht bekannt (Hervouet et al. 2018). Es wird eine Überexprimierung von DNMTs in Tumorzellen beschrieben (De Marzo et al. 1999, Robertson et al. 1999).

1.3.2. Tumorspezifische DNA-Methylierung

Die Mechanismen der Entartung, also der Transformation einer normalen Zelle mit strenger Wachstums- und Teilungsregulierung in eine Tumorzelle, sind seit längerer Zeit schon ein

wichtiges Thema in der Forschung. Es gibt viele genetische und epigenetische Veränderungen in Tumorzellen als Grundlage der malignen Transformation und Entstehung der Charakteristika von Tumorzellen. Tumorzellen sind sehr empfindlich gegenüber proliferativen Wachstumsfaktoren und können diese aufrechterhalten; außerdem können sie Wachstumsinhibitoren herunterregulieren. Weitere Charakteristika von Tumorzellen sind die Resistenz gegen Apoptose, das unbegrenzte Replikationspotential sowie die Fähigkeit zur Metastasierung und Induktion von Angiogenese (Hanahan und Weinberg 2011).

Die DNA-Methylierung ist ein wesentlicher epigenetischer Vorgang, der zur Tumorentstehung beitragen kann. Wie bei den epigenetischen Veränderungen im Zuge des Alterns wird auch bei Tumorzellen neben der promotorspezifischen Hypermethylierung eine genomweite Hypomethylierung, die zur genomischen Instabilität beiträgt, beobachtet (Berdasco und Esteller 2010, Klutstein et al. 2016). Aufgrund der genomischen Instabilität und Stilllegung von gewebsspezifischen Genen wird die DNA-Methylierung oft als initiales Ereignis der Krebsentstehung angesehen (Klutstein et al. 2016). Das methylierte Cytosin, genannt 5-Methylcytosin, ist selbst auch anfällig für Mutationsereignisse durch spontane hydrolytische Desaminierung oder äußere Einflüsse wie UV-Strahlung und könnte auf diese Weise ebenso eine genetische Veränderung hervorrufen (Jones und Baylin 2002, Hervouet et al. 2018).

Obwohl die meisten der betroffenen Gene, die relevant für die Entwicklung und Differenzierung von Gewebe sind, im normalen Gewebe den Großteil der Zeit transkriptionell nicht aktiv sind, verhindert die *De-novo*-Methylierung vermutlich deren spätere Aktivierung und demnach die Differenzierung der Zelle, sodass ein proliferativer, undifferenzierter Zustand entsteht und die Transformation einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle begünstigt wird (Klutstein et al. 2016). Im Genaueren führt die DNA-Hypermethylierung in genregulatorischen Sequenzen zu einer Umstrukturierung (stärkeren Verpackung) des Chromatins und verhindert so die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Die Umstrukturierung des Chromatins geschieht durch die Bindung von methylierungsassoziierten Proteinen, sog. MBD-Proteinen (vom engl. *Methyl-CpG binding domain proteins*), welche Komplexe mit Histondeacetylasen (HDACs) bilden und so eine Chromatinkondensierung bewirken (Rountree et al. 2001, Meng et al. 2015). Obwohl noch nicht genau bekannt ist, ob die DNA-Methylierung das erste Ereignis der Tumorentstehung ist oder ob sie durch andere tumorassoziierte Faktoren oder Replikationsanomalien begünstigt wird, ist sie jedenfalls als ein wesentliches Ereignis in der Tumorentstehung zu betrachten (Rountree et al. 2001). Cameron et al. konnten an einer Kolorektalkarzinom-Zelllinie mit CpG-Insel-Hypermethylierung zeigen, dass die Zugabe des Histondeacetylase-Inhibitors TSA (Trichostatin A) und des DNMT-Inhibitors 5-Azadeoxycytidin (5Aza-dC) einen synergistischen Effekt hatte – die Methylierung konnte reduziert und die transkriptionelle Inaktivierung aufgehoben werden.

Somit zeigte sich die Hypermethylierung als teilweise reversibel und unterstützte die These des Einflusses von DNMTs und Histondeacetylasen bei der Stilllegung von Tumorsuppressorgenen bei Krebserkrankungen (Cameron et al. 1999). Solche Befunde bieten eine Grundlage zur Forschung an tumorspezifischen DNA-Methylierungsmustern als diagnostische Marker sowie auch Histondeacetylase-Inhibitoren und 5-Azanucleoside (DNMT-Inhibitoren) als potenzielle epigenetische Therapien (Baylin und Jones 2011, Smith et al. 2017).

Das OvCa wurde schon in mehreren Studien auf sein Methylierungsmuster untersucht und das Methylierungsmuster im OvCa-Gewebe unterscheidet sich zum normalen Ovar- und Tubengewebe – mit promotorspezifischer Hypermethylierung und allgemeiner Hypomethylierung, vor allem von repetitiven DNA-Sequenzen, im Tumorgewebe (Watts et al. 2008, Reyes et al. 2019). Bei *Melnikov et al.* konnten tumorspezifische Methylierungsmuster ebenso in cfDNA von Blutproben identifiziert werden (Ahluwalia et al. 2001, Melnikov et al. 2009). In einer Studie von *Toyota et al.* wird ein tumorspezifischer CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP) beschrieben, also das Vorkommen von Methylierungsereignissen in bestimmten CpG-Inseln, welche einer Zelle einen Wachstumsvorteil und somit ein erhöhtes Malignitätspotential verleihen (Toyota et al. 1999, Ahluwalia et al. 2001). Auch beim OvCa konnten solche Phänotypen, bei denen ganz bestimmte (und nicht zufällige) Genloci methyliert sind, beschrieben werden (Strathdee et al. 2001, Huang et al. 2013b). Deswegen sind tumorspezifische Methylierungsmuster eine vielversprechende Möglichkeit zur Forschung und Entwicklung von epigenetischen Tumormarkern für das OvCa.

1.4. Biomarker für das Ovarialkarzinom

Mit zunehmendem Verständnis für die genetischen/epigenetischen Veränderungen während der Tumorentstehung und -proliferation entsteht die Möglichkeit, diese Veränderungen in Form von Biomarkern zur Diagnostik zu verwenden. Somit werden in der Krebsforschung zunehmend molekularbiologische Verfahren verwendet, um diese tumorspezifischen Veränderungen (z.B. veränderte Transkriptionslevels spezifischer Gene, posttranslationale Proteinmodifikation) zu messen und zu bewerten (Kalia 2015).

Ein Biomarker kann ein Bestandteil der Tumorzelle selbst, wie ein Gen / ein Genprodukt, oder auch eine krankheitsassoziierte Substanz, wie ein Enzym oder ein Hormon, sein. Das Auftreten oder die veränderte Konzentration des Biomarkers spiegelt die Entstehung oder die Aktivität der Krankheit wider. Biomarker können diagnostisch sein und der Diagnose einer Krankheit dienen oder prognostisch bzw. prädiktiv sein, in welchem Fall sie eher zur Verlaufskontrolle und Therapieplanung geeignet sind (Kalia 2015). Beim OvCa besteht ein besonderes Interesse an

einem diagnostischen Biomarker, der den Tumor auch in frühen Stadien sensitiv detektieren kann. Ein diagnostischer Biomarker für das OvCa sollte einen PPV von mindestens 10% haben, sodass höchstens zehn operative Interventionen zur Diagnose eines tatsächlichen OvCa gemacht werden müssen. Um dies zu erreichen und den Screening-Biomarker als klinische, diagnostische Methode zu etablieren, müsste er eine SEN von mindestens 75% und eine SPE von mindestens 99,6% haben (Bast 2004).

Der bisher am meisten untersuchte Tumormarker für das OvCa ist das Glykoprotein CA125. Aktuell gilt es als Goldstandard für die Therapieüberwachung und Verlaufskontrolle (Gupta und Lis 2009). Je nach Tumorstadium zeigt sich eine CA125-Erhöhung in 50 – 62% (Frühstadium) bis 90% (fortgeschrittenes Stadium) (Nossov et al. 2008). CA125 wurde schon gehäuft in Studien als diagnostischer Biomarker untersucht; da es jedoch bei ca. 20% der OvCa-Patientinnen nicht signifikant erhöht ist und in Frühstadien nur bei ca. 50% erhöht ist, eignet es sich nicht zur Früherkennung und Abklärung ovarieller Raumforderungen (Bast et al. 2005, Kobayashi et al. 2012, Stiekema et al. 2014). Der CA125-Anstieg beim OvCa scheint auch abhängig vom histologischen Subtyp zu sein und tritt beim muzinösen OvCa viel seltener als beim serösen OvCa auf (Duffy et al. 2005). Gemessen im Serum von OvCa-Patientinnen < 6 Monate vor Diagnosestellung zeigte CA125 bei einer SPE von 95% eine SEN von 86% (Cramer et al. 2011). Die Mehrzahl der relevanten Studien messen CA125 und andere Marker zum Zeitpunkt (oder kurz vor) der Diagnosestellung, bei klinisch auffälligen Patientinnen oder in OvCa-Risikogruppen, sodass CA125 als Screening-Marker für asymptomatische Probandinnen nicht empfohlen wird (Jacobs und Menon 2004). Da CA125 auch bei anderen Krebsentitäten, bei benignen gynäkologischen Erkrankungen wie Endometriose oder auch in der Schwangerschaft erhöht sein kann, besteht ein erhöhtes Risiko für falsch-positive Diagnosen (Duffy et al. 2005, Kobayashi et al. 2008). Mehrere Versuche, CA125 mit TVU in einer Screening-Methode zu kombinieren, erreichten nicht die notwendige SEN/SPE (Kobayashi et al. 2008, Buys et al. 2011, van Nagell et al. 2011, Jacobs et al. 2016).

Eine Kombination von mehreren Serum-(Glyko-)proteinen wie Osteopontin, Leptin, IGF-II und Prolaktin mit CA125 zeigte wiederum signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen OvCa- und Kontrollproben, sodass eine SEN von 95,3% und eine SPE von 99,4% erreicht werden konnte (Visintin et al. 2008). Weitere im Blut befindliche Biomarker wie CEA, CA15-3 oder CA72-4 zeigten keinen Vorteil gegenüber CA125 (Kobayashi et al. 2012).

Ein weiterer Marker im Blut, der vielfach untersucht wurde, ist HE4: Das HE4-Gen wird beim OvCa sowie bei benignen Ovarneoplasmen überexprimiert, beim OvCa jedoch zu einem signifikant höheren Grad (Moore et al. 2008). Insbesondere im frühen Stadium zeigte HE4 als alleiniger Marker eine höhere SEN und SPE als CA125. CA125 und HE4 separat hatten bei einer

SPE von 95% eine SEN von ca. 43% bzw. 72,9%. Eine Kombination der beiden Marker ermöglichte eine Steigerung der SEN auf 76,4%. Es wurde in dieser Studie von *Moore et al.* jedoch ein deutlicher Altersunterschied zwischen den OvCa- und Kontrollgruppen beschrieben, welcher die Werte beeinflusst haben könnte (Moore et al. 2008). Es sind also weitere Studien zur Validierung dieser Methode notwendig. Eine spätere Studie beschreibt HE4 ebenso als überlegenen Biomarker im Vergleich zu CA125 und Risiko-Algorithmen wie ROMA (vom engl. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*), jedoch stellen die relativ kleine Kontrollgruppe und das retrospektive Studiendesign Limitationen dieser Studie dar (Stiekema et al. 2014).

Eine andere Biomarkerklasse, welche aktuell in Studien untersucht wird und teilweise vielversprechende Ergebnisse zeigt, ist die der tumorspezifischen DNA-Methylierungsmuster. Hierbei wird v.a. das Methylierungsmuster von CpG-Inseln von Genen, die eine Rolle bei der Proliferation, dem Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose spielen, untersucht (Teodoridis et al. 2005).

Im vorigen Abschnitt „1.3.2. Tumorspezifische DNA-Methylierung“ wurde die promotorspezifische Hypermethylierung in Gewebe und cfDNA des OvCa und das Auftreten von tumorspezifischen CpG-Insel-Methylierungsphänotypen (CIMP) besprochen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits Tumorgewebe sowie cfDNA aus Blut oder Peritonealflüssigkeit auf tumorspezifische Methylierungsmuster für potenzielle diagnostische sowie prognostische Biomarker untersucht. *Ibanez de Caceres et al.* untersuchten 2004 das Tumorgewebe sowie cfDNA von Blutproben und Peritonealflüssigkeiten bei OvCa-Patientinnen auf Promotormethylierung von sechs Genen verglichen mit gesunden Kontrollpatientinnen. Sie fanden bei den OvCa-Proben vor allem eine Hypermethylierung der Promotorregionen der Tumorsuppressorgene BRCA1 und RASSF1A und eine hohe Übereinstimmung der cfDNA von Blutproben (82%) und, ab FIGO-Stadium IC, von Peritonealflüssigkeit (28 von 30 Proben) mit dem Methylierungsmuster des entsprechenden Tumorgewebes. Bei den Kontrollproben konnte in den sechs untersuchten Promotorregionen keine Hypermethylierung nachgewiesen werden (Ibanez de Caceres et al. 2004). Die Hypermethylierung der Promotorregionen von BRCA1/RASSF1A bei OvCa-Patientinnen wurde in späteren Studien ebenso beobachtet, dennoch fehlen Studien mit größeren Probenkollektiven zur Validierung der bis dato schwankenden Methylierungsfrequenz (Shi et al. 2013, Wang et al. 2013). Eine Studie der Arbeitsgruppe *Liggett et al.* zeigte ebenfalls potenzielle Biomarkerkombinationen von cfDNA aus Blutproben – anhand von *Microarray*-Analysen von OvCa-Proben, benignen Erkrankungen und gesunden Kontrollproben konnte mit den drei Methylierungsmarkern RASSF1A, CALCA und EP300 zwischen OvCa und gesunden Kontrollpatientinnen unterschieden werden und dies mit einer SEN

von 90% und SPE von 86,7%. Weiterführend konnte mit RASSF1A und PGR-PROX zwischen OvCa und benignen Erkrankungen mit 80% SEN und 73,3% SPE unterschieden werden (Liggett et al. 2011). Da jedes Probenet nur 30 Proben enthielt, müssten die genannten Marker jedoch noch in größeren Kollektiven validiert werden. Eine weitere Studie fand dagegen eine eher variable Methylierung von RASSF1A ohne statistische Signifikanz im Vergleich von gesunden und OvCa-Gewebeproben sowie den dazugehörigen Plasmaproben, jedoch zeigten die CDH1- und PAX1-Gene eine statistisch signifikant stärkere CpG-Insel-Methylierung in OvCa-Gewebeproben gegenüber gesunden Kontrollen, und CDH1 ebenso in den Plasmaproben. CDH1 wird demnach als potenzieller Biomarker für OvCa im Rahmen von *Liquid Biopsies* vorgeschlagen, jedoch wird auch hier die Aussagekraft durch ein begrenztes Probenet von insgesamt 78 Gewebe- und 50 Plasmaproben geschwächt (Dvorska et al. 2019). Einige der genannten Gene finden sich in dem Multiplex-MSP-Assay von *Zhang et al.* wieder, welcher anhand von Bestimmung der Methylierung von sieben Kandidatengen (APC, RASSF1A, CDH1, RUNX3, TFPI2, SFRP5 und OPCML) in cfDNA aus Serumproben retrospektiv zwischen OvCa und benignen Kontrollproben mit einer SEN bzw. SPE von 89,7% bzw. 90,6% unterscheiden konnte. In allen Kategorien erreichte der MSP-Assay eine höhere SEN/SPE als CA125 (Zhang et al. 2013).

Huang et al. identifizierten 2013 577 DNA-Regionen mit tumorspezifischem Methylierungsmuster, anhand derer zwischen benignem/gesundem Ovargewebe und OvCa unterschieden werden konnte. Hier wurden auch 63 potenzielle prognostische Biomarker, welche mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert waren, beschrieben. Bei den prognostisch-relevanten Regionen handelte es sich vor allem um die Promotorregion von Genen des Hedgehog-Signalweges wie ZIC1 / ZIC4 (Huang et al. 2013b). Des Weiteren ist die Promotormethylierung von HOXA11, MLH1, RUNX3 und CAMK2N1 mit einer schlechten Prognose und MLH1-Methylierung zusätzlich mit einer verstärkten Chemoresistenz assoziiert (Fiegl et al. 2008, Gloss und Samimi 2014, Hafner et al. 2016).

Die tumorspezifischen Methylierungsmuster unterscheiden sich vermutlich je nach histologischem Subtyp, bzw. treten bestimmte Methylierungsmarker häufiger bei einem histologischen Subtyp des OvCa auf (Earp und Cunningham 2015). BRCA1- und HNF1B-Hypermethylierung tritt z.B. mit einer signifikant höheren Frequenz bei serösen OvCa auf (Shen et al. 2013, Gloss und Samimi 2014, Koukoura et al. 2014).

Das Gen TBX15 spielt eine Rolle in der mesodermalen Differenzierung und zeigte in einer Studie je nach histologischem Subtyp in 74 – 88% von OvCa-Proben eine Hypermethylierung. Der höchste Prozentsatz (88%) wurde bei endometrioiden OvCa gemessen. Eine epigenetische Stilllegung des TBX15-Gens könnte die Tumorentstehung begünstigen und immunhistochemisch

konnte bei Proben mit hohem Methylierungsgrad eine fehlende Proteinexpression von TBX15 nachgewiesen werden (Gozzi et al. 2016).

Es gibt viele weitere Gene, die im Zusammenhang mit tumorspezifischer Methylierung beim OvCa untersucht wurden und potenzielle Biomarker darstellen; es wurden hier nur ausgewählte genannt. Allerdings sind Studien mit größeren Probensets und unterschiedlichen Markerkombinationen notwendig, um sich der Möglichkeit eines klinisch anwendbaren diagnostischen Tests mit ausreichender SPE und SEN anzunähern. Es wird jedoch durch die bisherigen Studien deutlich, dass ein einzelner Methylierungsmarker zur sicheren Differenzierung von Ovarneoplasmen nicht ausreichen wird, sondern eine Kombination mehrerer Marker notwendig ist. Einige der bisher getesteten Kombinationen sind vielversprechend und konnten eine höhere SEN und SPE als CA125 erreichen (Gloss und Samimi 2014).

Ein großer Vorteil der DNA-Biomarkerklasse ist die Stabilität des Methylierungsstatus, auch über längere Zeiträume: So können Patientenproben eingefroren werden und zu einem späteren Zeitpunkt kann die DNA noch sicher isoliert, amplifiziert und dann nachgewiesen und analysiert werden (Melnikov et al. 2009, Koukoura et al. 2014). Weiterhin würde die Identifizierung eines sensitiven und spezifischen cfDNA-Biomarkers aus Blut oder Peritonealflüssigkeit die Etablierung eines minimal-invasiven Tests ermöglichen und könnte die Anzahl an „überflüssigen“ operativen Eingriffen bei unklaren ovariellen Raumforderungen reduzieren (Kamat et al. 2006, Zhang et al. 2011).

2. Ziele der Arbeit

Das Ovarialkarzinom ist bis heute eine Erkrankung, die aufgrund fehlender Frühsymptomatik und diagnostischen Schwierigkeiten eine hohe Mortalität aufweist. Frauen mit einer ovariellen Raumforderung müssen sich i.d.R. einer Operation unterziehen, um zu erfahren, ob es sich um eine maligne (wie das OvCa) oder um eine benigne (z.B. eine Ovarialzyste) Raumforderung handelt. Dies ist für die Patientinnen mit OP-Risiken und -Nebenwirkungen sowie der psychischen Belastung einer möglichen Krebsdiagnose verbunden. Darüber hinaus könnten Patientinnen von einer weiterführenden Diagnostik und Behandlung in einem Schwerpunkt- oder Universitätsklinikum profitieren, wenn präoperativ eingeschätzt werden kann, ob es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine maligne Raumforderung handelt, da die Therapie in einem Schwerpunkt- oder Universitätsklinikum mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist. Deswegen stellen Biomarker für das OvCa, welche anhand eines kostengünstigen minimal-invasiven Tests in Blut oder Bauchraumspülflüssigkeit bestimmt werden könnten, eine interessante Möglichkeit in der Forschung nach verbesserter Diagnostik des OvCa dar.

Es wurden bereits einige potenzielle Marker basierend auf Hypermethylierung bestimmter CpG-Inseln beschrieben, allerdings erreichen die meisten nicht die erwünschte hohe diagnostische SEN und es fehlen noch größere Studien zur Validierung der Marker. Aufgrund dessen war das Ziel dieser Arbeit die Etablierung ausgewählter methylierungsspezifischer Marker, die anhand von Bauchraumspülflüssigkeiten zwischen OvCa und benignen Kontrollproben unterscheiden könnten. Dies soll als ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einer verbesserten Diagnostik des OvCa dienen und die bisherigen Forschungsergebnisse in diesem Gebiet erweitern. Dafür wurden methylierungsspezifische Primerpaare ausgewählt und anhand methylierungsspezifischer qPCR, also qMSP, an cfDNA von OvCa- sowie benignen Kontrollproben etabliert. Zusätzlich wurden das Patientinnenalter, die Histologie, das FIGO-Stadium und eine vorherige Chemotherapie als potenzielle Einflussfaktoren des Methylierungsstatus untersucht und die Methylierungsmarker mit der zytologischen Diagnostik verglichen und kombiniert. Schließlich wurden Unterschiede im Methylierungsstatus zwischen der cfDNA, dem Zellpellet und dem Tumorgewebe beschrieben und die intratumorale Heterogenität der Gewebeproben untersucht. Diese Untersuchungen sollen zu einem besseren Verständnis der DNA-Methylierung beim OvCa und deren potenziellen Einflussfaktoren beitragen.

3. Methodik

3.1. Materialien

3.1.1. Patientenproben

In dieser Arbeit wurden 181 Bauchraumflüssigkeiten (Aszites, Spülflüssigkeit), 124 Zellpellets und 35 Gewebeproben (von PT und Absiedlungen) von insgesamt 196 weiblichen Patientinnen, die in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Fortpflanzungsmedizin am Universitätsklinikum Jena operiert und behandelt wurden, verwendet. Ein entsprechend genehmigter Ethikantrag (Nr. 2582-06/09) und die Einwilligungen der Patientinnen liegen vor. Die Altersspanne der Patientinnen betrug 12 – 84 Jahre, mit einem Mittelwert von 55 Jahren und einem Median von 54 Jahren. Das Probenmaterial der Bauchraumflüssigkeiten wurde zu Beginn des operativen Eingriffes durch Spülung der Bauchhöhle entnommen. Durch Zentrifugation dieser Proben wurden die Zellen von der cfDNA getrennt und separat bis zur DNA-Isolation bei -30°C gelagert. Die Gewebeproben, bestehend aus Biopsiematerialien vom PT und Metastasen des OvCa, wurden nach der Entnahme in Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert. Die Proben wurden in ein Etablierungsset und ein Validierungsset aufgeteilt; die Spezifikation und Gruppeneinteilung der Proben sind für das Etablierungsset in Anhang Tab. II auf Seite I und das Validierungsset in Anhang Tab. III auf Seite III im Anhang aufgelistet.

3.1.2. Chemikalien

Die Chemikalien, die vor allem bei der DNA-Isolierung (siehe S. 30), der Bisulfit-Behandlung (siehe S. 32), der DNA-Methylierung (siehe S. 36), der qMSP (siehe S. 37) und der Agarose-Gelelektrophorese (siehe S. 40) eingesetzt wurden, werden in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Tabellarisches Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG
DNA Gel-Ladepuffer 6x	Thermo Fisher Scientific
Ethanol (96%, 75%, 70%)	J.t. Baker / Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific

Bezeichnung (Fs.)	Hersteller (Fs.)
Glykogen	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol (100%, 45%)	Merck KGaA
Natriumacetat	Merck KGaA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumiodid	Merck KGaA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Carl Roth GmbH & Co. KG
RNase/DNase freies Wasser (für PCR-Ansatz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Wasser, bidestilliert, ultrarein für PCR	Thermo Fisher Scientific

3.1.3. Geräte

Eine Übersicht der verwendeten Geräte wird in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Tabellarisches Verzeichnis der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems
Autoklav (Selectomat PL)	Münchener Medizin Mechanik GmbH
Elektrophoresesystem	SERVA Electrophoresis GmbH
Feinwaage	Satorius AG
Kühl- und Gefrierschrankskombination	Liebherr-Hausgeräte Lienz GmbH
Mastercycler Gradient PCR-Gerät	Eppendorf AG
Megafuge 1.0/1.0R	Heraeus
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Pipetten	Eppendorf AG, Gilson AG
Pipetten 5 – 25ml, Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Sterilwerkbank SterilGARD®	Baker and Baker Ruskin
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R/5427R	Eppendorf AG
UV-Geldokumentationssystem (DH-30/31)	Biostep GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc.
Wasseraufbereitungsanlage (ddH ₂ O)	Millipore, Christ

3.1.4. Kommerzielle Kits und Enzyme

Die kommerziellen Kits und Enzyme, die vor allem bei der DNA-Isolierung (siehe S. 30), der Bisulfit-Behandlung (siehe S. 32), der DNA-Methylierung (siehe S. 36) und der qMSP (siehe S. 37) eingesetzt wurden, werden in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Tabellarisches Verzeichnis der verwendeten Kits und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
CpG Methyltransferase (M. SssI), S-adenosylmethionin (SAM), NEBuffer 2	New England BioLabs
DirectPCR® DNA Extraction System	Viagen Biotech Inc.
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research
FastStart Universal SYBR Green Master Mix	Roche AG
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG

3.1.5. Primerpaare für qMSP-Analysen

Die zehn untersuchten MSP-Primerpaare sowie das β -Aktin-Primerpaar werden in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Tabellarisches Verzeichnis der MSP-Primerpaare

Sequenzen, Produktgröße und *Annealing*-Temperatur (T_A) der verwendeten MSP-Primerpaare und Primerpaar für β -Aktin. *Forward* (fw) und *Reverse* (rv) Primer sind gekennzeichnet.

MSP-Primer	fw/rv	Sequenz 5'→3'	Produktgröße	T_A
NKX2-8	fw	TTAACGCGTCGGGATAAATC	110bp	57,0°C
	rv	CAAAACCGCGAAAAAACG		
NKX6-1	fw	GCGTGATTTTTTCGTCGTTC	138bp	60,0°C
	rv	ACGCTACCGAAATAACCACG		
NR2F2	fw	GGGATTCGTTTTAGTTTAGC	104bp	55,2°C
	rv	CACGACAACCTATCGTCCG		
POU3F3(a)	fw	GAGATCGTACGTCGGTTTC	183bp	57,0°C
	rv	AACTAACTTAAAAACGCGAC		
POU3F3(b)	fw	GAAGCGTATGACGTCGTTC	113bp	60,0°C
	rv	CGCTCGTCTACAACCCG		
PRR15	fw	GTCGGAGTTGTTAGTATCGTC	113bp	55,0°C
	rv	CGACCTAAAACCACG		
SIM1	fw	TTTTATATTATCGCGGAGTTGC	109bp	-
	rv	AAAAATAAACGCCCCCG		
SOX21	fw	GCGTAGATTCGTGACGTTTGC	124bp	55,0°C
	rv	GTTCCAAATACGAACGAAACTACG		
SPAG6	fw	CGGTCGCGTTTCGGTTTC	126bp	61,5°C
	rv	GAAAAAACCGCTCGACCTACG		
SV2C	fw	ACGGATGGAATATATTCGC	139bp	55,0°C
	rv	GATCACACAAACGTATAACCG		
TBX15	fw	TTCGTTTTCGCGGGAGATTC	127bp	59,4°C
	rv	CTCGACGACGCCATCTACG		
β -Aktin	fw	TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT	133bp	60,0°C
	rv	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA		

3.1.6. Software

Die verwendete Software wird in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Tabellarisches Verzeichnis der verwendeten Software zur Erstellung und Auswertung von Daten

Bezeichnung	Hersteller
ABI 7300 SDS Software V 1.2	Applied Biosystems
Methyl Primer Express Software V 1.0	Applied Biosystems
ND-1000 3.2.1	NanoDrop Technologies
Primer Express Software V 2.0	Applied Biosystems
Statistiksoftware SPSS	IBM

3.2. Methoden

3.2.1. DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde je nach Ausgangsmaterial (Bauchraumflüssigkeit, Gewebe) anhand verschiedener Methoden durchgeführt. Für die Isolierung von zellfreier DNA wurde die Natriumiodid-Methode nach *M. Ishizawa et al.* eingesetzt (Ishizawa et al. 1991). Zur Isolierung der DNA aus Zellen (bei Gewebeschnitten, Zellpellets aus Bauchraumflüssigkeiten) wurde die klassische Phenol-Chloroform-Methode angewendet (Chomczynski und Sacchi 1987).

3.2.1.1. Isolierung zellfreier DNA mittels Natriumiodid

Ishizawa et al. entwickelten ursprünglich die Natriumiodid-Methode zur Isolierung geringer DNA-Mengen im Serum (Ishizawa et al. 1991). Diese Methode eignet sich jedoch ebenfalls gut für die Isolierung zellfreier DNA aus Bauchraumflüssigkeit, da sich hier auch geringe cfDNA-Mengen finden. Das Natriumiodid, ein chaotropes Salz, wird hierfür hochkonzentriert eingesetzt und führt zur Denaturierung von Proteinen. Anschließend wird mit Isopropanol eine Präzipitation der DNA bewirkt.

Für die Isolierung der cfDNA wurden 0,5 ml zellfreie Bauchraumflüssigkeit eingesetzt und mit 0,5 ml Enzym-Reaktionslösung (bestehend aus 1,43% SDS, 7,15 mM EDTA, 14,3 mM pH 8,0 Tris) und 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Der Reaktionsansatz wurde dann für 1 – 2 Stunden bei 56°C inkubiert. Dem Reaktionsgefäß wurde danach 1 µl Glykogen (20 mg/ml) hinzugefügt und nach gründlicher Mischung folgte eine erneute Inkubation von 2 – 3 Minuten bei Zimmertemperatur. Das Glykogen dient als inerter Träger und Fällungshilfe, und erhöht die Effizienz der DNA-Isolierung (Hengen 1996). Nach Zugabe von 1 ml Natriumiodid (9 M), welches die Denaturierung der Proteine bewirkt, wurde der Ansatz auf zwei 2 ml

Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zur Präzipitation der DNA wurde beiden Reaktionsgefäßen 1 ml Isopropanol zugegeben. Die präzipitierte DNA wurde dann durch 25-minütige Zentrifugation (bei $9500 \times g$) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das resultierende DNA-Pellet wurde mit 1 ml 45%igem Isopropanol gewaschen und bei $10000 \times g$ für 20 Minuten zentrifugiert, dann erneut mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und bei $10000 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt abgenommen. Das Pellet mit der DNA wurde anschließend getrocknet und in einem der zwei zusammengehörigen Reaktionsgefäße mit 50 μ l Tris (10 mM, pH 8,0) gelöst. Nach einer Stunde unter regelmäßigem Schütteln wurden die 50 μ l Tris mit der gelösten DNA in das zweite, dazugehörige Reaktionsgefäß mit dem getrockneten DNA-Pellet überführt. Somit befand sich die gesamte DNA aus den 0,5 ml der Bauchraumflüssigkeitsprobe in einem Reaktionsgefäß in 50 μ l Tris gelöst. Alle Schritte ohne Temperaturangabe erfolgten bei Raumtemperatur (RT). Die DNA konnte nach der Isolierung entweder direkt in der Bisulfit-Behandlung eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.1.2. DNA-Isolierung aus Gewebe- und Zellmaterial

Die DNA-Isolierung aus Gefrierschnitten von Biopsie-Material und aus Zellfraktionen der Bauchraumflüssigkeiten wurde mittels der Phenol-Chloroform-Methode durchgeführt. Es wurden zehn Gewebeschnitte à 12 μ m und Zellpellets von Bauchraumflüssigkeiten aus ca. 12 ml eingesetzt.

Das Ausgangsmaterial wurde mit 5 μ l Proteinase K (100 mg/ml) in 0,5 ml Verdauopuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 25 mM EDTA, pH 8,0, 0,5% SDS) in einem 2 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Für den Aufschluss der Zellen wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 56°C geschüttelt. Nach dem Proteinverdau erfolgte dann das Abtrennen der Proteinfragmente von der DNA durch die Zugabe von und Durchmischung mit 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 25:24:1). Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Es bildeten sich durch die unterschiedliche Löslichkeit der Proteine in Phenol bzw. der DNA in Wasser drei Phasen im Reaktionsgefäß. Durch Zugabe und Vermischung des wenig polaren Phenols in den wässrigen Reaktionsansatz entstand eine Emulsion, in der die Proteine denaturierten und in die phenolhaltige Phase übergingen. Chloroform unterstützte die Proteindenaturierung und trug durch seine hohe Dichte zur Phasentrennung bei und Isoamylalkohol reduzierte die Schaumbildung bei der Durchmischung. Somit fand sich eine untere organische Phase mit Phenol/Chloroform, welche eine höhere Dichte und einen geringeren Proteinanteil als die wässrige Phase aufwies. Die mittlere Phase bestand vor allem aus der Masse der denaturierten Proteine, gefolgt von der oberen wässrigen Phase mit der DNA. Die obere wässrige Phase wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß

überführt. Die anschließende DNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 7,5 mM Ammoniumacetat und dem 2-fachen Volumen kaltem 96%igem Ethanol, gefolgt von einer 30-minütigen Lagerung bei -80°C. Die Sedimentation des DNA-Pellets wurde dann durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 14000 rpm durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nach Waschen mit 70%igem Ethanol getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl Tris/HCl (10 mM, pH 8,0) aufgenommen und über Nacht im Puffer gelöst. Alle Schritte ohne Temperaturangabe erfolgten bei RT. Für diese Isolierungsmethode gilt ebenfalls, dass die DNA entweder direkt für die Bisulfit-Behandlung zur Verfügung stand oder für spätere Analysen bei -20°C gelagert wurde.

3.2.2. Messung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA von der Phenol-Chloroform-Methode wurde von jeder Probe 1 µl Eluat mit dem NanoDrop® Spektrophotometer vermessen. Durch Lichtabsorption einer bestimmten Wellenlänge wurde die optische Dichte der Lösung bestimmt. Die Lichtabsorption der DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die spektrometrische Messung gab auch Aufschluss über den Grad der Verunreinigung der Probe; hierfür wurden die Absorptionen bei 280 nm und 230 nm ins Verhältnis zur gemessenen Absorption der DNA bei 260 nm gesetzt. Ein Parameter für die Kontamination der Probe durch in der Lösung enthaltene Proteine war der Quotient der Absorption aus 260 nm und 280 nm. Der Richtwert für saubere DNA liegt hierfür bei etwa 1,8. Weitere Kontaminationen durch Ethanol oder Salze wurden durch den Quotienten der Absorption von 260 nm und 230 nm angezeigt. Der dazugehörige Richtwert liegt bei 1,8 – 2,0.

3.2.3. Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA (gDNA)

Eine Schwierigkeit der Analyse und Messung von epigenetischen Veränderungen beruht darauf, dass sie keine Sequenzveränderungen der DNA bewirken. Somit würden Methoden zur Sequenzanalyse, wie man sie bei Genmutationen einsetzt, bei methylierter DNA keine Auffälligkeiten aufweisen. Jedoch lässt sich das Methylierungsmuster der gDNA mit einer Methode namens Bisulfit-Behandlung in eine Sequenzänderung umwandeln. Es kommt im Rahmen der Bisulfit-Behandlung zu einer Konvertierung von unmethylierten Cytosinbasen zu Uracil, während die methylierten 5-Methylcytosine nicht konvertiert werden. Somit kann anhand der Sequenz der resultierenden Bisulfit-DNA zwischen methylierten/unmethylierten Cytosinen unterschieden werden (siehe Abb. 1) (Frommer et al. 1992). Die DNA kann anschließend mittels PCR amplifiziert werden, wobei die methylierten 5-Methylcytosine als Cytosinbasen und die Uracilbasen als Thyminbasen repliziert werden (Kristensen und Hansen 2009). Anhand

methylierungsspezifischer Primer kann der Anteil an methylierter DNA detektiert und quantifiziert werden, was als quantitative methylierungsspezifische PCR, kurz qMSP, bezeichnet wird.

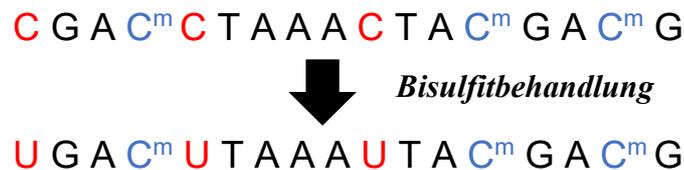


Abb. 1: Sequenzveränderung der DNA nach Bisulfit-Behandlung

Die Abbildung stellt eine beispielhafte Nukleotidsequenz vor (genomische DNA) und nach Bisulfit-Behandlung (Bisulfit-behandelte DNA) dar. Unmethylierte Cytosine (C) sind in Rot hervorgehoben und werden durch das Natriumbisulfit in Uracilbasen (U) konvertiert, ebenso in Rot hervorgehoben. 5-Methylcytosine (C^m) sind blau markiert und bleiben – wie dargestellt – unverändert, sodass nach der Bisulfit-Behandlung alle Cytosinbasen 5-Methylcytosine sind.

Die chemische Bisulfit-Behandlung erfolgte mit dem kommerziellen EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, welches eine Konvertierungseffizienz von > 99% garantiert. Somit werden > 99% von nicht-methylierten Cytosinbasen zu Uracil umgewandelt und > 99% der 5-Methylcytosinbasen als solche belassen. Die DNA-Extraktion beträgt > 75% beim Einsatz von 500 pg – 2 µg DNA. Die Bearbeitung der Proben mit dem EZ DNA Methylation™-Gold Kit erfolgte nach dem Herstellerprotokoll der Firma Zymo Research.

Die Methode besteht aus drei Teilschritten: (1) Sulfonierung, (2) hydrolytische Desaminierung und (3) alkalische Desulfonierung. Durch Natriumbisulfit wird Cytosin über das Zwischenprodukt Cytosin-Sulfat zu Uracil-Sulfat umgewandelt. Die anschließende alkalische Desulfonierung generiert das Endprodukt Uracil. Bei 5-Methylcytosin (5mC) blockiert die Methylgruppe am fünften Kohlenstoff-Atom des Pyrimidinringes die Sulfonierung, wodurch 5mC nicht modifiziert wird (siehe Abb. 2).

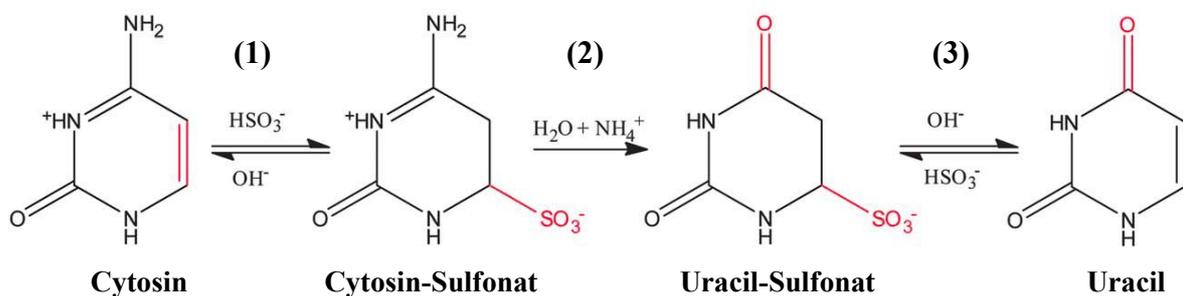


Abb. 2: Reaktionsschritte der chemischen Bisulfit-Behandlung

Die Abbildung stellt die durch Behandlung mit Natriumbisulfit ausgelöste chemische Konvertierung von Cytosin zu Uracil dar. Diese Konvertierung findet bei Anwendung der Methode des EZ DNA Methylation-Gold™ Kit statt. Schritt (1) ist die Sulfonierung von Cytosin mit dem Zwischenprodukt Cytosin-Sulfonat, Schritt (2) die hydrolytische Desaminierung mit Basenwechsel zu Uracil(-Sulfonat), und der anschließende Schritt (3) die alkalische Desulfonierung mit dem Endprodukt Uracil. Es erfolgt demnach eine Umwandlung des unmethylierten Cytosins zu Uracil. Ein methyliertes Cytosin, also 5-Methylcytosin, weist am fünften Kohlenstoffatom des Pyrimidinringes eine Methylgruppe auf und kann deswegen nicht sulfoniert werden. Es bleibt in der Bisulfit-Behandlung unverändert. (Abbildung modifiziert nach (Saheb et al. 2014)).

Bei den DNA-Proben von Gewebe- und Zellmaterial wurde die isolierte DNA vor der Bisulfit-Behandlung mit dem Nanodrop® photometrisch vermessen, um die DNA-Konzentration zu bestimmen und 1 µg DNA in der Bisulfit-Behandlung einsetzen zu können. Bei der zellfreien DNA von Bauchraumspülflüssigkeiten konnte die DNA-Konzentration photometrisch nicht gemessen werden, da die Natriumiodid-Isolationsmethode zu viele Verunreinigungen für die Messung bewirkt. Deswegen wurden von dem Eluat der zellfreien DNA jeweils 20µl in der Bisulfit-Behandlung eingesetzt. Das Elutionsvolumen der Bisulfit-DNA nach der Bisulfit-Behandlung betrug 40µl und konnte dann entweder sofort mit PCR analysiert oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.4. Methylierungsanalysen zur Detektion des OvCa

Epigenetische Veränderungen im OvCa wurden anhand quantitativer methylierungsspezifischer *Real-time*-PCR (qMSP) der isolierten, Bisulfit-behandelten DNA-Proben analysiert. Für die qMSP wurden methylierungsspezifische Primerpaare konzipiert, optimiert und anschließend in der *Real-time*-PCR benutzt.

3.2.4.1. Kandidatensuche und Datenbankrecherche

Primerkandidaten wurden anhand genomweiter Methylierungs-*Microarray*-Analysen identifiziert. Die *Microarray*-Analysen beschrieben die Positionen (Chromosom, Lokalisation der hypermethylierten CpG-Insel) von differentiell methylierten DNA-Abschnitten in DNA von OvCa verglichen mit gesundem Ovargewebe von Kontrollpatientinnen. Genomweite Methylierungs-*Array*-Analysen von OvCa- und Kontrollproben der Arbeitsgruppe „Gynäkologische Molekularbiologie“ des Universitätsklinikums Jena identifizierten mehrere hundert methylierte Kandidatengene und bildeten die Grundlage der Kandidatensuche. In zwei internationalen Studien mit vergleichbarer *Microarray*-Analyse-Methode wurden jeweils weitere hunderte Kandidatengene identifiziert (Michaelson-Cohen et al. 2011, Keita et al. 2013). Anhand eines Venn-Diagramms wurden 30 Kandidatengene bestimmt, die in allen drei *Microarray*-Analysen als hypermethyliert bei OvCa-Patientinnen ggü. gesundem Ovargewebe identifiziert wurden. Diese 30 Kandidatengene wurden mithilfe wissenschaftlicher Literatur aus frei zugänglichen Datenbanken überprüft. Es wurde recherchiert, ob die Gene bereits mit Bezug auf maligne Erkrankungen des Ovars beschrieben wurden oder ob spezifisch die Hypermethylierung dieser Gene in Verbindung mit anderen malignen Erkrankungen gebracht wurde. Im Fall der literaturbasierten Identifizierung pathologisch relevanter Kandidatengene mitsamt Beschreibung genauer Positionsinformationen wurde versucht, sich beim Primerdesign an der genannten Position zu orientieren. Somit wurden von 30 Kandidatengenen zehn relevante ausgewählt und

von diesen zehn Genen Primerpaare hergestellt, die zur Differenzierung von zellfreier DNA aus OvCa- und Kontrollpatientinnen dienen sollten.

3.2.4.2. Design methylierungsspezifischer Primerpaare

Für die Analyse des Methylierungsstatus der Bisulfit-behandelten DNA wurden methylierungsspezifische MSP-Primerpaare ausgewählt bzw. entworfen, die als Primerpaare in der qMSP agieren würden. Die ausgewählten und getesteten MSP-Primerpaare sind in Tab. 5 auf S. 29 dargestellt.

Um die Nukleotidsequenz der in 3.2.4.1 durch *Microarray*-Analysen ausgewählten Kandidatengene und CpG-Inseln zu erhalten, wurde die Datenbank des *UCSC Genome Browsers* (GRCh38) genutzt. Diese Nukleotidsequenz wurde anschließend im Programm *Methyl Primer Express* von Applied Biosystems eingesetzt. Das Programm wandelt die Nukleotidsequenz entsprechend einer Bisulfit-Behandlung um, sodass methylierte Cytosine weiterhin als „C“ und methylierte CpG-Inseln als CG-Abfolge erhalten bleiben. Unmethylierte Cytosine werden zu Uracil (U) umgewandelt, welches in späteren Amplifikationsschritten zu Thymin (T) umgeschrieben wird (zur beispielhaften Umwandlung einer Nukleotidsequenz siehe Abb. 1 auf S. 33). Das Programm empfiehlt anhand der umgewandelten Sequenz passende Primerpaare. Es wurden folgende Kriterien für die MSP-Primerpaare festgelegt: Die Primerlänge sollte zwischen 18 bp und 22 bp, die Größe des PCR-Produktes zwischen 100 bp und 175 bp und die *Annealing*-Temperatur (T_A) zwischen 56°C und 64°C sein. Des Weiteren sollten die MSP-Primer mindestens zwei CpG-Dinukleotide und zwischen vier und sieben unmethylierte Cytosine, die nach der Bisulfit-behandlung und Amplifizierung zu Uracil bzw. Thymin umgewandelt werden, enthalten. Falls möglich, wurde der Primer so gewählt, dass am 3'-Ende ein CpG-Dinukleotid stand. Dies erhöht die analytische SPE der nachfolgenden methylierungsspezifischen PCR (Kristensen und Hansen 2009, Barekati et al. 2010). Die empfohlenen Primerpaare des *Methyl-Primer-Express*-Programms wurden auf die genannten Kriterien hin untersucht. Bei Nichterfüllung eines oder mehreren Kriterien wurde die Primersequenz um wenige Basenpaare verschoben, um möglichst alle Bedingungen zu erfüllen. Beim Entwurf neuer Primer besteht die Gefahr der Bildung von Primerdimeren, welche die Methylierungsanalysen stören würden. Daher wurden die Primerpaare mit dem *Primer-Express*-Programm von Applied Biosystems auf potenzielle Sekundärstrukturen und Primerdimere getestet.

3.2.4.3 Optimierung methylierungsspezifischer Primerpaare

Die Primerpaare wurden vor dem Einsatz an klinischen Proben bei verschiedenen T_A getestet, um die Bedingungen zu optimieren und die Bildung unspezifischer Produkte bzw. Primerdimere zu

minimieren. Die T_A , auch als Hybridisierungstemperatur bekannt, ist die Temperatur, bei der sich der Primer an die gewünschte, komplementäre DNA-Sequenz anlagert, um die Elongation bzw. Amplifikation im darauffolgenden Schritt bei ca. 72°C zu ermöglichen. Die T_A wird so gewählt, dass die Bindung mit der DNA-Sequenz möglichst stark und dennoch spezifisch für die jeweilige Sequenz ist, denn bei zu niedrigen Temperaturen bindet der Primer auch an andere Sequenzen und es kommt zu unspezifischen Produkten oder Primerdimeren. Die Optimierung der T_A erfolgte durch Einsetzen der Primerpaare bei verschiedenen Temperaturen und anschließender Schmelzkurvenanalyse. Dafür wurde für jedes Primerpaar eine Gradienten-PCR mit dem Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt, bei dem ein Temperaturgradient mit vier unterschiedlichen T_A eingesetzt wurde. Der detaillierte Ablauf des Gradienten-PCR-Programmes wird in Tab. 7 (S. 36) dargestellt. Es wurde bei jeder Temperatur eine (methylierte) Positivkontrolle, eine Negativkontrolle und eine Wasserkontrolle mit dem Primerpaar getestet. Bei einem PCR-Ansatz von 20 µl wurden 10 µl des FastStart Universal SYBR Green Master Mix, 7 µl ddH₂O, 2 µl der Primer (*forward*- und *reverse*-Primer in Mischung bei 5 pmol/µl) und 1 µl der Probe (Bisulfit-behandelte DNA oder Wasserkontrolle) eingesetzt. Die Schmelzkurven wurden danach verglichen und analysiert, um die T_A mit der höchsten Effizienz und der geringsten Bildung unspezifischer Produkte zu bestimmen. Bei starker Bildung unerwünschter, unspezifischer Produkte bzw. Primerdimere wurde das eingesetzte Volumen der Primerpaare im PCR-Ansatz auf 1 µl verringert und dafür wurden entsprechend 8 µl ddH₂O eingesetzt. Waren die Schmelzkurven nicht eindeutig, wurden die PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen: Somit wurden die Produkte mittels Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt und es konnte zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten unterschieden werden.

Tab. 7: Ablauf des Gradienten-PCR-Programms im Eppendorf Mastercycler Gradient

Schritte	Temperatur	Dauer
Schritt 1: <i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	10 Minuten
Schritt 2: <i>Denaturierung</i>	95°C	15 Sekunden
Schritt 3: <i>Annealing / Hybridisierung</i>	$T_A \pm 4^\circ\text{C}$	40 Sekunden
Schritt 4: <i>Elongation</i>	72°C	40 Sekunden
<i>Wiederholung Schritt 2 – 4 in 40 Zyklen</i>		
Schritt 5	72°C	5 Minuten
Schritt 6: <i>Ende</i>	10°C	bis zu 24 Stunden

3.2.4.4. DNA-Methylierung zur Herstellung von Kontrollen und Standards

Zur Herstellung von Positivkontrollen für die qMSP wurden DNA-Proben vollständig methyliert. Dies ist *in vitro* mit dem Enzym CpG-Methyltransferase (M.SssI) möglich, welches jedes Cytosin in CG-Dinukleotiden in doppelsträngiger DNA methyliert. Es wurde isolierte DNA von Fibroblasten, Keratinozyten und Abstrichen eingesetzt, welche nach der Methylierung ebenso der Bisulfit-Behandlung unterzogen wurden. Das Volumen des Reaktionsansatzes für die

Methylierung betrug 20 µl, bestehend aus 1 µl (1 µg) der genomischen DNA, 14 µl ddH₂O, 2,2 µl des NEBuffer (10-fach konzentriert), 1,2 µl SAM (auf 1,6 mM verdünnt) und 1 µl der SssI Methylase (4 U/µl). Der Reaktionsansatz wurde durch häufiges Auf- und Abpipettieren gemischt und danach eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 20 Minuten lang bei 65°C erhitzt, um die Reaktion anzuhalten. Die Probe stand im Anschluss für die direkte Verwendung in der Bisulfit-Behandlung zur Verfügung.

Des Weiteren wurde DNA aus Primärkulturen von normalen Fibroblasten oder Keratinozyten isoliert, um als Negativkontrolle zu dienen. Es handelte sich dabei um DNA von nicht-malignen, somatischen Zellen, bei denen CpG-Inseln im Genom i.d.R. unmethyliert vorliegen (Jones und Baylin 2002). Nach der DNA-Isolierung wurden die Proben gleichermaßen in der Bisulfit-Behandlung eingesetzt und anschließend in einem PCR-Testlauf mit dem jeweiligen Primerpaar getestet. Anhand der qMSP-Ergebnisse wurde entschieden, welche Negativkontrolle (Fibroblasten- oder Keratinozyten-DNA) für das jeweilige Primerpaar eingesetzt werden würde. Zur Messung der PCR-Sensitivität und Testung der Reproduzierbarkeit der qMSP-Ergebnisse wurde eine Standardreihe vollständig *in vitro* methylierter Kontroll-DNA in den Verdünnungsstufen 0%, 0,1%, 1%, 5%, 10% und 100% (10ng/µl) hergestellt und für jedes Primerpaar in Form von Intra-Assay-Triplikaten sowie für zwei Primerpaare in Form von Inter-Assay-Triplikaten getestet.

3.2.4.5. Quantitative methylierungsspezifische PCR

Die Methode mit der besten analytischen SEN für die Analyse von DNA-Methylierung an einzelnen Loci ist die methylierungsspezifische PCR (MSP). Die analytische SEN bezieht sich auf den geringsten Anteil des methylierten *Templates* in einer Probe, der durch die jeweilige Methode sicher detektiert werden kann (Saah und Hoover 1997). Als *Template*/Matrize, also der Ursprung-DNA-Strang, von dem mittels PCR die komplementäre DNA synthetisiert wird, dient die Bisulfit-behandelte DNA. Die Bisulfit-Behandlung ist ein notwendiger Schritt in der Vorbereitung der zu untersuchenden DNA für die MSP, da sie die Cytosin-Methylierung in einen Sequenzunterschied umwandelt (siehe Abb. 1, S. 33). Durch die Anwendung methylierungsspezifischer Primerpaare wird nur die Bisulfit-DNA von ursprünglich methylierten *Template*-Molekülen amplifiziert (Kristensen und Hansen 2009, Barekati et al. 2010).

Falsch-positive Ergebnisse wurden durch das Mitführen einer Negativkontrolle und Optimierung der T_A reduziert (Kristensen und Hansen 2009).

Um eine Quantifizierung der Methylierung zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit mit quantitativer methylierungsspezifischer PCR, kurz qMSP, welche auf dem Prinzip der *Real-time*-PCR basiert, gearbeitet. In der qMSP wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzt,

welcher unspezifisch in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert und im interkalierten Zustand ein verstärktes Fluoreszenzsignal abgibt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals steigt dabei proportional zur Menge des PCR-Reaktionsproduktes (Chu et al. 2002, Kristensen und Hansen 2009).

Tabelle 8 (S. 38) stellt den Ablauf der qMSP dar. Jeder Zyklus (Schritt 1 + 2) mit Trennung der DNA-Stränge (Denaturierung) und Amplifikation führt zu einer Verdopplung des PCR-Produktes, wodurch die PCR-Reaktion mit Bezug auf die Menge der PCR-Produkte einen exponentiellen Verlauf annimmt. Dies wird in folgender Formel dargestellt:

Formel 1:
$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

In Formel 1 entspricht X_n der PCR-Produktmenge zum Zyklus n , X_0 der Produktmenge zu Beginn der Reaktion, E_x der Effizienz der Amplifikation und n der Anzahl an Zyklen (Livak und Schmittgen 2001). Unter Annahme einer 100%igen Effizienz würde jeder Zyklus zu einer Verdopplung des PCR-Produktes führen.

Tab. 8: Ablauf/Temperaturprotokoll der qMSP

Schritte	Beschreibung	Temperatur	Dauer
Schritt 1	<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	10 Minuten
Schritt 2	<i>Denaturierung</i>	95°C	15 Sekunden
	<i>Annealing</i>	T _A	20 Sekunden
	<i>Elongation und Fluoreszenzdetektion</i>	72°C	40 Sekunden
<i>Wiederholung Schritt 2 in 40 bzw. 45 Zyklen</i>			
Schritt 3	<i>Schmelzkurvenanalyse</i>	95°C	15 Sekunden
		60°C	60 Sekunden
		95°C	15 Sekunden

Ein wesentlicher Wert, der bei der qMSP experimentell bestimmt wird, ist der Ct-Wert (vom engl. *threshold cycle*). Der Ct-Wert bezeichnet die Zyklusanzahl, bei der das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert überschreitet und erstmals exponentiell und deutlich über das Hintergrundsignal verläuft. Der Zyklus, bei dem dies eintritt, nennt sich der Schwellenwert-Zyklus. Der Ct-Wert dient als Maß für die Anfangsmenge des *Templates* im Reaktionsansatz, da das Fluoreszenzsignal schließlich proportional zur Menge des PCR-Produktes ansteigt. Je höher die Kopienzahl des *Templates* zu Beginn, desto größer die Menge an PCR-Produkt in jedem Zyklus, desto schneller wird der Schwellenwert erreicht, und desto niedriger der Ct-Wert. Die Menge der methylierten DNA lässt sich mithilfe eines Referenzgens relativ quantifizieren (Livak und Schmittgen 2001). In dieser Arbeit wurde β -Aktin als Referenzgen gewählt, da es methylierungsunabhängig amplifiziert wird, und es wurde ein β -Aktin-Primerpaar für eine CpG-

freie Sequenz des Gens spezifisch für Bisulfit-behandelte DNA hergestellt (siehe Tab. 5, S. 29). Der Ct-Wert des qMSP-Laufes mit dem β -Aktin-Primerpaar gibt ein relatives Maß der Menge an eingesetzter DNA unabhängig vom Methylierungsstatus an. Eine relative Quantifizierung der Methylierung der cfDNA wird durch den Vergleich der Ct-Werte des Zielgens und des Referenzgens β -Aktin erreicht. Unter Annahme einer vollständigen Verdopplung des Amplifikats in jedem Zyklus wird die relative Methylierung (RM) einer jeweiligen Probe durch die Differenz der Ct-Werte von Referenz- und Zielgen in folgender Formel berechnet (Livak und Schmittgen 2001, Derveaux et al. 2010):

Formel 2: $RM = 2^{(CT_{Zielgen} - CT_{Referenzgen})}$

Die relative Methylierung der Probe wurde danach in Bezug zur relativen Methylierung der mitgeführten Positivkontrolle (vollständig methyliert) gesetzt, um den relativen Anteil der DNA-Methylierung einer Probe darzustellen. Anschließend wurde anhand der qMSP-Schmelzkurvenanalyse bewertet, bei welchen Proben ein spezifisches Produkt detektiert wurde, und diese Proben wurden als positiv bzw. methyliert bewertet. Bei unklaren Schmelzkurvenanalysen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese der Proben durchgeführt, um genauer festzustellen, welche Proben ein spezifisches Produkt aufweisen (siehe 3.2.5. Agarose-Gelelektrophorese, S. 40).

Anhand der relativen Methylierung der verschiedenen Probengruppen (OvCa, benigne Erkrankungen) wurde die diagnostische SEN und SPE berechnet. Die diagnostische SEN bezeichnet den Anteil an erkrankten Personen (OvCa-Patientinnen), die durch den Test richtig als erkrankt erkannt wurden (Formel 3). Die diagnostische SPE dagegen bezeichnet den Anteil an nicht-erkrankten Kontrollpatienten, die durch den Test korrekt als nicht-erkrankt eingestuft wurden (Formel 4) (Saah und Hoover 1997).

Formel 3: $Sensitivit\ddot{a}t = \frac{\text{Anzahl richtig positiv erkannter OvCa-Proben}}{\text{Gesamte Anzahl getesteter OvCa-Proben}}$

Formel 4: $Spezifit\ddot{a}t = \frac{\text{Anzahl richtig negativ erkannter Kontrollproben}}{\text{Gesamte Anzahl getesteter Kontrollproben}}$

Im Rahmen der hier vorgestellten Analysen wurde mit dem Faststart Universal SYBR Green Master Mix gearbeitet. Für 20 μ l eines PCR-Ansatzes wurden 10 μ l des Faststart Universal SYBR Green Master Mix, 7 μ l ddH₂O, 2 μ l des entsprechenden Primerpaars (5 pmol/ μ l je *forward/reverse* Primer) und 1 μ l der Bisulfit-behandelten DNA verwendet. Für die qMSP wurde das ABI 7300 *Real-time*-PCR-System benutzt. In jedem Lauf wurde eine Positivkontrolle

(vollständig *in vitro* methylierte Bisulfit-behandelte Abstrich-DNA), eine Negativkontrolle (Bisulfit-behandelte Keratinozyten-/Fibroblasten-DNA) und eine Wasserkontrolle (ddH₂O) mitgeführt.

3.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die qMSP mit Agarose-Gelelektrophorese geprüft. Hierbei wird ein elektrisches Feld in einem Agarosegel erzeugt; dies führt dazu, dass die DNA-Moleküle, welche aufgrund ihrer Phosphatgruppe negativ geladen sind, im Gel in Richtung der positiven Anode wandern. Da Nukleinsäuren ein konstantes Verhältnis von Masse zu Ladung haben, hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von (linearen) DNA-Molekülen lediglich von ihrer Masse ab, und kleinere PCR-Produkte mit einer geringeren Masse bewegen sich schneller durch das Agarosenetzwerk als solche mit einer höheren Masse. Dies erlaubt eine Auftrennung der PCR-Produkte nach der Größe und beim Vergleich mit einer mitgeführten DNA-Leiter kann anhand der Bänder die Größe des PCR-Produktes bestimmt werden (Lee et al. 2012).

In dieser Arbeit entstanden relativ kleine PCR-Produkte (< 300 bp), weswegen 2%ige Agarosegele zur Auftrennung angefertigt wurden. Dafür wurden 3 g Agarose in einem Kolben mit 150 ml 1x TBE-Puffer (1x TBE: 0,9 M Tris; 0,9 M Borsäure; 40 mM EDTA pH 8,0) durch ca. 2-minütiges Erwärmen in der Mikrowelle und häufiges Schwenken vollständig aufgelöst. Nachdem die Lösung durch Schwenken in Eiswasser abgekühlt wurde und eine lauwarme Temperatur erreichte, wurden 7,5 µl Ethidiumbromid (EtBr, 10 mg/ml) hinzugegeben und das Gel in einen Gelschlitten mit entsprechenden 1,0 mm-Kämmen gegossen. Ethidiumbromid ist ein DNA-Interkalator und fluoresziert nach DNA-Bindung unter UV-Licht, sodass die PCR-Produkte nach der Gelelektrophorese im UV-Geldokumentationssystem sichtbar gemacht werden konnten. Bevor die PCR-Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurde jeder Probe 5 µl DNA Gel-Ladepuffer hinzugefügt. Als DNA-Längenstandard bzw. -Leiter wurde die GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder verwendet. Zur Auftrennung der DNA lief die Agarose-Gelelektrophorese ca. 45 Minuten lang mit 100 V in 1x TBE-Puffer.

3.2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm SPSS Statistics von IBM benutzt. Die statistischen Tests prüfen die Daten auf deren statistische Signifikanz, welche beweisen soll, dass die ermittelten Ergebnisse nicht zufällig entstanden sind. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unterhalb 5%, also einem p-Wert $\leq 0,05$, wurden als statistisch signifikant bewertet. Für die Analyse der Methylierungshäufigkeit der verschiedenen Gruppen wurden binäre logistische Regressionen zur Ermittlung des *Odds-Ratio* durchgeführt. Zur

Bestimmung eines Schwellenwertes der relativen Methylierung für die jeweiligen Methylierungsmarker wurde eine ROC-Kurve berechnet. Zum Vergleich der Methylierungsmarker mit der Zytologie wurde der McNemar-Test angewendet. Des Weiteren wurde der Exakte Test nach Fischer bei verschiedenen Vergleichen von zwei nominalen/ordinalen Variablen (z.B. beim Vergleich der Methylierungshäufigkeit und der Altersgruppe der Patientin) als Test auf statistische Unabhängigkeit benutzt. Während der Mann-Whitney-U-Test als Test auf signifikante Unterschiede der relativen Methylierung zwischen zwei unverbundenen Variablen angewendet wurde, diente der Wilcoxon-Test als statistisches Analyseverfahren zweier verbundener Variablen, beispielsweise beim Vergleich der Gewebeproben von PT und Absiedlung.

4. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Identifizierung von Methylierungsmarkern für das OvCa in cfDNA von Bauchraumspülflüssigkeiten sowie die Differenzierung von OvCa-Proben und Proben von benignen Erkrankungen anhand der Methylierungsmarker. Grundlage der Auswahl von 30 Kandidatengenen für die Methylierungsmarker bildeten drei genomweite *Microarray*-Analysen von gDNA aus OvCa- und Normalgewebe. Die Auswahl wurde des Weiteren durch Literaturrecherche der Kandidatengene in wissenschaftlichen Datenbanken eingegrenzt. Schließlich wurden zehn potenzielle Methylierungsmarker ausgewählt und mit ausgewählten Proben mittels qMSP getestet. Für sechs der zehn MSP-Primerpaare konnten qMSP-Analysen etabliert werden. Die sechs MSP-Primerpaare wurden an zwei Probensets mit Bisulfit-behandelter DNA von Patientinnen mit OvCa, Borderline-Tumoren und malignen sowie benignen Erkrankungen mittels qMSP getestet, und anhand der Schmelzkurvenanalysen wurden Proben als methyliert oder nicht-methyliert für die jeweiligen Methylierungsmarker eingestuft. Anhand dieser Ergebnisse wurde die SEN und SPE der einzelnen Marker sowie Kombinationen der Marker in Bezug auf die Detektion vom OvCa berechnet. Des Weiteren wurde die relative Methylierung der Proben durch Berechnung der Methylierung relativ zur Menge an Bisulfit-DNA (β -Aktin) quantifiziert und anhand dessen wurden die Methylierungsmarker mit einem *Cut-off*-Wert der relativen Methylierung erneut alleine sowie in Kombination miteinander an den Proben angewendet und die SEN/SPE ermittelt. Weiterhin wurde die relative Methylierung der cfDNA mit Zellpellets und Gewebeproben von PT und Absiedlung der Patientinnen verglichen und die intratumorale Heterogenität der Gewebeproben anhand der Methylierung untersucht. Zusätzlich wurden die OvCa-Proben auf potenzielle Einflussfaktoren der Methylierung, nämlich Patientinnenalter, FIGO-Stadium, histologischer Subtyp, und der Zustand nach Chemotherapie untersucht. Schließlich wurde die Spülzytologie als zusätzliche Methode der Probendifferenzierung herangezogen und in Kombination mit den Methylierungsmarkern getestet.

4.1. Etablierung und Auswahl der qMSP-Primerpaare

Für die Auswahl und das Design der epigenetischen Marker für das OvCa wurden genomweite Methylierungs-*Microarray*-Analysen der Arbeitsgruppe der „Gynäkologischen Molekularbiologie“ des Universitätsklinikums Jena als Grundlage benutzt. Hierbei wurde das Genom von OvCa-Proben und Kontrollproben aus Normalgewebe bezüglich des Methylierungsstatus verglichen, um tumorspezifische Hypo- oder Hypermethylierung an bestimmten Genloci zu identifizieren. Die genomweite *Microarray*-Analyse wurde nach dem Protokoll von Rauch und Pfeifer (Rauch und Pfeifer 2009) mit der sog. MIRA-Methode (vom

engl. *methylated-CpG island recovery assay*) durchgeführt, bei dem die gDNA anhand der Phenol-Chloroform-Methode (siehe S. 31) isoliert wird, anschließend mit Ultraschall fragmentiert wird, und dann methylierungsspezifisch an das MBD-Protein MBD2b gebunden wird. Die Bindung des MBD-Proteins an methylierte Sequenzen wird zur Anreicherung dieser genutzt und hypermethylierte Regionen werden nach Fluoreszenzmarkierung durch vergleichende *Array*-Hybridisierung (nach dem Prinzip des Agilent *whole genome CpG island array*) identifiziert. Anhand der MIRA-Methode wurden mehrere hundert methylierte Kandidatengene identifiziert. Diese Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen von zwei internationalen Studien mit vergleichbarem Studienaufbau verglichen und anhand eines Venn-Diagramms wurden 30 Kandidatengene identifiziert, die in allen drei genomweiten *Microarray*-Analysen eine CpG-Insel-Hypermethylierung bei OvCa-Patientinnen aufwiesen (Michaelson-Cohen et al. 2011, Keita et al. 2013).

Diese erste Auswahl an Kandidatengenen wurde mithilfe wissenschaftlicher Literatur aus frei zugänglichen Datenbanken verfeinert. Bei der Datenbankrecherche wurde untersucht, ob die Kandidatengene bereits mit Bezug auf Hypermethylierung bei malignen Erkrankungen des Ovars oder anderen malignen Erkrankungen beschrieben wurden. Von den 30 ursprünglichen Kandidatengenen wurden zehn zur weiteren Testung in dieser Arbeit ausgewählt: NKX2-8, NKX6-1, NR2F2, POU3F3, PRR15, SIM1, SOX21, SPAG6, SV2C und TBX15 (siehe Anhang Tab. I, S.I). Um untersuchen zu können, inwiefern diese Kandidatengene als Methylierungsmarker beim OvCa dienen könnten, wurden für die entsprechenden CpG-Inseln der Kandidatengene MSP-Primerpaare hergestellt und mittels qMSP an OvCa- und Kontrollproben getestet. Für das Gen POU3F3 wurde nach Schwierigkeiten mit dem ersten Primerpaar (POU3F3(a)) ein zweites Primerpaar für eine andere CpG-Insel des Gens hergestellt (POU3F3(b)) und als Vergleich getestet (Tab. 5, S. 29).

Für jedes Primerpaar wurde des Weiteren eine Gradienten-PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse bei drei bis vier verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um die optimale T_A für das jeweilige Primerpaar zu bestimmen. Für die Gradienten-PCR wurden eine Probe Bisulfit-behandelter Abstrich-DNA als Negativkontrolle, eine vollständig *in vitro* methylierte Positivkontrolle, und eine Wasserkontrolle eingesetzt. Die Gradienten-PCR mit nachfolgender Schmelzkurven- oder Agarosegelanalyse dient zur Einschätzung der Bildung der spezifischen PCR-Produkte bzw. Nebenprodukten und von Primerdimeren, welche ein Störfaktor bei späteren Versuchen sein können.

Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht es schnell und kontaminationslos zwischen verschiedenen PCR-Produkten zu unterscheiden bzw. die Bildung unspezifischer Produkte zu detektieren. Durch die kontinuierliche Temperaturerhöhung (bis 95°C) denaturiert das doppelsträngige PCR-Produkt

abhängig von seiner Fragmentlänge und Basenzusammensetzung bei einer bestimmten Temperatur, der Schmelztemperatur (T_m). Da der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green nur in doppelsträngige DNA interkaliert, wird er bei der Denaturierung freigesetzt, und diese Abnahme der Fluoreszenz wird gemessen. Bei einer Schmelzkurvenanalyse kann bei der Schmelztemperatur ein Peak (dt. Spitze) erkannt werden, der das lokale Maximum der Fluoreszenzintensitätsabnahme darstellt. Treten mehrere Peaks bei verschiedenen Temperaturen auf, wurden verschiedene Produkte amplifiziert. Das spezifische PCR-Produkt hat als längere doppelsträngige DNA i.d.R. eine höhere Schmelztemperatur als unspezifische Primerdimere. Primerdimere entstehen, wenn einzelne Primer aufgrund komplementärer Basen aneinander hybridisieren und als kurze doppelsträngige Oligonukleotide amplifiziert werden. Dies führt zu einer Abnahme der verfügbaren Primer im Reaktionsansatz und dementsprechend zu einer Herabsetzung der PCR-Effizienz. Eine zu niedrige T_A begünstigt die Entstehung von Primerdimeren, weswegen bei der Gradienten-PCR auf eine möglichst geringe Bildung von unspezifischen Produkten und Primerdimeren geachtet wurde. Eine sehr hohe T_A verhindert dagegen die generelle Bindung des Primers an die DNA und eine Amplifikation.

Die Schmelzkurvenanalyse der Gradienten-PCR wird für das Gen NKX6-1 exemplarisch in Abb. 3 (S. 45) dargestellt. Bei $57,0^\circ\text{C}$ kam es zu einer deutlichen Bildung von unspezifischen Produkten in der Negativkontrolle (rot, Abstrich-DNA) mit einem Peak der T_m bei $71,4^\circ\text{C}$, und die Positivkontrolle (grün, *in vitro* methylierte Abstrich-DNA) erzeugte nur einen schwachen Peak bei $73,4^\circ\text{C}$ (Abb. 3: A). Bei der nächsthöheren T_A von $59,5^\circ\text{C}$ ist der deutlichste Peak der Positivkontrolle mit einer T_m von $73,7^\circ\text{C}$ zu sehen, und die Negativkontrolle weist kaum noch einen Peak auf, allerdings kam es hier zur Bildung von unspezifischen Produkten in der Wasserkontrolle bei $71,1^\circ\text{C}$ (Abb. 3: B). Bei einer T_A von $61,1^\circ\text{C}$ war immer noch ein Peak der Positivkontrolle bei $73,7^\circ\text{C}$ zu sehen und keine Bildung von unspezifischen Produkten, weder bei der Negativ- noch bei der Wasserkontrolle (Abb. 3: C). Bei 63°C fand eine leichte Verschiebung der T_m des spezifischen Produktes der Positivkontrolle auf $73,4^\circ\text{C}$ statt und es bildeten sich erneut unspezifische Produkte der Negativkontrolle mit einer T_m von $70,4^\circ\text{C}$ (Abb. 3: D). Um die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten möglichst gering zu halten und gleichzeitig aber die analytische SEN der PCR durch zu hohe Temperaturen nicht zu beeinträchtigen, wurde eine T_A von $60,0^\circ\text{C}$ für NKX6-1 gewählt und anhand Testung zur analytischen SEN (siehe Abs. 4.2., S.46) als geeignete T_A bestätigt.

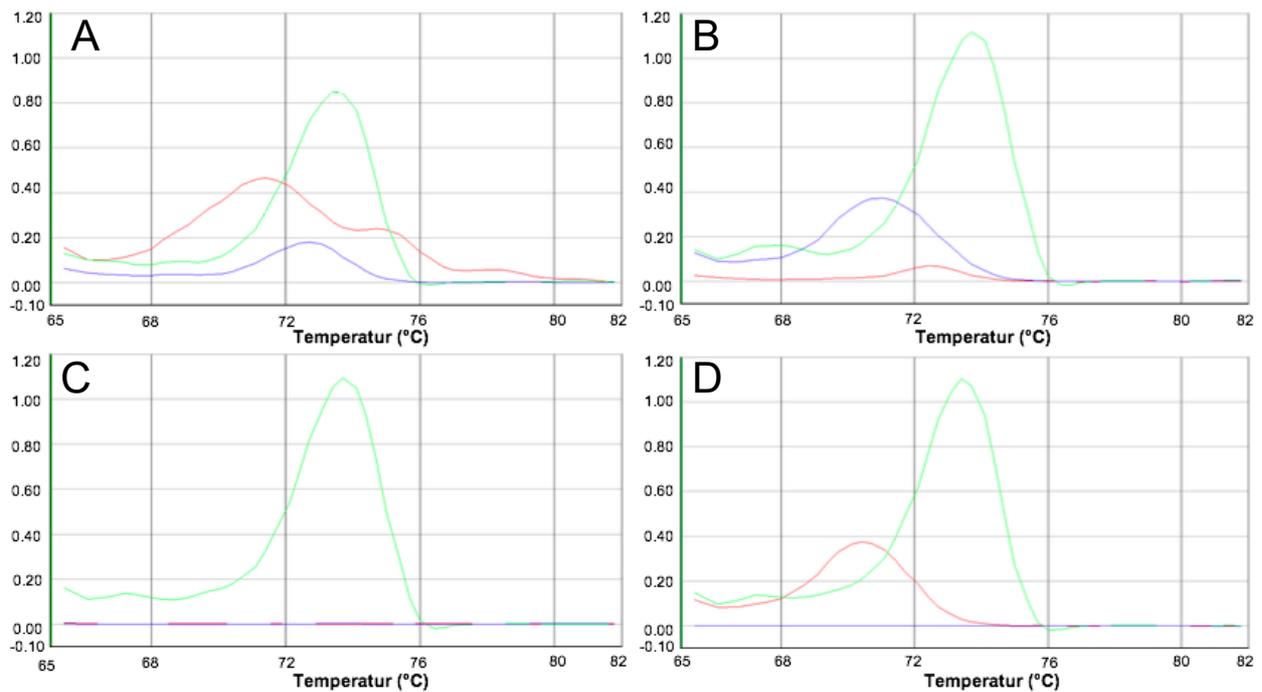


Abb. 3: Schmelzkurvenanalyse der Gradienten-PCR für NKX6-1

Gezeigt ist das Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse mit den folgenden *Annealing*-Temperaturen: 57,0°C (A); 59,5°C (B); 61,1°C (C); 63,0°C (D). Die Schmelzkurve in grün stellt das Ergebnis der *in vitro* methylierten Positivkontrolle dar, rot entspricht der Negativkontrolle und blau der Wasserkontrolle.

Bei den Primerpaaren NKX6-1 und NR2F2 wurde als zusätzlicher Schritt gegen die Bildung von Primerdimeren die Menge des Primerpaars im 20µl Reaktionsansatz von 2µl auf 1µl verringert, dafür wurde 1µl mehr ddH₂O eingesetzt.

Bei mehreren Peaks, die aufgrund einer ähnlichen Schmelztemperatur schlecht zu unterscheiden waren, wurden die PCR-Produkte zusätzlich mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Nach Bestimmung der optimalen T_A und Primermenge wurden die Primerpaare mittels qMSP an einem ersten Probenstet von Bauchraumspülflüssigkeiten, dem Etablierungsprobenstet, getestet. Das Probenstet enthielt Bauchraumspülflüssigkeiten von Patientinnen mit OvCa sowie verschiedenen anderen malignen und benignen gynäkologischen Erkrankungen, welche bei allen Patientinnen vor oder während ihrer Operation entnommen wurden. Anhand der qMSP-Ergebnisse wurde die diagnostische SEN und SPE errechnet. Die diagnostische SEN, bezogen auf das OvCa, wird als der Anteil richtig detektierter OvCa-Proben von der Gesamtanzahl an OvCa-Proben definiert. Die diagnostische SPE bezieht sich dagegen auf den Anteil an richtig negativ erkannter Kontrollproben, also den Anteil an nicht-methylierter Kontrollproben von der Gesamtzahl der Kontrollproben. Zusätzlich wurden die Schmelzkurvenanalysen erneut auf unspezifische Nebenprodukte untersucht. Anhand der T_A -Testung und der ersten qMSP-Ergebnisse wurden fünf Primerpaare, nämlich POU3F3(a), POU3F3(b), SIM1, SOX21 und TBX15, von weiteren Versuchen in dieser Arbeit ausgeschlossen. Bei den genannten Genen konnten entweder keine optimalen PCR-Bedingungen ohne erhebliche Nebenprodukte bestimmt werden, oder es gab keine

messbare Trennung zwischen OvCa- und Kontrollproben im Etablierungsprobenset. Für die MSP-Primerpaare der Gene NKX2-8, NKX6-1, NR2F2, PRR15, SPAG6 und SV2C war die Etablierung und Testung erfolgreich, sodass mit diesen sechs MSP-Primerpaaren weitere Versuche gemacht wurden.

4.2. Testung zur analytischen Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Mit den sechs etablierten MSP-Primerpaaren wurden Versuche bezüglich der Reproduzierbarkeit der qMSP-Ergebnisse und der analytischen SEN der Primerpaare durchgeführt. Da in den Bauchraumspülflüssigkeiten, wie auch in Serum, nur ein kleiner Anteil tumorspezifischer cfDNA mit einer Vielzahl an nicht-tumorspezifischer cfDNA zu erwarten ist, müssen die MSP-Primerpaare mittels qMSP selbst einen sehr kleinen Anteil methylierter DNA in den Proben detektieren können (Diehl et al. 2005). Um die analytische SEN der Primerpaare zu testen, wurde eine Verdünnungsreihe mit vollständig *in vitro* methylierter DNA in Bisulfit-behandelter Lachs-Sperma-DNA (vom engl. *salmon sperm DNA*, kurz SSD) hergestellt. Die erste Probe enthielt zu 100% methylierte DNA (10ng/μl) und die darauffolgenden fünf Proben hatten ein Verhältnis von 10%, 5%, 1%, 0,1% und 0% methylierter DNA zu nicht-methylierter, Bisulfit-behandelter SSD (5ng/μl). Des Weiteren wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt. Diese Proben wurden für alle sechs etablierten MSP-Primerpaare und das β-Aktin-Primerpaar dreifach bei der qMSP mitgeführt, um die Intra-Assay-Variabilität zu testen. Für NKX2-8 und PRR15 wurde dieser Vorgang noch zweimal wiederholt, um die Inter-Assay-Variabilität in verschiedenen Messansätzen zu testen.

In Abb. 4 (S. 47) wird das qMSP-Ergebnis exemplarisch für SV2C dargestellt.

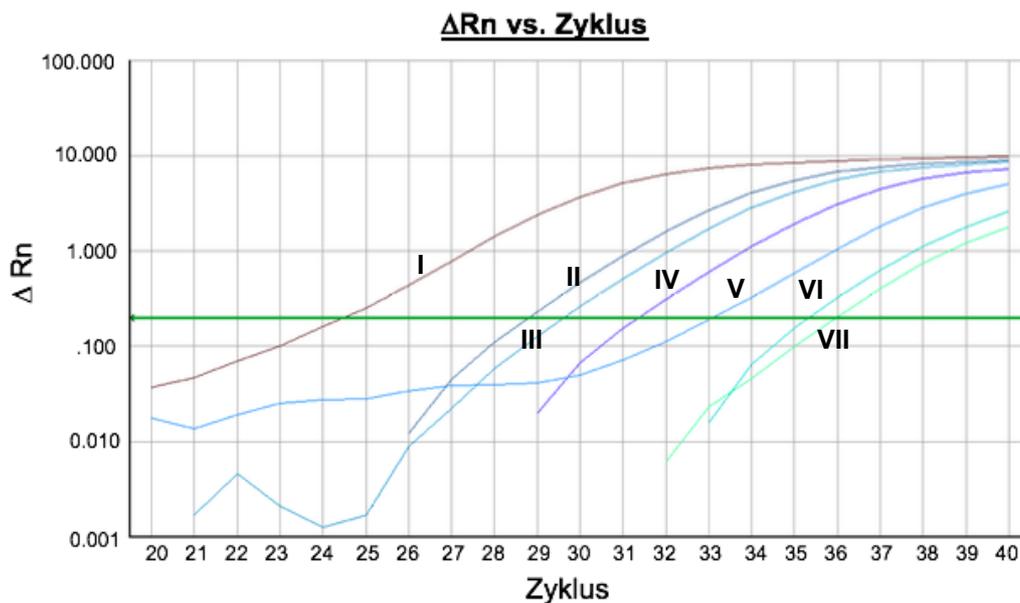


Abb. 4: Sensitivität des SV2C Primerpaars in der qMSP

Der Kurvenverlauf stellt das Ergebnis für die jeweiligen Mischverhältnisse zwischen vollständig *in vitro* methylierter DNA und SSD dar. Die Mischverhältnisse von *in vitro* methylierter DNA zu SSD, in %, betragen: 100% (I, Positivkontrolle); 10% (II); 5% (III); 1% (IV); 0,1% (V); 0% (VI, Negativkontrolle). Zusätzlich wurde auch eine Wasserkontrolle (VII) mitgeführt.

Die Intra-Assay-Triplikate zeigten, dass bei allen sechs MSP-Primerpaaren die Proben mit 100%, 10%, 5% und 1% methylierter DNA detektiert und zu 100% reproduziert werden konnten. Bei 1%iger Methylierung der BS-DNA (Bisulfit-DNA) war bei allen Markern demnach eine 100%ige analytische SEN gegeben. Somit war das größte Verhältnis methylierter zu nicht-methylierter BS-DNA mit sicherer Detektion der methylierten DNA 1:100. Bei der Probe mit 0,1%iger Methylierung befand man sich offensichtlich an der Nachweisgrenze – bei den Inter-Assay-Triplikaten von NKX2-8 fand sich einmal eine 66%ige, einmal eine 33%ige, und einmal eine 0%ige Detektion der Probe. In diesem Fall muss jedoch auch die absolute Menge an eingesetzter BS-DNA in Betracht gezogen werden – es wurden ca. 5ng BS-DNA in jedem PCR-Ansatz eingesetzt, dies entspricht einer Kopienzahl von ca. 1000 (ca. 1000 Zelläquivalente abzüglich Verluste durch die Bisulfit-behandlung; nach Erfahrungswerten des Labor „Gynäkologische Molekularbiologie“ Jena). Bei 1%iger Methylierung der Probe finden sich demnach ca. zehn Kopien der methylierten DNA, bei 0,1%iger Methylierung nur eine Kopie. Es ist denkbar, dass beim Einsatz einer größeren absoluten DNA-Menge auch bei 0,1%iger Methylierung eine höhere analytische SEN gegeben wäre.

Die Intra-Assay-Variabilität, die durch den Variationskoeffizienten (CV, vom engl. *coefficient of variation*) beschrieben wird, betrug bei den Proben 1 – 100% methylierter DNA im Durchschnitt 25,1%. Innerhalb eines Messansatzes schwankte der durchschnittliche Messwert also um ca. 25%. Der durchschnittliche CV schwankte je nach Primerpaar zwischen 22,1% (NR2F2) und 37,0% (NKX2-8). Tab. 9 stellt die genauen Werte der Intra-Assay-Variabilität für jedes MSP-Primerpaar

und für die Proben mit 100%iger, 10%iger, 5%iger und 1%iger cfDNA-Methylierung dar. Es werden ebenso die CV-Mittelwerte der MSP-Primerpaare und der Proben dargestellt.

Tab. 10 stellt die genauen Werte der Inter-*Assay*-Variabilität für die Gene NKX2-8 und PRR15 sowie deren Mittelwerte dar.

Tab. 9: Variationskoeffizienten der Intra-*Assay*-Triplikate

*In Tabelle 9 sowie Tabelle 10 steht „M“ für „methylierte DNA“

CV Intra- <i>Assay</i> -Triplikate (in %)								
Probe	β-Aktin	NKX6-1	NKX2-8	NR2F2	PRR15	SPAG6	SV2C	Mittelwert (Proben)
100% M*	26,4	22,7	62,5	16,4	28,4	15,3	24,0	28,0
10% M	8,0	30,4	13,7	11,7	31,3	32,0	13,1	20,0
5% M	14,8	17,8	28,4	35,8	8,3	33,4	27,2	23,7
1% M	14,3	31,8	43,5	24,5	21,5	11,5	53,8	28,7
Mittelwert (Primer)	15,9	25,7	37,0	22,1	22,4	23,0	29,5	

Tab. 10: Variationskoeffizienten der Inter-*Assay*-Triplikate

CV Inter- <i>Assay</i> -Triplikate (in %)			
Probe	NKX2-8	PRR15	Mittelwert (Proben)
100% M	34,8	36,5	35,7
10% M	14,3	25,4	19,8
5% M	23,3	10,8	17,1
1% M	3,6	36,5	20,0
Mittelwert (Primer)	19,0	27,3	

Bei den Inter-*Assay*-Triplikaten ließen sich die Proben 1 – 100% methylierte DNA zu 100% detektieren und reproduzieren. Die durchschnittliche Inter-*Assay*-Variabilität dieser Proben betrug für NKX2-8 19,0% und für PRR15 27,3%.

Abb. 5 (S. 49) stellt die durchschnittliche berechnete relative Methylierung der Proben von den Intra-*Assay*-Triplikaten dar. Bei allen Genen konnte anhand der relativen Methylierung signifikant zwischen 100% und 10% methylierter DNA unterschieden werden. Mit der Ausnahme von NKX2-8, konnte auch bei allen Genen signifikant zwischen 10% und 5% methylierter DNA unterschieden werden. Zwischen 5% und 1% methylierter DNA zeigte sich bei allen Genen ein signifikanter Unterschied der relativen Methylierung.

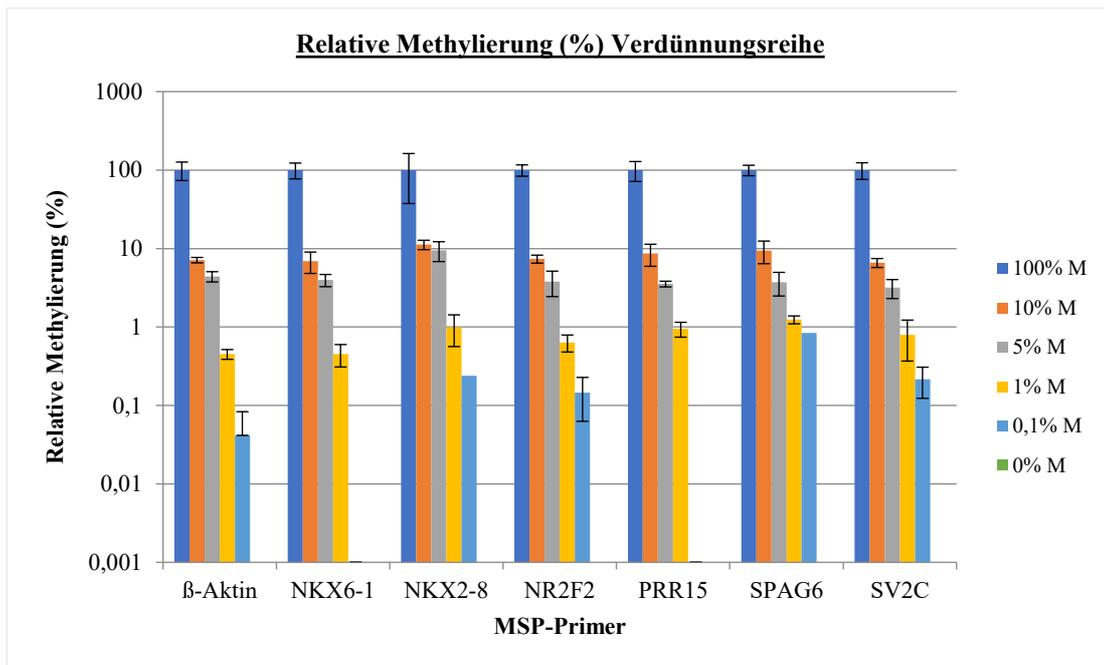


Abb. 5: Relative Methylierung (in %) der Intra-Assay-Triplikate in der Verdünnungsreihe
Gezeigt wird die durchschnittliche berechnete relative Methylierung der Intra-Assay-Triplikate der Verdünnungsreihe für die jeweiligen MSP-Primerpaare und β -Aktin (Mittelwert \pm 95% Konfidenzintervall). Die Proben werden als das prozentuale Mischverhältnis der *in vitro* methylierten DNA zu der SSD angegeben (z.B. „10%“=10% *in vitro* methylierter DNA im Mischverhältnis zu SSD).

4.3. MSP-Primerpaare als Methylierungsmarker zum Nachweis von Ovarialkarzinomproben in cfDNA

Die MSP-Primerpaare wurden zunächst an einem kleineren Probenstet, dem Etablierungsprobenstet, mittels qMSP getestet und etabliert. Das Probenstet bestand aus insgesamt 65 Proben, welche in folgende Gruppen aufgeteilt wurden: OvCa (n=18), (andere) maligne gynäkologische Erkrankungen (n=24), benigne Erkrankungen (n=22), und Borderline-Tumoren (n=1) (Anhang Tab. II, S. I). Die Gruppe der benignen gynäkologischen Erkrankungen diente in dieser Arbeit als Kontrollgruppe. Anhand der Schmelzkurvenanalyse der qMSP wurden die Proben als methyliert oder nicht-methyliert eingeschätzt, bei unklaren Ergebnissen wurde zusätzlich eine Agarose-Gelelektrophorese der Proben durchgeführt. Proben galten als methyliert, wenn mit dem jeweiligen MSP-Primerpaar das (methylierungs-)spezifische Produkt amplifiziert wurde, welches sich in der Schmelzkurvenanalyse als ein Peak bei einer bestimmten Schmelztemperatur zeigte. Die Schmelztemperatur für das spezifische Produkt wird durch eine mitgeführte, *in vitro* methylierte Positivkontrolle identifiziert.

Anschließend wurde der Anteil methylierter Proben in den jeweiligen Probengruppen berechnet (Abb. 6, S. 50) und anhand dessen die diagnostische SEN/SPE ausgerechnet (Abb. 7, S. 50). Die Berechnung der diagnostischen SEN/SPE bezog sich in dieser Arbeit ausschließlich auf die Anteile methylierter Proben bei den OvCa- und Kontrollproben. Die anderen malignen Proben

und die Borderline-Tumore wurden als separate Probengruppen mitgeführt und werden separat beschrieben.

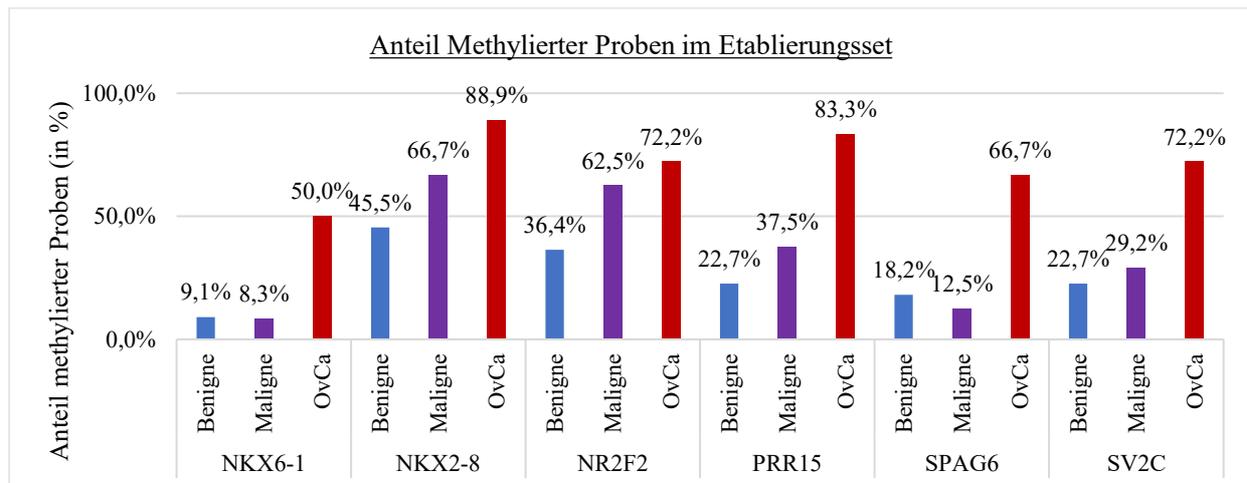


Abb. 6: Anteil methylierter Proben im Etablierungsprobenset nach Probengruppe

Das Balkendiagramm zeigt für die sechs ausgewählten MSP-Primerpaare den Anteil, in Prozent, an methylierten Proben für die drei Probengruppen im Etablierungsset (64 cfDNA Proben, davon 22 benigne Proben, 24 maligne Proben, 18 OvCa Proben). Da im Etablierungsset nur eine Borderline-Tumor Probe enthalten ist, wird sie von den Berechnungen ausgeschlossen.

Bei allen sechs MSP-Primerpaaren zeigte sich in der OvCa-Probengruppe der höchste Anteil an methylierten Proben. Bei vier der sechs MSP-Primerpaare (NKX2-8, NR2F2, PRR15, SV2C) hatte die Kontrollgruppe mit den benignen Proben den niedrigsten Anteil methylierter Proben, bei zwei weiteren Primerpaaren (NKX6-1, SPAG6) war dies bei der malignen Probengruppe der Fall. Insgesamt war der Anteil methylierter Proben in der OvCa-Probengruppe $\geq 50\%$, der höchste Anteil methylierter OvCa-Proben fand sich bei NKX2-8 (88,9%). Bei den benignen Proben war der Anteil methylierter Proben konsistent unter 50%, bei der malignen Probengruppe zeigten sich starke Schwankungen zwischen 8,3% (NKX6-1) und 66,7% (NKX2-8).

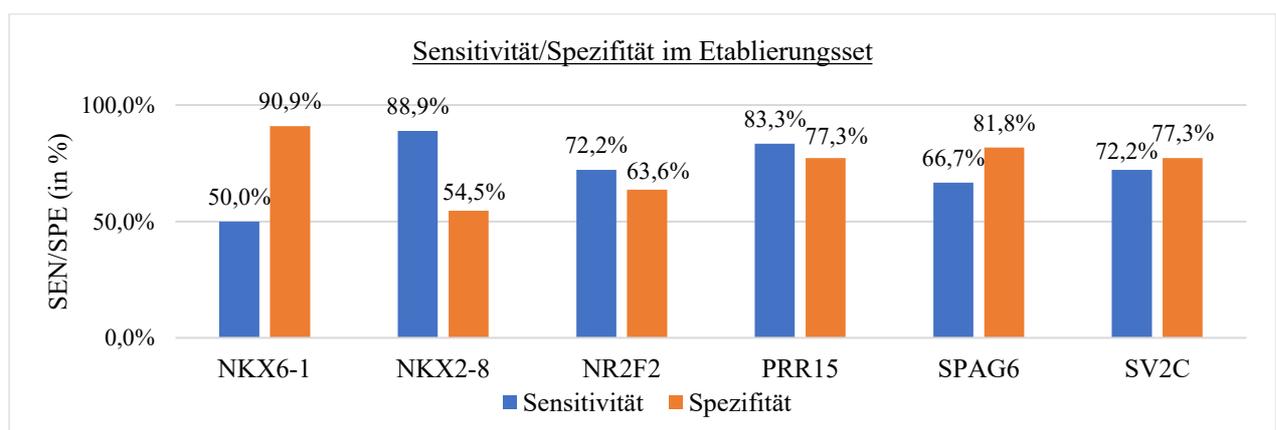


Abb. 7: Sensitivität und Spezifität der MSP-Primerpaare im Etablierungsprobenset

Gezeigt wird die SEN und SPE, die für die MSP-Primerpaare vom Etablierungsprobenset berechnet wurden. Die SEN bezieht sich auf die Detektion der OvCa-Proben, die SPE dagegen auf die Identifizierung der benignen Proben als nicht methyliert.

NKX6-1 wies eine sehr hohe SPE mit 90,9% auf, hatte jedoch auch die niedrigste SEN mit 50%.

NKX2-8 wies dagegen die niedrigste SPE (54,5%) und gleichzeitig die höchste SEN (88,9%) auf.

Eine hohe SPE fand sich ebenso bei PRR15 (77,3%), SPAG6 (81,8%) und SV2C (77,3%). PRR15 und SV2C hatten gleichzeitig eine hohe SEN (83,3% bzw. 72,2%) und SPE. NR2F2 wies eine SEN von 72,2% und eine SPE von 63,6% auf. Bei allen Genen betrug die SEN und SPE jedoch $\geq 50\%$, und eine deutliche Differenzierung zwischen OvCa Proben und benignen Proben war möglich.

Zur Validierung der qMSP-Ergebnisse vom Etablierungsprobenset wurden die MSP-Primerpaare anschließend an einem größeren Probenset von Bauchraumspülflüssigkeiten getestet, dem Validierungsprobenset. Dieses bestand aus insg. 116 Proben, davon waren 39 benigne, zehn maligne, elf Borderline-Tumoren und 56 OvCa (Anhang Tab. III, S. III). Hier wurde gleichermaßen der Anteil methylierter Proben in jeder Probengruppe, sowie die SEN/SPE berechnet (Abb. 8 und Abb. 9).

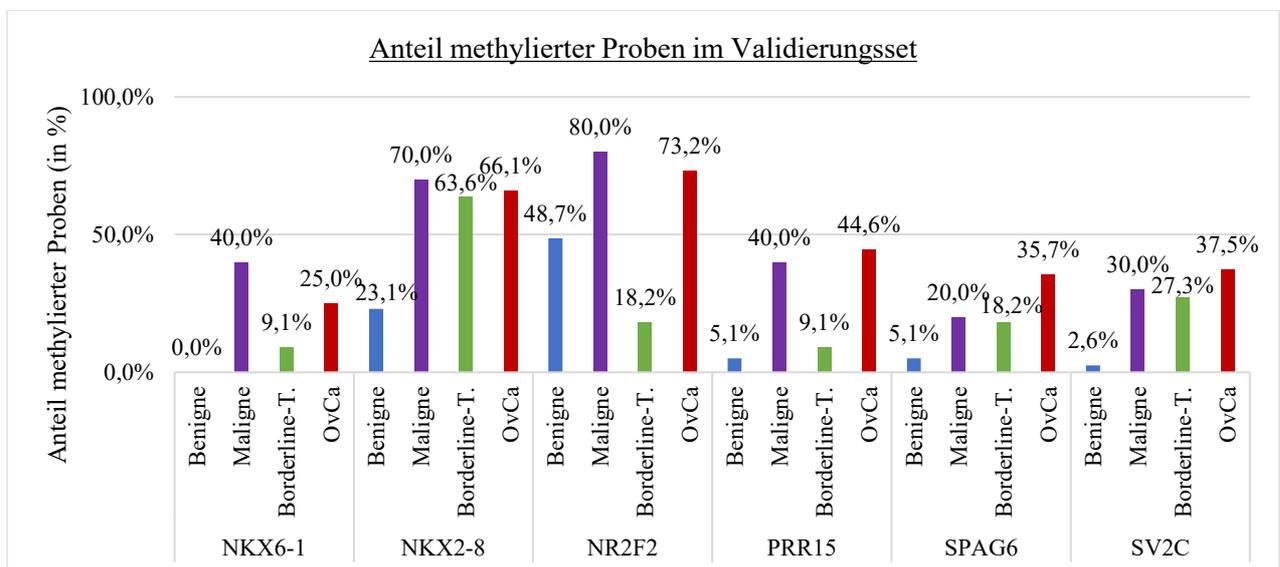


Abb. 8: Anteil methylierter Proben im Validierungsprobenset nach Probengruppe

Das Balkendiagramm zeigt für die sechs ausgewählten MSP-Primerpaare den Anteil, in Prozent, an methylierten Proben für die drei Probengruppen im Validierungsset (116 cfDNA Proben, davon 39 benigne Proben, zehn maligne Proben, elf Borderline-Tumor-Proben und 56 OvCa Proben).

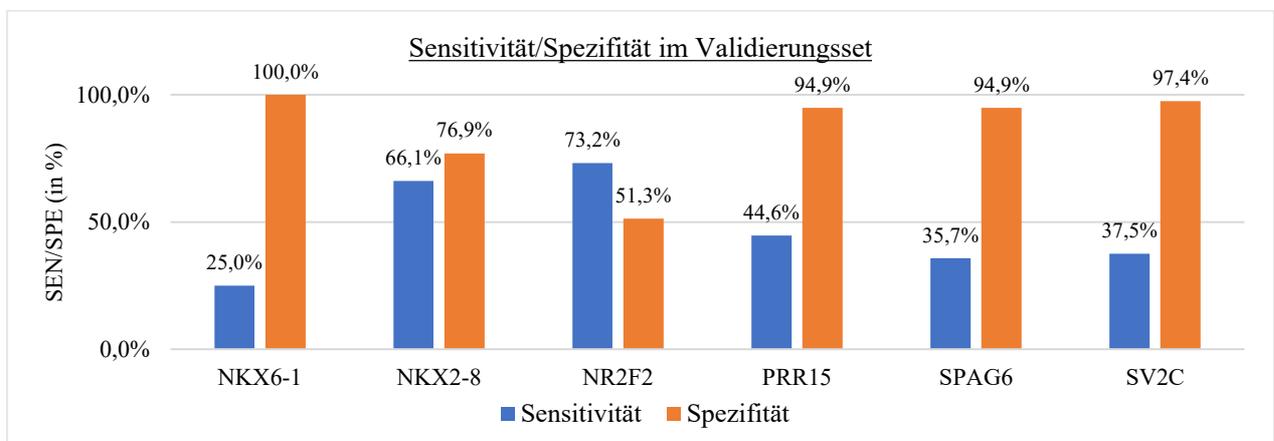


Abb. 9: Sensitivität und Spezifität der MSP-Primerpaare im Validierungsprobenset

Gezeigt wird die SEN und SPE, die für die MSP-Primerpaare vom Validierungsprobenset berechnet wurden. Die SEN bezieht sich auf die Detektion der OvCa-Proben, die SPE dagegen auf die Identifizierung der benignen Proben als nicht methyliert.

Die Ergebnisse des Validierungsprobensets unterschieden sich in verschiedener Hinsicht von denen des Etablierungsprobensets. Es zeigte sich zwar immer noch stetig ein höherer Anteil an methylierten Proben in der OvCa-Probengruppe verglichen mit der benignen Probengruppe, allerdings lag der Anteil methylierter OvCa-Proben bei NKX6-1, PRR15, SPAG6 und SV2C unter 50%. Auch NKX2-8 wies einen deutlich niedrigeren Anteil methylierter OvCa-Proben im Validierungsset auf (66,1% vs. 88,9% im Etablierungsset). NR2F2 zeigt als einziges MSP-Primerpaar mit 73,2% einen vergleichbaren Anteil methylierter OvCa-Proben zum Etablierungsset (72,2%). Die benignen Probengruppe hatte im Validierungsset ebenso einen deutlich niedrigeren Anteil methylierter Proben, bei vier der sechs MSP-Primerpaare (NKX6-1, PRR15, SPAG6, SV2C) zeigte sich ein Anteil $\leq 5,1\%$. NR2F2 und NKX2-8 bilden die Ausnahme mit einem Anteil methylierter benigner Proben von 48,7% bzw. 23,1%. Die malignen Proben zeigten im Validierungsset allgemein einen höheren Anteil methylierter Proben, und stellten bei drei der sechs MSP-Primerpaare (NKX6-1, NKX2-8 und NR2F2) die Probengruppe mit dem höchsten Anteil methylierter Proben dar. Die Gruppe der Borderline-Tumore verhielt sich sehr unterschiedlich mit Anteilen methylierter Proben von 9,1% (NKX6-1, PRR15) bis 63,6% (NKX2-8), jedoch war der Anteil stets geringer verglichen mit dem Anteil der OvCa/maligne Gruppe und, mit der Ausnahme von NR2F2, stets höher verglichen mit dem Anteil der benignen Proben. NKX2-8 und NR2F2 zeigten allgemein die höchsten Anteile methylierter Proben in allen Probengruppen und erreichten als einzige der sechs MSP-Primerpaare mehr als 50%.

Bei der Berechnung der SEN/SPE im Validierungsset zeigt sich eine größere Disparität zwischen SEN und SPE der MSP-Primerpaare verglichen mit dem Etablierungsset. Bis auf NR2F2 weisen alle MSP-Primerpaare eine deutlich höhere SPE auf, z.B. hat SV2C im Etablierungsset eine SPE von 77,3% und im Validierungsset eine SPE von 97,4%. Dagegen ist die SEN der sechs MSP-Primerpaare deutlich niedriger verglichen mit dem Etablierungsset. Bei vier der sechs MSP-Primerpaare (NKX6-1, PRR15, SPAG6, SV2C) liegt die errechnete SEN unter 45%. NKX6-1 hat gleichzeitig die höchste SPE (100%) und die niedrigste SEN (25%). Die 100%ige SPE kommt durch die offensichtlich fehlende SEN des MSP-Primerpaars zustande, weswegen NKX6-1 vermutlich nicht zur Differenzierung zwischen OvCa und benignen Proben geeignet ist. NR2F2 weist am ehesten ähnliche Werte wie im Etablierungsset auf (SEN: 73,2%, SPE: 51,3%).

Zur Einschätzung der Einflussstärke der Methylierung auf die Wahrscheinlichkeit, ein OvCa zu haben, wurden die Ergebnisse beider Probensets einer binär logistischen Regressionsanalyse unterzogen. Der Test prüft den Zusammenhang zwischen einer binären abhängigen Variable und mehreren unabhängigen Variablen; in diesem Fall wird der Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus einer Probe und der Wahrscheinlichkeit, ob die Probe ein OvCa ist, getestet.

Das dabei ausgerechnete Odds-Ratio (OR), oder Chancenverhältnis, gibt die Stärke des Zusammenhangs an. Bei allen MSP-Primerpaaren, mit der Ausnahme von NKX6-1 im Validierungsset, war das OR für beide Probensets statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Tab. 11). Das OR für das Etablierungs- und Validierungsset blieb bei einzelnen Primerpaaren wie SPAG6 ähnlich, bei SV2C zeigte sich eine größere Differenz von 8,8 im Etablierungsset zu 22,8 im Validierungsset. Das höchste OR im Mittel hatte PRR15 mit einem OR von 17,0 im Etablierungsset und ca. 15 im Validierungsset. Somit hatten Proben, bei denen mittels dem PRR15-Primerpaar eine Methylierung nachgewiesen wurde, eine 17- bzw. 15-mal größere Wahrscheinlichkeit, von der OvCa-Probengruppe als von der benignen Probengruppe zu stammen.

Tab. 11: Odds-Ratio („Exp(B)“) der OvCa-Wahrscheinlichkeit bei Methylierung

Dargestellt sind die Werte (mit 95% Konfidenzintervall, KI) des Odds-Ratio für die MSP-Primerpaare, jeweils für das Etablierungsprobenset („ES“) und das Validierungsprobenset („VS“). Aufgrund fehlender statistischer Signifikanz ($p > 0,05$) für das Odds-Ratio von NKX6-1 im VS wurde der Wert ausgeschlossen.

		NKX6-1	NKX2-8	NR2F2	PRR15	SPAG6	SV2C
Exp(B) [KI]	ES	10,0 [1,8 – 56,0]	9,6 [1,8 – 52,2]	4,6 [1,2 – 17,5]	17,0 [3,5 – 83,4]	9,0 [2,1 – 38,8]	8,8 [2,1 – 37,1]
	VS	nicht signifikant	6,5 [2,6 – 16,4]	2,9 [1,2 – 6,8]	14,9 [3,3 – 68,0]	10,3 [2,2 – 47,2]	22,8 [2,9 – 178,5]

Um die SEN der MSP-Primerpaare als Methylierungsmarker zu erhöhen, wurden Zweierkombinationen der Marker getestet. Es wurden die Ergebnisse von zwei der Marker zur Bewertung einer Probe als methyliert oder nicht-methyliert herangezogen – hierbei wurden „oder“-Kombinationen benutzt, sodass eine Probe bei einem der beiden Marker als methyliert detektiert worden sein muss, um als methyliert zu gelten. Bei der Kombination NKX6-1/NR2F2 reicht beispielsweise die Detektion einer Methylierung von NKX6-1 **oder** NR2F2 aus um diese Probe als positiv zu bewerten. Da bei manchen Proben nur von einer der beiden Markern eine Methylierung detektiert wird, ist es möglich, durch eine solche Kombination den Anteil an detektierten methylierten Proben zu erhöhen und in der OvCa-Probengruppe die SEN zu steigern. Bei zwei Markern mit unterschiedlichen SPE in Kombination kann der Marker mit der niedrigeren SPE jedoch eine Verringerung der allgemeinen SPE bewirken. Abb. 10 (S. 54) stellt die vier Markerkombinationen mit der besten SEN/SPE in dem Etablierungsprobenset dar.

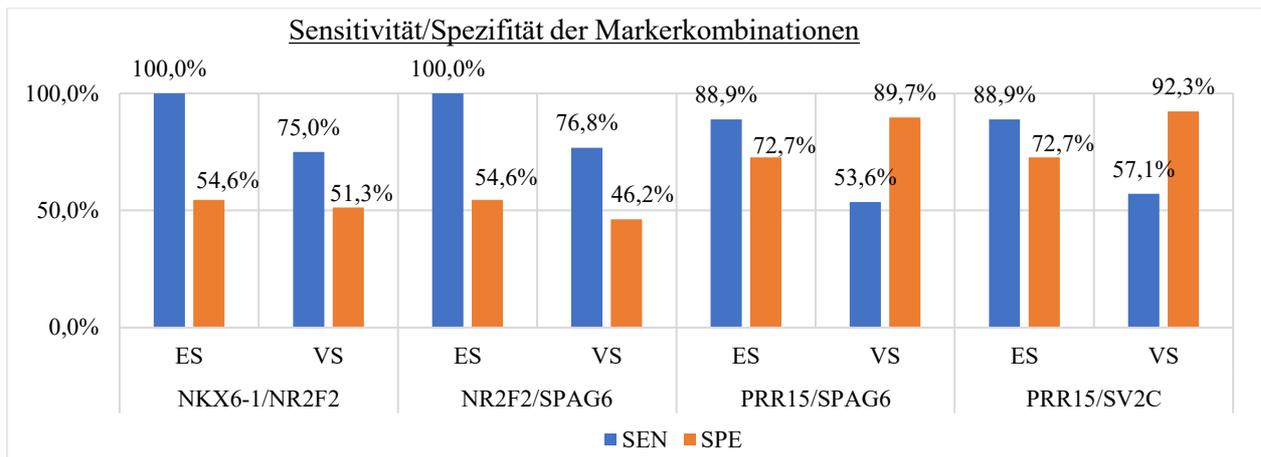


Abb. 10: Sensitivität und Spezifität der vier besten Markerkombinationen

Es werden die SEN und SPE jeweils für das Etablierungsprobenset („ES“) und das Validierungsprobenset („VS“) für vier Markerkombinationen dargestellt. Die Kombinationen sind „oder“-Kombinationen, sodass eine Probe als methyliert gewertet wurde, wenn einer der beiden Marker eine Methylierung aufwies.

Die vier Markerkombinationen wurden dann an dem Validierungsprobenset angewendet. Während sich im Etablierungsset bei allen vier Kombinationen eine sehr hohe SEN zeigte (88,9% und 100,0%), konnte dies im Validierungsset nicht bestätigt werden. Bei den Kombinationen NKX6-1/NR2F2 und NR2F2/SPAG6 fiel die SEN von 100,0% auf 75,0% bzw. 76,8%. Es zeigte sich bei diesen Kombinationen allgemein eine niedrige SPE im Etablierungsset (54,6%), die im Validierungsset ähnlich war. Die anderen zwei Kombinationen, PRR15/SPAG6 und PRR15/SV2C hatten im Validierungsset nur noch eine SEN von 53,6% bzw. 57,1%, verglichen mit 88,9% im Etablierungsset. Hier zeigte sich eine relativ hohe SPE (72,7%) im Etablierungsset, die im Validierungsset dafür deutlich höher war (89,7% bei PRR15/SPAG6 und 92,3% bei PRR15/SV2C). Somit zeigte sich keine eindeutige Verbesserung der SEN/SPE mit einer Markerkombination gegenüber den einzelnen Markern.

4.4. Relative Quantifizierung der Methylierung in cfDNA anhand MSP-Primer

Zusätzlich zur Einschätzung der Proben als methyliert oder nicht-methyliert wurde auch der relative Grad der Methylierung (in %) ausgerechnet, da die Konzentration der tumorspezifischen cfDNA in der Probe nicht bekannt war. Die relative Quantifizierung erfolgte anhand der Ct-Werte der Proben, mit dem β -Aktin-Primerpaar als Referenzgen. Das β -Aktin-Primerpaar wurde spezifisch für eine CpG-freie Sequenz des Gens für Bisulfit-behandelte DNA hergestellt, sodass die Amplifikation methylierungsunabhängig stattfindet und der Ct-Wert als relatives Maß der Menge an eingesetzter BS-DNA dienen könnte. Mit den qMSP-Ergebnissen von β -Aktin als Referenzgen, und der Positivkontrolle (100% *in vitro* methyliert) des jeweiligen Zielgens als Bezug, konnte die relative Methylierung in Prozent berechnet werden (siehe Formel 2 in Abs. 3.2.4.5., S. 39). Bei den Proben, die anhand der Schmelzkurvenanalyse als nicht-methyliert bewertet wurden, wurde die relative Methylierung auf „0%“ gesetzt. Die Werte der relativen

Methylierung der verschiedenen Proben Gruppen für das Etablierungs- und Validierungsset werden in Abb. 11 dargestellt.

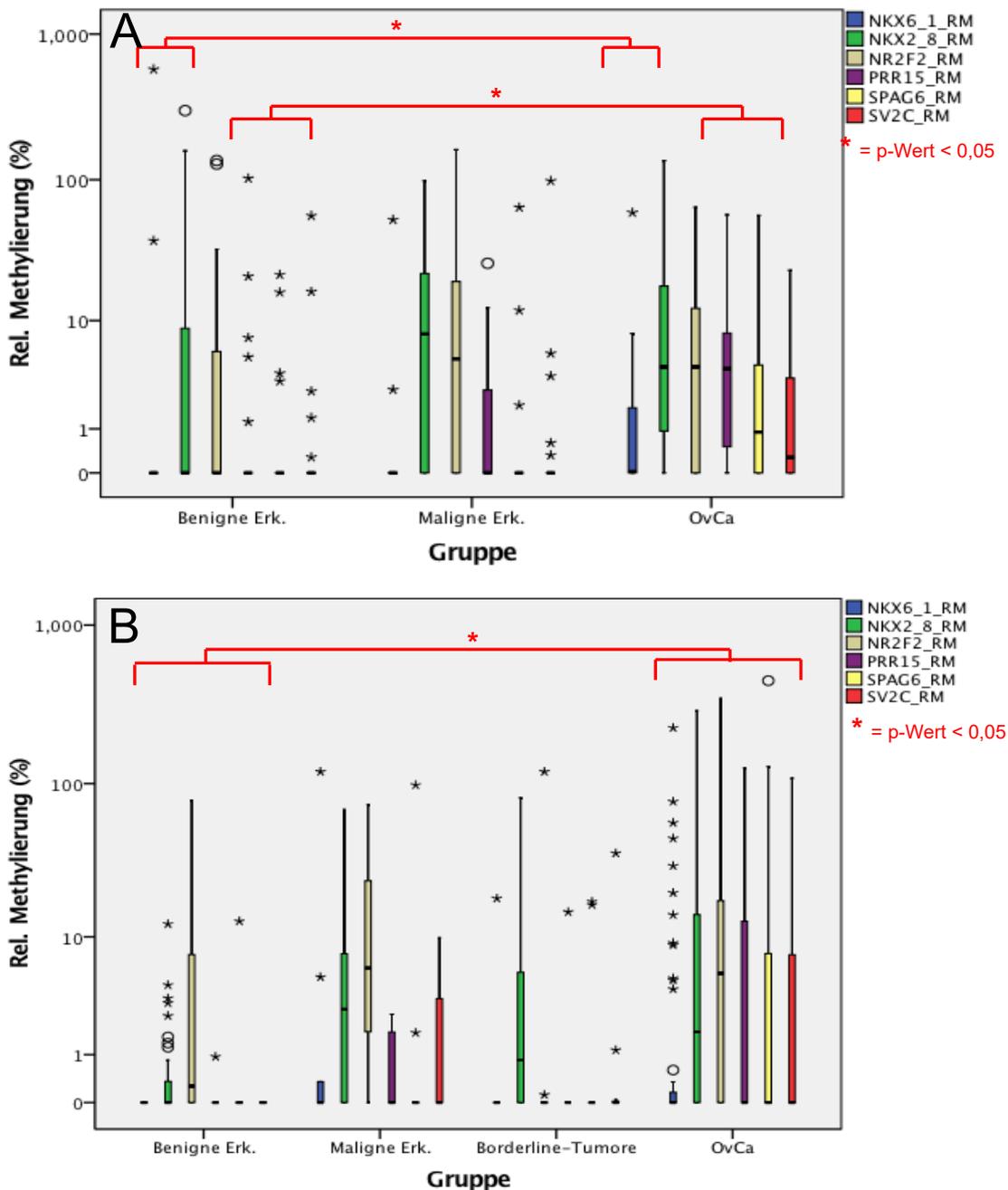


Abb. 11: Verteilung der relativen Methylierung für alle MSP-Primerpaare in cfDNA-Proben des Etablierungs- und Validierungsprobensets

Die zwei Boxplot-Diagramme zeigen die Verteilung der relativen Methylierung (in %) der Proben Gruppen des Etablierungssets (A, n=65) und Validierungssets (B, n=116). Da in dem Etablierungsset nur eine Borderline-Tumor-Probe vorhanden war, wurde diese von dem Diagramm ausgeschlossen. Die Bezeichnung „_RM“ hinter dem jeweiligen Namen des Primerpaars in der Legende steht hier für „relative Methylierung“. Statistisch signifikante Unterschiede sind nur für den Vergleich benigne vs. OvCa Proben gezeigt und sind mit einem roten „*“ gekennzeichnet (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$).

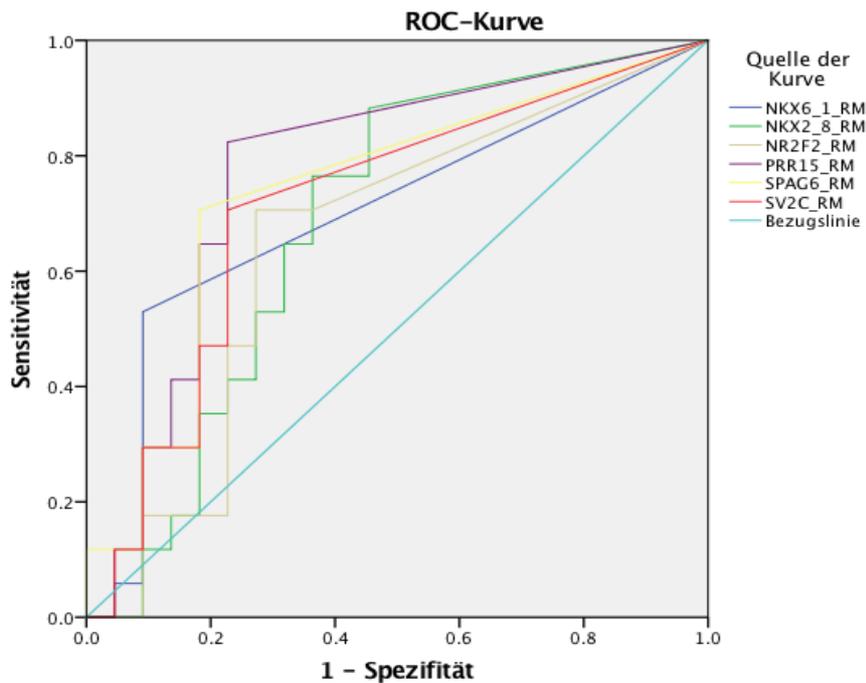
Im Etablierungsset (Abb. 11, A) zeigte sich eine höhere relative Methylierung der OvCa-Proben verglichen mit den benignen Erkrankungen. Bei allen Markern lag der Median der benignen Erkrankungen bei 0%, und in der Proben Gruppe der OvCa lag der Median stets über 0%. NKX6-

1, SPAG6 und SV2C hatten jedoch nur eine verhältnismäßig niedrige relative Methylierung mit einem Median von 0,02% bzw. 0,90% und 0,28%. Bei diesen drei Markern sowie auch bei PRR15 lag in der Gruppe der malignen Erkrankungen der Median bei jeweils 0%. Mit den Markern NKX6-1, SPAG6 und SV2C ließ sich demnach insgesamt nur ein geringes Maß an relativer Methylierung detektieren. Der Median der OvCa-Proben bei NKX2-8, NR2F2 und PRR15 lag etwas höher, zwischen 4,2% und 4,3%. NKX2-8 zeigte bei den malignen Erkrankungen den höchsten Median der relativen Methylierung mit 7,9%, NR2F2 wies in dieser Probengruppe einen Median von 5,0% auf. Somit fanden sich die höchsten Mediane der relativen Methylierung in der Gruppe der malignen Erkrankungen. Allerdings lagen hier nur bei zwei der sechs MSP-Primerpaare die Mediane über 0%, während in der Gruppe der OvCa-Proben alle Marker einen Median über 0% aufwiesen.

Im Validierungsset (Abb. 11, B, S. 55) lag der Median für NKX6-1, PRR15, SPAG6 und SV2C in allen Probengruppen bei 0%. Bei den benignen Erkrankungen zeigte NR2F2 als einziger Marker einen Median über 0% mit 0,27%. Bei den OvCa-Proben war der Median von NR2F2 dagegen 5,48%. Dies war der höchste Median der relativen Methylierung unter den OvCa-Proben im Validierungsset – bei NKX2-8 lag der Median noch bei 1,78%, die anderen Marker hatten einen Median von 0%. In der Gruppe der malignen Erkrankungen wiesen NKX2-8 und NR2F2 ebenso als einzige Marker einen Median von über 0% auf, mit 2,88% bzw. 6,08%. Somit war bei diesen MSP-Primerpaaren der Median der relativen Methylierung bei den malignen Erkrankungen höher als bei den OvCa-Proben. In der Gruppe der Borderline-Tumore zeigte NKX2-8 mit 0,85% als einziger Marker einen Median über 0%, allerdings ist dies auch nur ein sehr geringer Prozentsatz. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests konnten die Unterschiede der relativen Methylierung zwischen den Probengruppen auf ihre statistische Signifikanz getestet werden (es wurden Ergebnisse mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet). Im Vergleich der OvCa-Proben und der benignen Erkrankungen fand sich, mit der Ausnahme von NR2F2 im Etablierungsset, bei allen Markern in beiden Probensets ein signifikanter Unterschied der relativen Methylierung, mit einer signifikant höheren relativen Methylierung der OvCa-Proben. Die Unterschiede der relativen Methylierung zwischen den OvCa und malignen Erkrankungen waren im Validierungsset bei keiner der Marker signifikant, im Etablierungsset zeigte sich jedoch bei NKX6-1 ($p=0,005$), PRR15 ($p=0,013$), SPAG6 ($p=0,001$) und SV2C ($p=0,029$) eine signifikant höhere relative Methylierung der OvCa-Proben. Bei den Borderline-Tumoren gab es im Validierungsset bei NR2F2 ($p=0,003$) und PRR15 ($p=0,037$) signifikante Unterschiede der relativen Methylierung verglichen mit den OvCa. Schließlich wurden noch die benignen Proben mit den malignen Proben verglichen – im Etablierungsset gab es bei keinem der Marker einen signifikanten Unterschied der

relativen Methylierung, im Validierungsset fand sich jedoch bei allen Markern eine signifikant höhere relative Methylierung der malignen Proben.

Bei einem quantitativ messbaren Biomarker besteht nicht nur die Möglichkeit, das Auftreten des Markers zu detektieren, sondern auch zwischen verschiedenen Spiegeln des Markers zu unterscheiden. Dies wird vor allem relevant, wenn das Auftreten eines Biomarkers an sich nicht zwingend pathologisch ist, sondern erst ab einem bestimmten Wert als pathologisch erhöht/erniedrigt gilt. Da die MSP-Primerpaare in dieser Arbeit, die basierend auf genomische Methylierungs-*Microarray*-Analysen speziell zur Detektion von tumorspezifischen Methylierung hergestellt wurden, auch bei einzelnen benignen Proben eine Methylierung detektieren, stellt sich die Frage, ob mit einer quantitativen Bewertung eine bessere Unterscheidung zwischen OvCa und benignen Erkrankungen möglich wäre und demnach eine höhere SPE zu erzielen wäre. Dies ließe sich mit einem Schwellenwert (vom engl. *cut-off value*, auch *Cut-off*-Wert) der relativen Methylierung verwirklichen, bei dem eine Probe erst mit einer relativen Methylierung ab einem bestimmten Schwellenwert als „methyliert“ oder als „positives Testergebnis“ gilt. Um für die einzelnen MSP-Primerpaare den Schwellenwert mit der besten SEN/SPE zu finden, wurde mit den relativen Methylierungsdaten der benignen Proben und OvCa-Proben des Etablierungsprobensets eine ROC-Kurve (vom engl. *receiver-operating-characteristic-curve*, auch Grenzwertoptimierungskurve) erstellt (Abb. 12, S. 58). Mit den Ergebnissen der ROC-Kurve wurde für jedes MSP-Primerpaar ein geeigneter Schwellenwert der relativen Methylierung gewählt. Die Schwellenwerte sowie auch die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC, vom engl. *area under curve*), werden in Tab. 12 (S. 58) dargestellt.



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abb. 12: ROC-Kurve der relativen Methylierung des Etablierungsprobensets (benigne Erkrankungen und OvCa) mit den sechs MSP-Primerpaaren

Bei der gezeigten ROC-Kurve werden die verschiedenen möglichen relativen Methylierungsschwellenwerte der MSP-Primerpaare nach ihrer theoretischen SEN und SPE (als 1-Spezifität in der X-Achse) aufgetragen. Die Bezugslinie stellt einen Zufallsprozess dar, die linke obere Ecke des Diagramms einen Test mit perfekter Trennung (100%ige SEN und SPE). Desto mehr sich die ROC-Kurven der MSP-Primerpaare der linken oberen Ecke annähern, desto stärker ist die Trennung des Tests.

Tab. 12: Fläche unter der Kurve, Schwellenwerte und entsprechende Sensitivität/Spezifität der MSP-Primerpaare nach Ergebnissen der ROC-Kurve

Dargestellt werden hier die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) und die ausgewählten Schwellenwerte der relativen Methylierung (in %) für jedes MSP-Primerpaar basierend auf den relativen Methylierungsdaten des Etablierungsprobensets in der ROC-Kurve. Hierbei wurden nur die Daten der benignen Erkrankungen und OvCa berücksichtigt. Auch die SEN und SPE, die bei Anwendung des Schwellenwerts auf die genannten Proben erreicht werden würden, werden dargestellt.

MSP-Primerpaar	NKX6-1	NKX2-8	NR2F2	PRR15	SPAG6	SV2C
Fläche (AUC)	0,698	0,684	0,652	0,771	0,735	0,713
Schwellenwert (in %)	0,01	0,02	1,68	0,20	0,03	0,04
SEN (in %)	50,0	88,9	72,2	82,4	66,7	72,2
SPE (in %)	90,9	54,5	72,7	77,3	81,8	77,3

Die AUC einer ROC-Kurve ist ein Maß für die Güte des Tests und sollte einen Wert zwischen 0,5 und 1 annehmen, wobei eine AUC von 0,5 einen Zufallsprozess darstellt. Ab einer AUC von 0,7 bei einem Test wird von einer diagnostischen Sicherheit ausgegangen. Drei der sechs Marker (PRR15, SPAG6, SV2C) hatten eine AUC > 0,7, NKX6-1 hatte mit 0,698 ebenfalls eine hohe AUC. Die niedrigste AUC hatte NR2F2 mit 0,652. Hierbei hatte die AUC der vier Marker NKX6-1, PRR15, SPAG6 und SV2C auch eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$, während die AUC von NKX2-8 und NR2F2 nicht signifikant höher als 0,5 war.

Verglichen mit der SEN/SPE der binären Einschätzung der Proben als methyliert/nicht-methyliert (Abb. 7, S. 50) gab es mit der Schwellenwert-Methode lediglich bei NR2F2 und PRR15 geringe Veränderungen – bei allen anderen MSP-Primerpaaren blieb die SEN/SPE gleich. Da NR2F2 und PRR15 auch die einzigen Primerpaare mit Schwellenwerten $> 0,05$ waren, waren die Schwellenwerte der anderen Primerpaare vermutlich so gering, dass die Einschätzung mit Schwellenwert keinen Unterschied zur Einschätzung ohne Schwellenwert (nicht-methylierte Proben mit 0% relativer Methylierung, methylierte Proben alle mit $> 0\%$) aufwies. Bei NR2F2 führte der Schwellenwert zu einer Steigerung der SPE von 63,6% auf 72,7%. Bei PRR15 zeigte sich nur eine sehr geringe Veränderung der SEN von 83,3% zu 82,4%.

Die ausgewählten Schwellenwerte wurden danach an den benignen Proben und OvCa-Proben des Validierungssets angewendet. Bei NKX6-1 und NKX2-8 trat hier keine Veränderung der SEN oder SPE, verglichen mit den Ergebnissen in Abb. 9 (S. 51), ein. Bei SPAG6 und SV2C blieb die SEN gleich, die SPE verbesserte sich jedoch (SPAG von 94,9% zu 97,4% und SV2C von 97,4% zu 100,0%). Die SPE von NR2F2 und PRR15 verbesserte sich ebenso zu 69,2% bzw. 97,4%, jedoch verschlechterte sich hier die SEN (NR2F2: 67,9%; PRR15: 42,9%).

Parallel zum Abschnitt 4.3. (S. 49), im Rahmen dessen die Probenbewertung anhand binärer Einteilung in methyliert/nicht-methyliert unabhängig von der relativen Methylierung erfolgte, wurden hier auch Markerkombinationen mit den entsprechenden Schwellenwerten getestet. Die vier besten Markerkombinationen vom Etablierungsprobenset wurden anschließend an dem Validierungsprobenset angewendet. Die SEN/SPE der vier besten Markerkombinationen werden in Abb. 13 dargestellt. Es handelt sich hier wieder bei allen Kombinationen um „oder“-Kombinationen.

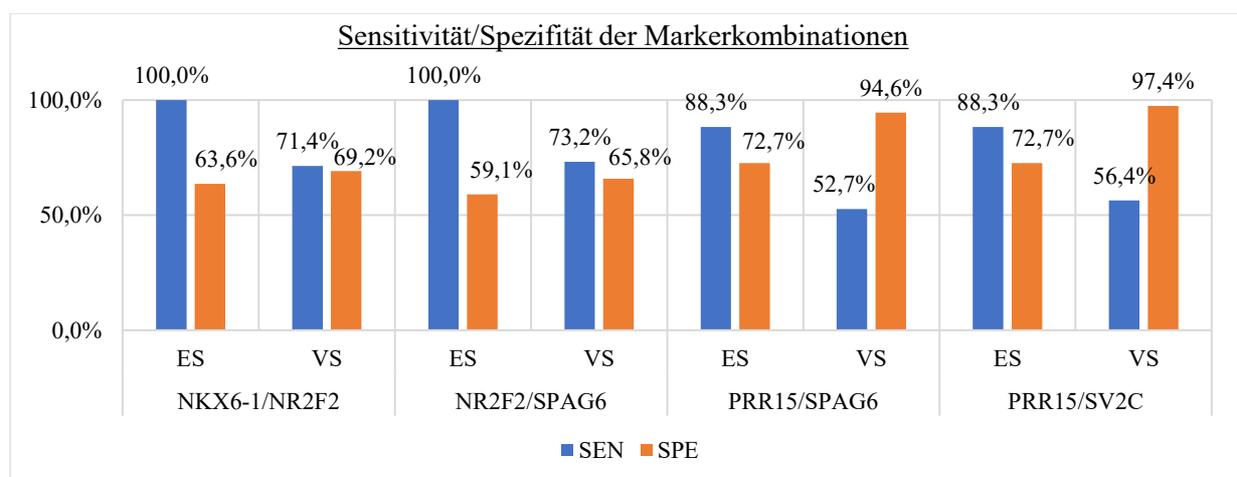


Abb. 13: Sensitivität und Spezifität der vier besten Markerkombinationen mit Schwellenwerten
 Es werden die SEN und SPE jeweils für das Etablierungsprobenset („ES“) und das Validierungsprobenset („VS“) für vier Markerkombinationen anhand der einzelnen ROC-Kurven-Schwellenwerte dargestellt. Die Kombinationen sind „oder“-Kombinationen, sodass eine Probe als methyliert gewertet wurde, wenn einer der beiden Marker eine Methylierung oberhalb des Schwellenwertes aufwies.

Es zeigen sich in den Ergebnissen ähnliche Tendenzen wie im vorigen Abschnitt (Abb. 10, S. 54), auch hier sind die vier Markerkombinationen mit den besten SEN/SPE Ergebnissen die gleichen. Da die Schwellenwerte der ROC-Kurve allgemein sehr niedrig waren und sich in der Bewertung der Probe nur kleine Unterschiede fanden, war dies zu erwarten. Zwar gibt es nach wie vor deutliche Unterschiede zwischen Etablierungs- und Validierungsprobensets, v.a. bezüglich der SEN, die Trends der Unterschiede gleichen jedoch denen in Abb. 10. Es soll hier vor allem auf die Unterschiede zwischen beiden Methoden der Probenbewertung mittels Markerkombinationen (Einteilung in methyliert/nicht-methyliert unabhängig von der relativen Methylierung vs. Einteilung anhand quantitativen Schwellenwert der relativen Methylierung) mit Hinblick auf die SEN/SPE eingegangen werden. Die SEN der Kombination NKX6-1/NR2F2 ist in beiden Probensets vergleichbar zu Abb. 10 geblieben, jedoch verbesserte sich die SPE im Etablierungsset um 9,0% und im Validierungsset um 17,9%. Die Kombination NR2F2/SPAG6 zeigte sehr ähnliche Ergebnisse im Etablierungsset; im Validierungsset kam es zu einer sehr geringen Verschlechterung der SEN um 3,6%, während die SEN sich um 19,6% steigerte. Schließlich zeigten die Kombinationen PRR15/SPAG6 und PRR15/SV2C im Etablierungsset kaum Veränderung zu den vorherigen Ergebnissen, und auch die jeweilige SEN im Validierungsset blieb fast gleich, jedoch verbesserte sich die SPE bei beiden Kombinationen im Validierungsset um ca. 5%. Zusammenfassend finden sich durch die quantitative Probenbewertung mittels relativem Methylierungs-Schwellenwert nur relativ kleine Unterschiede zum vorigen Abschnitt. Vor allem die SPE einiger Markerkombinationen lässt sich mit den Schwellenwerten verbessern, da einzelne benigne Proben mit geringer relativer Methylierung unterhalb des Schwellenwertes dann richtigerweise als negativ/nicht-erkrankt erkannt werden. Da ein Schwellenwert im Gegensatz zur vorherigen Einteilung in methyliert/nicht-methyliert höchstens weitere Proben als nicht-methyliert einstufen würde, ist eine Verbesserung der SEN nicht zu erwarten, und es kam hier auch entweder zu keiner Veränderung oder einer geringen Verschlechterung der SEN.

4.5. Vergleich der Methylierung der Marker in cfDNA, Primärtumor und Zellen der Bauchraumflüssigkeit

Nach dem heutigen Forschungsstand wird vermutet, dass tumorspezifische DNA-Methylierung ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung und zumindest teilweise eine Ursache dafür sein kann. Andererseits ist bekannt, dass auch epigenetische Merkmale einer gewissen Heterogenität in Tumoren unterliegen. Demnach ist es denkbar, dass die DNA-Methylierung, die stabil an Tochterzellen weitergegeben wird, sowohl homogen, als auch heterogen im Gewebe des PT, in Tumorabsiedlungen, in Tumorzellen in der Bauchraumflüssigkeit und in der cfDNA zu finden ist.

Um dies zu untersuchen, wurden für 23 Proben (21 OvCa-Proben, zwei Borderline-Tumoren) jeweils die cfDNA, PT-Gewebe und das Zellpellet der Bauchraumflüssigkeit (nach Zentrifugation) anhand der MSP-Primerpaare getestet und die Methylierung verglichen. Der durchschnittliche Ct-Wert, als relatives Maß für die Anfangsmenge an DNA im PCR-Reaktionsansatz, betrug in der cfDNA-Probengruppe 32,3. In der Zellpellet- und PT-Probengruppe war der durchschnittliche Ct-Wert mit 25,1 bzw. 26,4 niedriger, somit war die Menge an DNA deutlich höher.

Die Bewertung der Proben basierend auf den Schmelzkurvenanalysen zeigte, dass der Anteil an methylierten Proben in der cfDNA-Gruppe bei allen Markern deutlich niedriger verglichen mit der Zellpellet- und der PT-Gruppe war. NKX6-1 und SV2C hatten die niedrigsten Anteile methylierter Proben in der cfDNA-Gruppe mit 32% bzw. 36%, während sich im Zellpellet und im PT Anteile von $\geq 78\%$ zeigten. In der cfDNA-Gruppe hatte SPAG6 einen Anteil methylierter Proben von 45%, und die anderen drei Marker (NKX2-8, NR2F2, PRR15) detektierten mit 64% - 68% einige methylierte Proben mehr. In der Zellpellet- und PT-Probengruppe wurden bei den eben genannten vier Markern einmal 83% (SPAG6, Zellpellet-Probengruppe) der Proben als methyliert detektiert, ansonsten $> 90\%$. Zwischen den Zellpellet- und PT-Probengruppen ließen sich am Anteil der methylierten Proben, mit der Ausnahme von NKX6-1 (Anteil methylierter Proben: Zellpellet-Gruppe 91%, PT-Gruppe 78%), bei allen Markern keine deutlichen Unterschiede finden.

Zusätzlich wurde auch die relative Methylierung der verschiedenen Probenmaterialien verglichen (Abb. 14, S. 62). Bei zwölf der 23 Proben (alle zwölf OvCa) war zusätzlich zu dem PT-Gewebe auch Gewebe von Tumorabsiedlungen vorhanden. Diese Proben der Tumorabsiedlungen wurden auf gleicher Weise getestet und zum Vergleich der relativen Methylierung herangezogen.

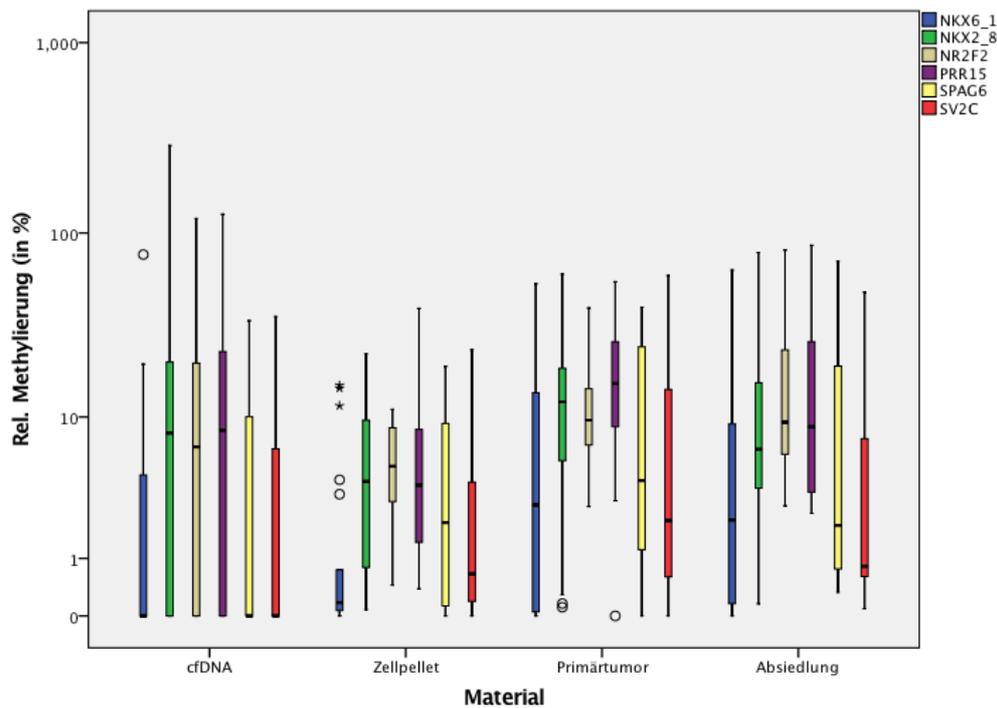


Abb. 14: Verteilung der relativen Methylierung für alle MSP-Primerpaare in Proben von cfDNA, Zellpellet, Primärtumorgewebe und Gewebe von Tumorabsiedlungen

Das Boxplot-Diagramm zeigt die Verteilung der relativen Methylierung (in %) bei den verschiedenen Probenmaterialien: cfDNA, Zellpellet, PT (n=23) und Tumorabsiedlung (n=12).

Im Boxplot zeigen sich bei allen sechs Markern über die verschiedenen Probenmaterialien generell sehr ähnliche und relativ niedrige Werte der relativen Methylierung. Trotzdem findet sich in der Regel eine höhere relative Methylierung in den Gewebeproben (PT, Absiedlung) als in der cfDNA oder in dem Zellpellet. Bei allen Markern hatte die Gruppe der PT den höchsten Median der relativen Methylierung, und die Gruppe der cfDNA oder das Zellpellet den niedrigsten Median. Der Median der cfDNA-Proben war insgesamt sehr niedrig – NKX6-1, SPAG6 und SV2C hatten einen Median der relativen Methylierung von 0%, während der Median von NKX2-8, NR2F2, und PRR15 zwischen 6,6 – 8,8% lag. In der Gruppe der cfDNA fand sich bei allen Markern aber auch eine deutliche Streuung der relativen Methylierungswerte. NKX6-1, SPAG6 und SV2C detektierten bei allen Probengruppen nur eine sehr geringe mediane relative Methylierung verglichen mit den anderen Markern: Der höchste Median lag bei SPAG6 in der Gruppe der PT mit 4,1%, und bei den Zellpellet- sowie Absiedlungsproben war der Median < 3%. Die Ergebnisse dieser drei Marker haben auch eine relativ breite Streuung, v.a. verglichen mit NR2F2 und PRR15. Bei NKX2-8, NR2F2 und PRR15 hatte stets die Zellpellet-Gruppe die niedrigste mediane relative Methylierung mit 3,8 – 5,1%, während sich in der Gruppe der PT deutlich höhere Mediane von 9,6 – 15,5% fanden. Bei NR2F2 und PRR15 hatten die Absiedlungen eine ähnlich hohe mediane relative Methylierung mit ca. 9%, bei NKX2-8 wies der Median hier jedoch nur 6,5% auf, welches niedriger als der Median der cfDNA-Gruppe (8,2%) war. Der höchste Median der relativen Methylierung fand sich mit 15,5% bei den PT mit PRR15. Es soll hier nochmal angemerkt werden,

dass die cfDNA-OvCa-Proben im Vergleich zu den PT zwar eher niedrige Werte der relativen Methylierung aufwiesen, dennoch eine signifikant höhere relative Methylierung als die benignen cfDNA-Proben zeigten (siehe Abb. 11, S. 55).

Da bei zwölf Proben Material von dem PT sowie von Absiedlungen vorhanden war, wurden diese Proben auf intratumorale Heterogenität untersucht. Unterschiede der relativen Methylierung von PT und Absiedlung der gleichen Patientin sollten Hinweise auf epigenetische Unterschiede zwischen Tumorzellen liefern. Eine Abschätzung des Tumorzellanteils (in %) dieser Proben war von Gewebeschnitten mit HE-Färbung bekannt. Zum Vergleich des PT und der Absiedlung wurde unter Berücksichtigung des Tumorzellanteils die relative Methylierung berechnet und anhand dessen das Verhältnis der relativen Methylierung zwischen PT und Absiedlung für die sechs Marker bestimmt. Ab einem 2-fachen Unterschied, also wenn die relative Methylierung vom PT mehr als 2-fach größer oder kleiner als die der Absiedlung war, galt die Probe als heterogen. Sechs der zwölf Proben zeigten eine homogene relative Methylierung zwischen PT und Absiedlung für alle Marker. Bei fünf der zwölf Proben wiesen die Mehrzahl der Marker (≥ 3) eine heterogene relative Methylierung auf. Die übrige Probe wurde als „unklar“ bewertet, da nur ein Marker (NR2F2) eine heterogene relative Methylierung aufwies. Die Methylierungsmarker, die am häufigsten eine Heterogenität zwischen PT und Absiedlung aufwiesen, waren PRR15 (heterogene relative Methylierung bei allen fünf „heterogenen“ Proben) und NKX2-8 (heterogene relative Methylierung bei vier der fünf „heterogenen“ Proben). In Abb. 15 (S. 64) wird die relative Methylierung (unter Berücksichtigung des Tumorzellanteils) der PT- und Tumorabsiedlungsproben dargestellt.

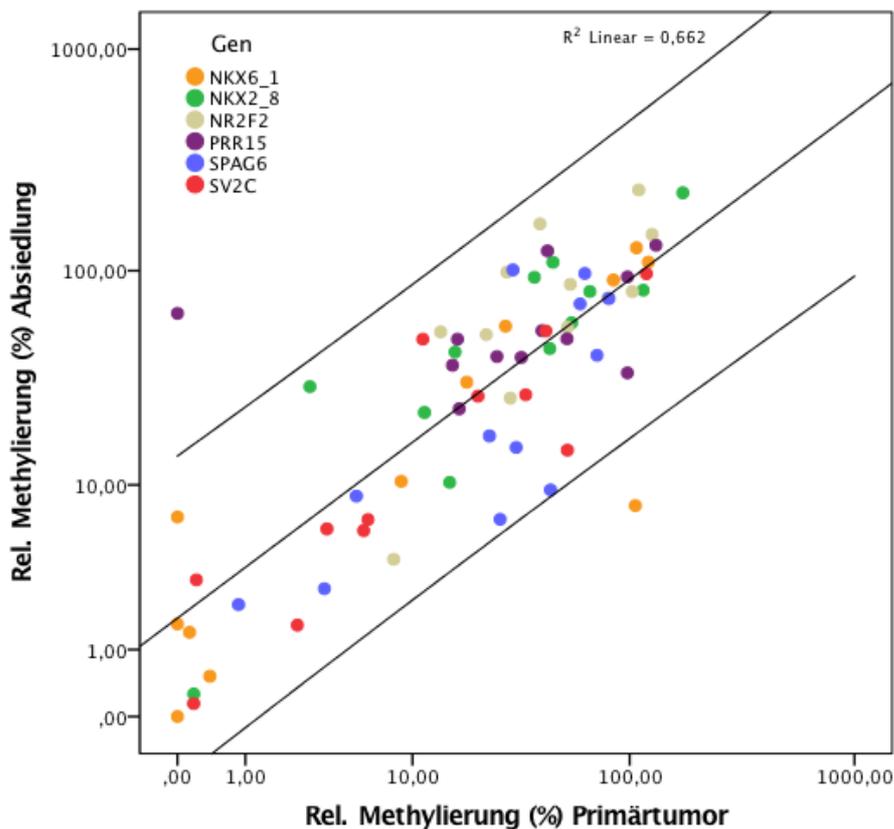


Abb. 15: Verteilung der relativen Methylierung für alle MSP-Primerpaare in Proben von Primärtumorgewebe und Gewebe von Tumorabsiedlungen

Das Streudiagramm zeigt die Verteilung der relativen Methylierung (in %) der Proben vom PT und von der Tumorabsiedlung (n=12).

Die Verteilung der relativen Methylierung der Proben ist im PT-Gewebe und in den Tumorabsiedlungen sehr ähnlich. Die Regressionsgerade mit Grenzlinien für 95% der Werte zeigt etwas höhere Werte der relativen Methylierung in den Absiedlungsproben, aber allgemein eine relative Übereinstimmung der Werte in PT und Absiedlung und nur wenige Punkte mit starker Abweichung von der Regressionsgerade. Auch die Mediane aller zwölf Proben sind bei NKX6-1 (PT: 6,3%; Absiedl.: 9,1%), PRR15 (PT: 47,5%; Absiedl.: 48,8%) und SV2C (PT: 14,2%; Absiedl.: 10,7%) vergleichbar. Bei NKX2-8 und NR2F2 ist der Median der relativen Methylierung der Tumorabsiedlungen deutlich höher als bei den PT. Dafür liegt der Median der PT für SPAG6 fast doppelt so hoch wie der Median der Tumorabsiedlungen (PT: 30,2%; Absiedl.: 16,2%).

Laut dem Wilcoxon-Test findet sich bei fünf der sechs Marker kein signifikanter Unterschied der relativen Methylierung zwischen den PT und den Absiedlungen. Nur bei NKX2-8 ($p=0,041$) hatten die Absiedlungen eine signifikant höhere relative Methylierung gegenüber den PT, doch auch bei NR2F2 ($p=0,060$) und PRR15 ($p=0,071$) scheinen die Absiedlungen eine höhere relative Methylierung aufzuweisen.

Des Weiteren wurden die Marker auch an einem größeren Probenstet von Zellpellet-Proben aus Bauchraumspülflüssigkeiten getestet (n=124, 37 x benigne Erk., 29 x maligne Erk., 13 x

Borderline-Tumor, 45 x OvCa) und anhand der qMSP-Ergebnisse die SEN/SPE ausgerechnet. Die Differenzierung von OvCa und benignen Erkrankungen anhand der MSP-Primerpaare funktionierte deutlich schlechter bei den Zellpellet-Proben verglichen mit der cfDNA. Bei NKX2-8, PRR15, NR2F2 und SV2C zeigte sich eine fast 100%ige SEN (91,0 – 100,0%) bei einer SPE von 0,0% (NR2F2), 5,4% (NKX2-8), 10,8% (PRR15) und 32,4% (SV2C). Somit ließ sich bei den Zellpellet-Proben mit diesen Markern nicht zwischen OvCa und Kontrollproben (benigne Erk.) unterscheiden. NKX6-1 und SPAG6 hatten eine SEN von 77,8% bzw. 71,1% bei einer SPE von 40,5 – 46,0%. Somit war mit diesen zwei Markern schon eher eine Unterscheidung von OvCa und Kontrollen möglich, dennoch zeigte sich kein Vorteil der Zellfraktion der Bauchraumspülflüssigkeit gegenüber der cfDNA.

4.6. Bewertung potenzieller Einflussfaktoren der DNA-Methylierung

Da die DNA-Methylierung von CpG-Inseln in OvCa-Proben auch durch Faktoren zusätzlich zur Tumorentität beeinflusst werden kann und die OvCa-Proben sich in einigen Punkten unterscheiden, werden im Folgenden die als relevant eingestuften Einflussfaktoren an den OvCa-Proben untersucht und bewertet. Von der Information, die über die Proben vorhanden war, wurden das Patientinnenalter, das FIGO-Stadium, der histologische Subtyp, und das Vorkommen einer Chemotherapie in der Anamnese/ dem Therapieverlauf vor der Probenentnahme als potenzielle Einflussfaktoren gewählt. Es handelt sich hierbei um eine explorative Untersuchung der vorhandenen Daten, deswegen wird das gesamte OvCa-Probenset bewertet, es erfolgt keine Unterteilung in Etablierungs- und Validierungsprobenset. In Tab. 13 (S. 70) wird eine Übersicht der Ergebnisse von den Abschnitten 4.6.1. – 4.6.4. (S. 65 – S. 70) dargestellt.

4.6.1. Patientinnenalter

In der Probengruppe der OvCa befanden sich Patientinnen mit einer Altersspanne von 27 bis 84 Jahren. Da es im höheren Alter zu einem veränderten Methylierungsstatus mit allgemeiner, genomweiter Hypomethylierung und CpG-Insel-spezifischer Hypermethylierung kommt, stellt das Patientinnenalter einen potenziellen Einflussfaktor auf den Methylierungsstatus der Proben dar (Flanagan et al. 2015, Jones et al. 2015).

Das OvCa-Probenset (n=74) wurde anhand des Patientinnenalters zum Zeitpunkt der Operation/Probenentnahme in zwei Altersgruppen aufgeteilt, die erste Gruppe mit Patientinnen < 65 Jahren (n=42) und das zweite Set mit Proben von Patientinnen ≥ 65 Jahren (n=32). Die Altersgruppen wurden so gewählt, dass es zu zwei ähnlich großen Probensets kommt. Zuerst wurde der Einfluss des Patientinnenalters auf den Anteil methylierter Proben im gesamten OvCa-Probenset anhand des Exakten Tests nach Fischer bewertet: Der einzige Methylierungsmarker, bei

dem zwischen der Altersgruppe und dem Anteil methylierter Proben ein signifikanter Zusammenhang bestand, war NKX6-1 ($p=0,013$). In der Altersgruppe < 65 Jahren war die deutliche Mehrzahl der Proben unmethyliert, doppelt so viele wie in der Altersgruppe ≥ 65 Jahren. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde nach einem signifikanten Unterschied der relativen Methylierung zwischen den zwei Altersgruppen gesucht und es zeigte sich hier auch nur bei NKX6-1 ein signifikanter Unterschied ($p=0,009$) mit einem höheren Grad der relativen Methylierung in der älteren Gruppe. Bei den anderen fünf Methylierungsmarkern zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen.

Zusätzlich wurde der Effekt des Patientinnenalters auf die binäre logistische Regressionsanalyse in Tab. 11 (S. 53) untersucht, indem das Alter als Kovariable zur Probengruppe hinzugefügt wurde. Durch die Regressionsanalyse wird die Signifikanz der Altersvariable im Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus der Probe und der Wahrscheinlichkeit der Probe, ein OvCa oder eine benigne Kontrollprobe zu sein, errechnet. Es wird ebenso ein neues Odds-Ratio unter Berücksichtigung des Alters als Kovariable errechnet. Somit wird untersucht, ob das Patientinnenalter bei dem Test mit den hier untersuchten Methylierungsmarkern zur Differenzierung zwischen benignen und OvCa Proben berücksichtigt werden sollte. Das Probenet wurde wie bei der in Tab. 11 befindlichen binär-logistischen Regressionsanalyse (ohne Alter als Kovariable) in das Etablierungs- und Validierungsset geteilt. Im Etablierungsprobenet war das Alter bei fünf der sechs Methylierungsmarker nicht signifikant, nur bei NR2F2 war $p=0,019$. Das OR stieg durch die Berücksichtigung des Alters von 4,6 auf 7,2. Im Validierungsprobenet hatte das Alter bei allen Methylierungsmarkern eine starke Signifikanz ($p=0,000$), jedoch mit unterschiedlichem Effekt auf das OR. Bei NKX2-8 und NR2F2 kam es zu einer Zunahme des OR auf 10,5 bzw. 4,3, und bei PRR15, SPAG6 und SV2C zu einer Abnahme. Der größte Einfluss der Altersberücksichtigung auf das OR fand sich bei SV2C, wo das OR von 22,8 auf 15,8 abfiel. NKX6-1 blieb als abhängige Variable im Validierungsset trotz starker Signifikanz des Alters nicht signifikant. Eine Zunahme des OR deutet darauf hin, dass die Berücksichtigung des Patientinnenalters zu der Differenzierung der Proben beitragen würde und den Prozentsatz der richtig eingeschätzten Proben erhöhen würde.

4.6.2. FIGO-Stadium

Die OvCa-Probengruppe in dieser Arbeit umfasste OvCa von verschiedenen FIGO-Stadien. Da vermutet wird, dass die CpG-Insel-Methylierung ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung ist, wäre nicht zwingenderweise zu erwarten, dass fortgeschrittene Tumore häufiger DNA-Methylierung aufweisen als Tumore im Frühstadium. Allerdings kann die genomische Instabilität eines Tumors dazu führen, dass neue CpG-Insel-Methylierungen und Mutationen mit

zunehmender Zeit und zunehmendem Tumorfortschritt entstehen, und eine Studie der Arbeitsgruppe *Watts et al.* fand in OvCa-Gewebeproben mit zunehmendem Erkrankungsstadium eine zunehmende promotorspezifischen Hypermethylierung sowie Hypomethylierung von repetitiven DNA-Sequenzen (Watts et al. 2008). Des Weiteren wird bei fortgeschrittenen Tumoren eine höhere Konzentration an tumorspezifischer cfDNA gefunden, sodass es möglich ist, dass die Methylierung bei den Frühstadien durch die Marker in dieser Arbeit nicht nachweisbar oder die relative Methylierung deutlich niedriger war (Kim et al. 2014, Bedin et al. 2017).

Die 73 OvCa-Proben (nach Ausschluss eines Peritoneal-Ca ohne FIGO-Einstufung) wurden anhand ihres FIGO-Stadiums in drei Gruppen aufgeteilt: Frühes Stadium (FIGO IA – IB, n=13), mittleres Stadium (FIGO IC – IIC, n=12) und fortgeschrittenes Stadium (FIGO IIIA – IV, n=48). Die Mehrzahl der Proben kam von fortgeschrittenen OvCa, da OvCa nur selten in einem frühen Stadium entdeckt und operiert werden. Es wurde anhand der Methylierungsmarker die durchschnittliche relative Methylierung und der Anteil methylierter Proben der verschiedenen FIGO-Gruppen ausgerechnet und verglichen. In Bezug auf den Anteil methylierter Proben fanden sich in fortgeschrittenen Stadien tendenziell höhere Anteile, ansonsten jedoch größtenteils keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Beim Vergleich der relativen Methylierung der frühen vs. fortgeschrittenen FIGO-Gruppe gab es für SPAG6 ($p=0,048$) und SV2C ($p=0,023$) einen statistisch signifikanten Unterschied, bei dem in der Gruppe der fortgeschrittenen OvCa eine signifikant höhere durchschnittliche relative Methylierung auftrat. Auch beim Vergleich der fortgeschrittenen mit den mittleren Stadien fand sich bei NKX2-8 ($p=0,038$), PRR15 ($p=0,011$) und SPAG6 ($p=0,046$) eine signifikant höhere relative Methylierung bei den fortgeschrittenen Stadien. Zusammenfassend zeigte sich bei vier der sechs Methylierungsmarker eine signifikante Korrelation mit dem FIGO-Stadium, bei denen eine stärkere Methylierung scheinbar durch ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium begünstigt wurde.

4.6.3. Histologischer Subtyp

Da die verschiedenen histologischen Subtypen des OvCa sich genetisch unterscheiden und auch die CpG-Methylierung in unterschiedlichem Maße auftritt, wurde die Gruppe der OvCa-Proben in dieser Arbeit nochmals nach histologischer Differenzierung aufgeteilt (Earp und Cunningham 2015, Cuellar-Partida et al. 2016). Von den 74 OvCa-Proben waren 58 seröse OvCa, und 16 von einem anderen histologischen Subtyp (endometrioid, muzinös, klarzellig, Siegenringzellkarzinom, undifferenziert). Da das seröse OvCa den häufigsten und am besten untersuchten Subtyp des OvCa darstellt und von den anderen Subtypen jeweils nur wenige Fälle vorhanden waren, bildeten die serösen OvCa eine eigene Gruppe und die anderen Proben wurden zu einer Gruppe „nicht-seröser OvCa“ zusammengefügt. Der exakte Test nach Fischer fand bei allen sechs Methylierungsmarkern

zwischen den serösen und nicht-serösen OvCa keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) im Anteil methylierter Proben. Mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab sich bei NKX2-8 ($p=0,038$) und SV2C ($p=0,029$) ein signifikanter Unterschied der relativen Methylierung, und zwar fand sich bei beiden Methylierungsmarkern ein signifikant höherer Grad der relativen Methylierung in der Gruppe der serösen OvCa. Bei den anderen vier Methylierungsmarkern ergab sich hier ebenso kein signifikanter Unterschied. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Methylierungsmarker je nach histologischem Subtyp unterschiedlich stark methyliert sind und dementsprechend bei bestimmten histologischen OvCa-Subtypen geeigneter als bei anderen sind. Bei anderen Methylierungsmarkern wiederum findet sich eine Übereinstimmung der Methylierung trotz unterschiedlicher histologischer Differenzierung. Somit kann, jedoch muss der histologische Subtyp nicht ein Einflussfaktor auf die tumorspezifischen Methylierung sein. Dies hängt im Einzelfall von dem spezifischen Methylierungsmuster ab.

4.6.4. Zustand nach Chemotherapie und Rezidive

Nach leitliniengerechter Therapie des OvCa bekommen die Patientinnen nach einer Primäroperation eine adjuvante platinhaltige Chemotherapie. Eine neoadjuvante Chemotherapie wird nicht empfohlen, da bisherige Studien keinen eindeutigen Vorteil in Outcome oder Überleben darlegen konnten (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Da die Proben in dieser Arbeit intraoperativ im Rahmen der Primäroperation gesammelt wurden, hatten die Patientinnen in der Regel in einem begrenzten Zeitraum davor keine Chemotherapie bekommen. Jedoch gab es von den 74 OvCa-Proben 18, die vor der Operation und Probensammlung eine Chemotherapie bekommen haben. Davon waren acht Proben Ersttumoren, die eine neoadjuvante Chemotherapie bekommen haben, und zehn Proben Rezidive, die nach der adjuvanten Chemotherapie des Ersttumors aufgetreten sind.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von *Flanagan et al.* zeigten deutliche Veränderungen der DNA-Methylierung in OvCa-Proben vor der Chemotherapie und nach Auftreten eines Rezidivs (Flanagan et al. 2017). Es zeigten sich hier sowohl weniger als auch mehr methylierte Regionen im Vergleich zum Vorbefund, und eine DNA-Hypermethylierung nach platinhaltiger Chemotherapie war mit einem verbesserten Überleben assoziiert. Es wird vermutet, dass durch platinhaltige Chemotherapeutika ausgelöste DNA-Schäden DNA-Mismatch-Reparaturproteine anlocken und diese wiederum die DNA-Methyltransferase DNMT1 an das Chromatin rekrutieren können. Somit können Platin-induzierte DNA-Schäden den Methylierungsstatus der DNA beeinflussen (Ding et al. 2016, Flanagan et al. 2017). Des Weiteren können Veränderungen der DNA-Methylierung durch platinhaltige Chemotherapeutika längerfristig zur Chemotherapeutika-Resistenz führen. Resistente Tumorzellen sind mit einer Veränderung der Hypermethylierung

assoziiert (Lund et al. 2017). Eine erfolgreiche Chemotherapie sollte jedoch zu einem Absterben von sich häufig teilenden Zellen wie Tumorzellen führen und somit eine Verringerung der zirkulierenden ctDNA-Ladung bewirken (Agostini et al. 2011). In dem Falle wäre auch die tumorspezifische DNA-Methylierung der ctDNA nicht mehr zu detektieren; beim Brustkrebs kann z.B. das Verschwinden der RASSF1A-Methylierung aus Serumproben als Indikator für die Wirkung der Chemotherapie angewendet werden (Fiegl et al. 2005). Darüber hinaus weisen Untersuchungen von primären *high-grade* serösen OvCa und Rezidiven auf Unterschiede der Methylierungsmuster zwischen den beiden Gruppen hin (Reyes et al. 2019).

Eine Chemotherapie kann demnach eine direkte Wirkung auf DNA-Methylierung haben und auch das Auftreten von methylierter ctDNA in Körperflüssigkeiten wie Serum beeinflussen, jedoch ist die genaue Richtung der Methylierungsveränderung oder der Methylierungsdetektion nicht eindeutig vorhersehbar. Zur Fragestellung, ob eine Chemotherapie vor der Probenentnahme zu einem signifikanten Unterschied in den Methylierungsergebnissen dieser Arbeit führen würde, wurden die OvCa-Proben in zwei Gruppen geteilt: 56 der 74 Proben wurden vor der Probenentnahme keiner Chemotherapie ausgesetzt und 18 Proben schon. Diese 18 Proben wurden erneut in zwei teilweise überlappende Gruppen geteilt – zehn Proben hatten eine neoadjuvante Chemotherapie und zehn Proben waren OvCa-Rezidive mit vorausgegangener Chemotherapie des Ersttumors. Die Gruppe der 18 Proben mit vorausgegangener Chemotherapie sowie die nochmals unterteilten Gruppen wurden jeweils mit den 56 Proben ohne Chemotherapie vor Probenentnahme verglichen. Es wurde in keinem Vergleich und mit keinem der sechs Methylierungsmarker ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil an methylierter Proben sowie dem Grad der relativen Methylierung und dem Vorkommen einer Chemotherapie vor Probenentnahme gefunden (durchgehend $p > 0,05$).

Im Folgenden wurden die wesentlichsten Ergebnisse von den Untersuchungen der potenziellen Einflussfaktoren in Tab. 13 (S. 70) zusammengefasst und übersichtlich dargestellt. Es soll auf einen Blick erkennbar sein, bei welchen MSP-Primerpaaren ein signifikanter Unterschied der relativen Methylierung zwischen den Untergruppen der verschiedenen untersuchten Einflussfaktoren gefunden wurde.

Tab. 13: Übersicht der Mann-Whitney-U-Test-Ergebnisse von den untersuchten Einflussfaktoren

Es wird hier eine Übersicht der Ergebnisse des Abschnittes 4.6. (S. 65) dargestellt, worin zusammengefasst wird, bei welchen der sechs MSP-Primerpaare sich laut Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied der relativen Methylierung zwischen den Untergruppen der untersuchten Einflussfaktoren (Patientinnenalter, FIGO-Stadium, histologischer Subtyp und Z.n. Chemotherapie) fand. Ein „+“ weist auf einen signifikanten Unterschied für das MSP-Primerpaar hin, und bei einem signifikanten Ergebnis wurde ebenfalls der p-Wert angegeben. Ein „-“ weist darauf hin, dass für das MSP-Primerpaar kein signifikanter Unterschied gefunden wurde ($p > 0,05$).

Einflussfaktor	Signifikanter Unterschied der relativen Methylierung laut Mann-Whitney-U-Test					
	NKX6-1	NKX2-8	NR2F2	PRR15	SPAG6	SV2C
Patientinnenalter	+	-	-	-	-	-
	(p=0,009)					
FIGO-Stadium	-	+	-	+	+	+
		(p=0,038)		(p=0,011)	(p=0,048 bzw. 0,046)	(p=0,023)
Histologischer Subtyp	-	+	-	-	-	+
		(p=0,038)				(p=0,029)
Z.n. Chemotherapie	-	-	-	-	-	-

4.7. Vergleich der Methylierungsmarker mit Zytologie

Die Peritonealzytologie ist ein wichtiger Operationsschritt für ein optimales Staging eines OvCa und die Ergebnisse der Zytologie beeinflussen die TNM-Klassifikation des Tumors (Tab. 1, S. 7) sowie die Therapieplanung und Prognose (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Eine auffällige Zytologie mit Tumorzellen in der Peritonealflüssigkeit weist auf eine Tumorbeteiligung der Ovaroberfläche und eine peritoneale Disseminierung des Tumors hin (Naz et al. 2015). Die Zellen für die Zytologie werden ebenso wie die isolierte DNA für die Methylierungsuntersuchungen von der Bauchraumspülflüssigkeit entnommen, welche intraoperativ oder auch minimal-invasiv gewonnen werden kann. Somit stellt die Spülzytologie eine alternative oder zusätzliche Untersuchung der Bauchraumspülflüssigkeit zur DNA-Methylierungsuntersuchung dar, die Aufschluss über das Vorliegen eines OvCa geben kann.

Für 122 (23 x benigne Erk., 28 x maligne Erk., 11 x Borderline-Tumor, 60 x OvCa) der insg. 181 untersuchten Proben lagen die Zytologie-Ergebnisse vor. Es gab fünf mögliche Zytologie-Gruppen: Gruppe I (unverdächtig), II (reaktiv), III (suspekt), IV (tumorverdächtig) und V (Tumorzellen). Diese wurden zur Bewertung der Proben in drei Kategorien aufgeteilt: Gruppen I und II galten als negative, nicht-pathologische Zytologie, Gruppe III galt als unklar, und Gruppen IV und V als positive, pathologische und maligne-verdächtige Zytologie. In der Gruppe der OvCa hatten 38 der 60 Proben (63,3%) eine positive Zytologie. Dafür hatten 20 der 23 benignen Proben (87,0%) eine negative Zytologie und nur 1 Probe (4,3%) hatte eine positive Zytologie. Der Exakte Test nach Fischer ergab einen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p=0,000$) der Zytologie-Ergebnisse und der Diagnose der Proben als benigne Erkrankung und OvCa.

Die Differenzierung der Proben als positiv (erkrankt, in diesem Falle OvCa) und negativ (nicht erkrankt, benigne) anhand der Zytologie und anhand der Methylierungsmarker wurde mit dem McNemar-Test verglichen. Dieser prüft, ob die Häufigkeiten eines dichotomen Merkmals (benigne/OvCa) bei zwei abhängigen Stichproben (Zytologie vs. Methylierungsmarker) signifikant unterschiedlich sind. Dies wurde jeweils an den benignen Proben und den OvCa für jeden der sechs Marker angewendet. Bei den benignen Proben gab es nur bei NR2F2 einen statistisch signifikanten ($p=0,039$) Unterschied zwischen dem Methylierungsmarker und der Zytologie; bei den anderen fünf Markern gab es keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). In der Gruppe der OvCa zeigten zwei der sechs Marker einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Methylierungsmarker und Zytologie: NKX6-1 mit $p=0,005$ und SPAG6 mit $p=0,029$. Bei der Mehrzahl der Fälle gab es demnach aber keinen signifikanten Unterschied zwischen der Probenbewertung anhand der Zytologie und der Methylierung. In den drei Fällen, bei denen der McNemar-Test ein signifikantes Ergebnis hatte, war die Zytologie den Methylierungsmarkern überlegen, d.h. anhand der zytologischen Ergebnisse wurden mehr Proben richtig als positiv/negativ eingestuft als anhand der Methylierungsergebnisse.

Da die Zytologie bei einem relativ hohen Anteil von OvCa-Proben positiv ist und sogar mehr Proben korrekterweise als maligne einstuft als die Methylierungsmarker NKX6-1 und SPAG, wurde überlegt, die Zytologie als zusätzlichen diagnostischen Marker heranzuziehen. Um eine möglichst hohe SEN zu erreichen, wurden die Proben des Validierungssets, bei denen die Zytologie vorlag ($n=78$, 13 x benigne Erk., 8 x maligne Erk., 10 x Borderline-Tumore, 47 x OvCa), mit Dreifach-„Oder“-Kombination bewertet. Zu den vier besten ROC-Schwellenwert-Markerkombinationen wurde noch die Zytologie hinzugefügt. Eine Probe galt demnach als positiv bzw. erkrankt, wenn die relative Methylierung den Schwellenwert von einem der beiden Marker in der Kombination überschritten hat, oder wenn die Zytologie positiv (Gruppe IV oder V) war. Schließlich wurden diese Kombinationen nochmals an den Borderline-Tumor-Proben angewendet ($n=11$). Borderline-Tumoren stellen Vorläuferläsionen für gut differenzierte OvCa dar und zeichnen sich durch ein niedriges Malignitätspotenzial sowie einer guten Prognose aus (Meinhold-Heerlein und Hauptmann 2014, Rojas et al. 2016). Bei einem Borderline-Tumor wird laut Leitlinie ebenso ein chirurgisches Staging mit kompletter Tumoresektion empfohlen, sodass eine Detektion der Borderline-Tumoren durch die Methylierungsmarker sinnvoll wäre (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Abb. 16 (S. 72) stellt die ausgerechnete SPE/SEN anhand der Kombination von zwei Markern und dem Zytologie-Ergebnis dar. Es werden zwei verschiedene SEN aufgeführt, einmal bezogen auf die Detektion der OvCa und einmal bezogen auf die Detektion der Borderline-Tumoren.

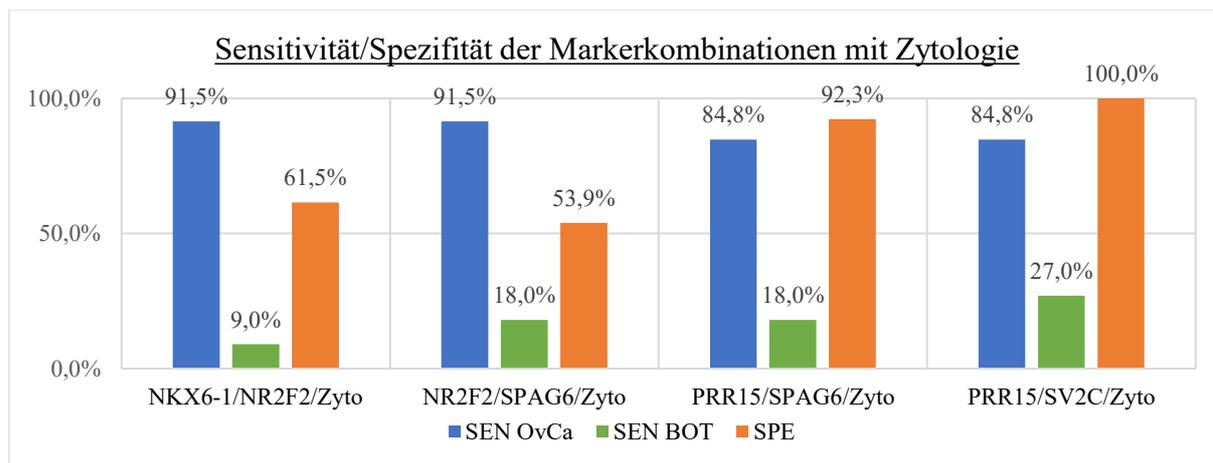


Abb. 16: Sensitivität und Spezifität der Markerkombinationen mit Zytologie

Das Diagramm zeigt die SEN/SPE der Dreifach-, „Oder“-Kombinationen, bei denen das Zytologie-Ergebnis („Zyto“) noch zu den relativen Methylierungs-Kombinationen hinzugezogen wurde. Bei der Kombination „NKX6-1/NR2F2/Zyto“ z.B., galt eine Probe als positiv/erkrankt, wenn die relative Methylierung mit einer der zwei Marker den jeweiligen Schwellenwert überschritten hat, oder wenn die Zytologie auffällig war. Es werden hier die SEN bezogen auf die Detektion der OvCa-Proben („SEN OvCa“) sowie bezogen auf die Detektion der Borderline-Tumoren („SEN BOT.“) gezeigt. Die SEN bezieht sich auf den Anteil richtig positiv erkannter OvCa- bzw. Borderline-Tumor-Proben, die SPE dafür auf den Anteil der richtig negativ erkannten benignen Proben.

Es fällt eine sehr niedrige SEN BOT von höchstens 27,0% auf, sodass die Methylierungsmarker und die Zytologie vermutlich nicht zur Detektion von Borderline-Tumoren geeignet sind. Bei den ersten beiden Kombinationen (NKX6-1/NR2F2/Zyto und NR2F2/SPAG6/Zyto) ergab sich eine sehr hohe SEN OvCa (beide 91,5%), dafür ist die SPE verglichen mit der Zweifach-Kombination der Methylierungsmarker (Abb. 13, S. 59) etwas niedriger. Bei den Kombinationen PRR15/SPAG6/Zyto und PRR15/SV2C/Zyto finden sich gleichzeitig eine hohe SEN OvCa (beide 84,8%) und SPE (92,3% bzw. 100,0%), welches die Ergebnisse aller anderen bisherigen einzelnen Marker und Markerkombinationen übertrifft. Aufgrund der unterschiedlichen Probenanzahl verglichen mit den bisherigen Markerkombinationen (ohne Zytologie) sind diese Ergebnisse nicht absolut vergleichbar – dennoch fand sich durch die Hinzunahme der zytologischen Diagnostik eine deutliche Zunahme der SEN. Wurden die ROC-Schwellenwert-Markerkombinationen, die in Abb. 13 (S. 59) dargestellt wurden, bei dem in diesem Abschnitt betrachteten Probenstet (n=78) angewendet, fanden sich deutliche niedrigere SEN. Bei den Kombinationen NKX6-1/NR2F2 und NR2F2/SPAG6 führte die Hinzunahme der zytologischen Diagnostik zu einer 21,3%igen Zunahme der SEN, bei PRR15/SPAG6 und PRR15/SV2C betrug die SEN-Zunahme 33,7% bzw. 27,0%. Die SPE blieb durch die Hinzunahme der zytologischen Diagnostik unverändert. Somit hat die Kombination PRR15/SV2C/Zyto die höchste diagnostische SEN und SPE und zeigt sich als am besten geeignet für die Differenzierung von benignen Erk. und OvCa anhand von Bauchraumspülflüssigkeiten.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Testung von DNA-Methylierungsmarkern für die Differenzierung von OvCa und benignen Erkrankungen anhand von cfDNA aus Bauchraumspülflüssigkeiten. Es wurden Kandidatengene für die Detektion von hypermethylierten CpG-Inseln in OvCa ausgewählt und anhand methylierungsspezifischer qPCR-Analysen etabliert. Um eine Differenzierung von benignen Erkrankungen und OvCa-Proben mit möglichst hoher SEN und SPE zu ermöglichen, wurden qMSP-Analysen mit den etablierten Kandidatengenen und cfDNA-Proben aus Bauchraumspülflüssigkeiten durchgeführt. Zur Maximierung der SEN und SPE wurden die relative Quantifizierung der Methylierung in Betracht gezogen und die Methylierungsmarker verschieden kombiniert. Des Weiteren wurden OvCa-Gewebeproben von PT und Absiedlungen mit Hinsicht auf den Methylierungsstatus der Methylierungsmarker analysiert, um Aufschluss über intratumorale Heterogenität zu geben. Der Methylierungsstatus der OvCa-Proben wurde ebenso auf den Einfluss von Faktoren wie dem Alter und dem FIGO-Stadium untersucht, um Information über eventuelle Einflussfaktoren der DNA-Methylierung zu erlangen. Schließlich wurde die Spülzytologie als alternative sowie zusätzliche diagnostische Methode für die Untersuchung von Bauchraumspülflüssigkeiten mit den Methylierungsmarkern verglichen und bewertet.

5.1. Präanalytik und Bisulfit-Behandlung

5.1.1. Präanalytik

Bei den untersuchten Proben handelte es sich um intraoperative Proben (Bauchraumflüssigkeiten, Gewebeproben) von Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Fortpflanzungsmedizin des Universitätsklinikums Jena aus den Jahren 2010 – 2018. Die Proben wurden vor Ankunft in der „Gynäkologischen Molekularbiologie“ des Universitätsklinikums Jena zentrifugiert und dann bei -30°C (Bauchraumflüssigkeiten) oder -80°C (Gewebeproben) gelagert. Da die Proben jedoch von verschiedenen Operationen bei verschiedenen Erkrankungen stammen, gab es kein eindeutiges SOP (vom engl. *Standard Operating Procedure*) bezüglich der Probenlagerdauer im OP-Saal. Es ist möglich, dass die Proben v.a. bei Tumorstaging-Operationen, welche mehrere Stunden dauern können, länger im OP-Saal verweilten als bei Eingriffen für benigne Erkrankungen. Es ist unklar, inwiefern dies einen Effekt auf die Qualität der Proben gehabt haben könnte, idealerweise sollte das Vorgehen der Probenentnahme und -lagerung jedoch standardisiert werden.

Da die hier untersuchten Proben auch im Rahmen unterschiedlicher Operationen entnommen wurden, ist es möglich, dass unterschiedliche chirurgische Methoden je nach Menge und Größe der Operationswunden und Gewebeentfernung die Menge an cfDNA beeinflusst haben. In einer Studie von *Shao et al.* zeigten cfDNA-Messungen im Blut einen signifikanten Anstieg der cfDNA-Konzentration am ersten postoperativen Tag, vermutlich wegen einer Zell- und cfDNA-Freisetzung bedingt durch das chirurgische Trauma (Shao et al. 2015). Eine Entnahme von Bauchraumflüssigkeit im Rahmen einer minimal-invasiven Punktion könnte diesen potenziellen Einflussfaktor vermeiden.

5.1.2. Bisulfit-Behandlung

Die Bisulfit-Behandlung führt durch die Umstände der Konvertierung mit Bisulfit zu einer Degradierung und Fragmentierung der DNA, sodass ein Verlust der DNA-Konzentration in den cfDNA-Proben stattfand. Die Degradierung findet in höheren Maßen bei höheren Konvertierungstemperaturen und längeren Inkubationszeiten statt, lässt sich aber auch nicht komplett durch Reduktion dieser Umstände vermeiden, da die Konvertierung bei einer zu niedrigen Temperatur oder zu kurzen Inkubationszeit inkomplett ablaufen könnte und zu einer Überschätzung der DNA-Methylierung führen könnte (Grunau et al. 2001, Kint et al. 2018). Obwohl das in dieser Arbeit benutzte kommerzielle EZ DNA Methylation-Gold™ Kit im Vergleich mit elf anderen kommerziellen Kits die höchste Ausbeute von DNA (88,3%) und eine Konvertierungseffizienz von $99,7\% \pm 0,1$ hatte, ist von einem gewissen Maß an DNA-Verlust auszugehen (Kint et al. 2018). Trotzdem ist die Bisulfit-Behandlung nach wie vor der Goldstandard zur DNA-Behandlung für die Analyse der CpG-Insel-Methylierung. Eine Behandlung der DNA mit einem methylierungs-abhängigen oder -sensitiven Restriktionsenzym (MDRE bzw. MSRE) mit nachfolgender qPCR wäre eine alternative Methode zur Methylierungsanalyse, welche die DNA nicht degradiert, jedoch andere Nachteile hat, z.B. dass das Enzym bestimmte Sequenzen der Target-CpG-Inseln nicht spalten kann (Redshaw et al. 2014, Oishi et al. 2017). Eine neue Studie von *Suehiro et al.* benutzt für Methylierungsanalysen bei kolorektalen Neoplasien einen sog. *CORD-Assay* (vom engl. *combined restriction digital PCR*), bei dem die Bisulfit-Behandlung umgangen wird. Dieser *Assay* soll auch eine einzelne methylierte Genkopie in kleinen DNA-Mengen erkennen können und könnte evtl. den Einsatz kleinerer Probenvolumina sowie eine höhere analytische SEN bei der Methylierungsanalyse ermöglichen (Cheung et al. 2018, Suehiro et al. 2018).

5.2. Kandidatensuche

Die Kandidatensuche für relevante hypermethylierte Gene basierte auf den Vergleich von drei unabhängigen genomweiten *Microarray*-Analysen. Es handelte sich hierbei um interne Methylierungs-*Microarray*-Analysen der Arbeitsgruppe der „Gynäkologischen Molekularbiologie“ des Universitätsklinikums Jena (UKJ), sowie um zwei weitere internationale Studien aus Kanada und Israel (Michaelson-Cohen et al. 2011, Keita et al. 2013). In diesen drei Studien wurden mehrere hundert Gene mit CpG-Insel-Hypermethylierung bei OvCa-Patientinnen identifiziert, mit einer Überschneidung der jeweiligen Ergebnisse von 30 Kandidatengen. Diese 30 Gene dienten dieser Arbeit als Grundlage für die Auswahl von zehn Kandidatengen für die Etablierung von Methylierungsmarkern. Es wurde darauf geachtet, dass der Aufbau und die Methodik der drei Studien möglichst ähnlich waren. Während die Arbeiten von der Arbeitsgruppe der „Gynäkologischen Molekularbiologie“ des UKJ und von *Michaelson-Cohen et al.* die genaue Sequenzinformation der hypermethylierten Genregionen nannten, wurden in der Studie von *Keita et al.* nur die Namen der Genregionen genannt. Dies erschwerte das Design der MSP-Primerpaare, da in manchen Genen mehrere CpG-Inseln in Frage kommen könnten. Es wurden hier vor allem die Sequenzinformationen der ersten beiden genannten *Microarray*-Analysen in Betracht gezogen. Da bei POU3F3 zwei Sequenzen plausibel in Fragen kamen, wurden zwei verschiedene POU3F3-MSP-Primerpaare getestet. Darüber hinaus ist es möglich, dass Unterschiede in den Ergebnissen der Studien zumindest teilweise aufgrund von populationsbedingten variierenden Methylierungsunterschieden zustande kamen. Die Studien wurden mit Probandinnen von geographisch und ethnologisch unterschiedlichen Hintergründen durchgeführt, sodass Polymorphismen evtl. eine Auswirkung auf den Methylierungsstatus hatten und populationsspezifische hypermethylierte Regionen bedingten (Kader und Ghai 2017). Dies wäre eine potenzielle Fehlerquelle bei der gemeinsamen Bewertung der drei Studien und der Auswahl der Kandidatengene, da populationsspezifische hypermethylierte CpG-Inseln durch das Venn-Diagramm ausgeschlossen wurden.

In dem Venn-Diagramm blieben 30 Kandidatengene übrig, welche in allen drei Studien als hypermethyliert beim OvCa beschrieben wurden. Anhand wissenschaftlicher Datenbanken wurde sodann untersucht ob die Kandidatengene bereits im Zusammenhang mit CpG-Insel-Hypermethylierung oder gynäkologischen sowie anderen Tumoren beschrieben wurden. Die Auswahl der Kandidatengene wurde weiter auf zehn Gene eingeschränkt und von diesen Genen wurde nur für TBX15 schon einmal Promotormethylierung mit einhergehender herunterregulierter Genexpression im OvCa beschrieben (Gozzi et al. 2016). Bei den meisten Kandidatengen, die in dieser Arbeit genauer untersucht wurden, konnte kein eindeutiger Zusammenhang mit Hypermethylierung beim OvCa oder bei anderen gynäkologischen Tumoren in Publikationen

gefunden werden (Anhang Tab. I, S. I). Dies liegt vermutlich daran, dass die meisten Publikationen sich auf Gene konzentrieren, die bekannterweise eine Rolle in Wachstum, Differenzierung und Tumorprogression/-suppression spielen, so wie z.B. TBX15 bei der mesodermalen Differenzierung von Bedeutung ist (Gozzi et al. 2016). Nur einzelne Studien deuten auf Zusammenhänge hin, z.B. soll NKX6-1 die epithelial-mesenchymale Transition im Rahmen der Karzinommetastasierung unterdrücken und wird durch Hypermethylierung herunterreguliert (Li et al. 2016). Des Weiteren soll die Deletion von NKX2-8 eine Rolle in der Chemoresistenz beim epithelialen OvCa spielen (Zhu et al. 2019). Bei den anderen Genen, vor allem denen mit den besten Ergebnissen in dieser Arbeit (PRR15, SPAG6, SV2C), gibt es noch keine eindeutigen, kausalen Zusammenhänge mit der Tumorentstehung/-progression. Ein Vorteil der genomweiten *Microarray*-Analysen, welche die Grundlage dieser Arbeit bildeten, ist demnach, dass auch hypermethylierte Gene, bei denen zuvor noch kein kausaler Zusammenhang zwischen Genfunktion und malignen Erkrankungen bekannt ist, untersucht und erkannt werden konnten.

5.3. Etablierung der MSP-Primerpaare und qMSP

Zur Etablierung der MSP-Primerpaare wurden nach Auswahl der zehn Kandidatengene methylierungsspezifische Primerpaare hergestellt und mit Positiv- und Negativkontrollproben mittels qMSP getestet. Dies hatte den Zweck, die optimalen qMSP-Bedingungen für die einzelnen MSP-Primerpaare zu bestimmen und dadurch eine möglichst hohe analytische SEN zu gewährleisten. Ein häufiges Problem bei qMSP-Analysen, vor allem unter suboptimalen Bedingungen, ist das Auftreten und die Amplifikation von unspezifischen Produkten und Primerdimeren, welches zu falsch-positiven Signalen führen kann und gleichzeitig die PCR-Effizienz durch Verbrauch der verfügbaren Primer im Reaktionsansatz herabsetzt. Der wichtigste Schritt in der Etablierung, um die Formation von Primerdimeren zu verhindern, ist das Design der Primerpaare – in dieser Arbeit wurde mit dem Programm *Methyl Primer Express* von Applied Biosystems gearbeitet und es wurden mehrere Kriterien, z.B. die Primerlänge, berücksichtigt (siehe 3.2.4.2. Design methylierungsspezifischer Primerpaare, S. 35). Die Umsetzung aller Kriterien war jedoch bei den vorgegebenen Targetregionen der *Microarray*-Analysen und der unterschiedlichen Verteilung der CpG-Dinukleotide in den Gensequenzen nicht bei allen MSP-Primerpaaren möglich. Deswegen wurden die Primerpaare im nächsten Schritt bei verschiedenen *Annealing*-Temperaturen getestet und es wurde eine T_A mit möglichst geringer Primerdimerbildung gewählt (siehe 4.1. Etablierung und Auswahl der qMSP-Primerpaare, S. 42). Bei der ausgewählten T_A wurden die MSP-Primerpaare dann mit Proben von dem Etablierungsprobenset getestet; auch hier kam es teilweise zur Amplifikation von unspezifischen Produkten. Ursachen hierfür könnten individuelle Polymorphismen der Probandinnen in der Targetregion sowie

variierende Methylierungsmuster der DNA in einzelnen Proben sein. Eine starke Herabsetzung der PCR-Effizienz durch die Amplifikation unspezifischer Produkte wäre problematisch, weswegen fünf der elf MSP-Primerpaare mit beständiger, erheblicher Bildung von unspezifischen Produkten bei der Etablierung von weiteren Versuchen in dieser Arbeit ausgeschlossen wurden. Bei mäßigem Auftreten von unspezifischen Produkten ließen sich diese in den Ergebnissen auch nach der qMSP-Analyse von den spezifischen Produkten trennen – in dieser Arbeit wurde für diese Fälle die Agarose-Gelelektrophorese angewendet, welches die Produkte anhand ihrer Größe auftrennte und eine Differenzierung zwischen unspezifischen und spezifischen Produkten ermöglichte. Auch eine Sequenzierung der PCR-Produkte und damit eine genauere Spezifikation der Nebenprodukte wäre möglich aber deutlich aufwändiger und für das Ziel dieser Arbeit nicht notwendig.

Die Fragmentlänge des Amplikons spielt in der ctDNA-Quantifizierung ebenso eine Rolle; in einer Studie von *Mouliere et al.* erwies sich eine Amplikonlänge von 60 – 100 bp als optimal für die Messung von ctDNA-Konzentrationen mit qPCR. Beim Einsatz von Primern mit Amplikonlängen deutlich > 100 bp nahm die gemessene ctDNA-Konzentration ab. Dies liegt daran, dass tumorspezifische cfDNA (ctDNA) stärker fragmentiert als „physiologische“ cfDNA auftritt und vor allem in fortgeschrittenen Tumorerkrankungen kurze ctDNA-Fragmente von < 100 bp auftreten (Mouliere et al. 2011, Mouliere und Rosenfeld 2015). Es werden auch ctDNA-Fragmente > 100 bp beschrieben, welche aber dennoch ca. 20 – 50 bp kürzer als physiologische cfDNA-Fragmente sind und meist eine Länge < 150 bp haben (Underhill et al. 2016). Die hier gewählten Primerpaare hatten alle eine Produktgröße zwischen 104 bp (NR2F2) und 139 bp (SV2C), das β -Aktin-Primerpaar hatte eine Produktgröße von 133 bp (siehe Tab. 5, S. 29). Somit war die Amplikonlänge in dieser Arbeit ungefähr zwischen 100 – 140 bp, welches geringfügig über der optimalen Amplikonlänge für die ctDNA-Quantifizierung liegt. Da hier jedoch nur eine relative Quantifizierung der ctDNA-Konzentration mit β -Aktin als Referenzgen erfolgte, war es vor allem wichtig, dass die Amplikonlängen ähnlich waren. Für eine relative Quantifizierung sollten die genannten Primerpaare geeignet gewesen sein, da Unterschiede in der ctDNA-Messung zwischen den einzelnen getesteten Primerpaaren und dem β -Aktin-Primerpaar nicht durch erhebliche Unterschiede der Amplikonlänge zustande gekommen sein sollten.

Es ist noch weitestgehend unbekannt, ab welchem Grad der CpG-Insel-Methylierung eine Veränderung der Genfunktion (z.B. Genstilllegung) stattfindet. Eventuell treten die Effekte der Methylierung schon bei Methylierung einiger, aber nicht aller CG-Dinukleotide einer CpG-Insel auf. Untersuchungen der CpG-Insel-Methylierung und Genexpression von *high-grade* serösen OvCa der Arbeitsgruppe *Reyes et al.* fanden, dass nur ca. ein Viertel der hypo- oder

hypermethylierten Gene (im Vergleich mit gesundem Tubengewebe) auch eine veränderte Genexpression aufwiesen (Reyes et al. 2019). Somit wäre in zukünftigen Untersuchungen der ausgewählten Methylierungsmarker nicht nur die Messung der Methylierung, sondern auch der entsprechenden Genexpression, sinnvoll. Des Weiteren ist es unklar, inwiefern die getesteten Primerpaare auch nur teilweise methylierte Targets amplifizieren können. Dies ist ein Faktor, der die SPE der Methylierungsmarker einschränken könnte.

5.4. Reproduzierbarkeitstestung und qMSP-Analyse

Die sechs ausgewählten Kandidatengene (NKX6-1, NKX2-8, NR2F2, PRR15, SPAG6 und SV2C) wurden nach Etablierung an größeren Probensets mittels qMSP getestet. Hiermit sollte die klinische SEN und SPE der OvCa-Detektion anhand cfDNA aus Bauchraumspülflüssigkeiten ermittelt werden. Ziel war es, mit den Methylierungsmarkern anhand vom Methylierungsstatus der Proben signifikant zwischen OvCa und benignen Erkrankungen differenzieren zu können. Um über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die analytische SEN der qMSP-Analyse Aufschluss zu geben, wurde mit einer Verdünnungsreihe von vollständig *in vitro* methylierter DNA die Intra- und Inter-*Assay*-Variabilität getestet. Es zeigte sich eine durchschnittliche Intra-*Assay*-Variabilität von 25,1%, wobei einige CV-Werte der einzelnen Marker in der Verdünnungsreihe auch deutlich niedriger oder höher waren. Die durchschnittliche Inter-*Assay*-Variabilität bewegte sich in einem ähnlichen Bereich mit 19,0% (NKX2-8) bzw. 27,3% (PRR15). Die Ergebnisse der Proben mit 1 – 100%iger methylierter DNA ließen sich zu 100% reproduzieren und es war mit der Ausnahme von NKX2-8 eine signifikante Unterscheidung dieser Verdünnungen (1 – 100%) anhand der qMSP-Analyse möglich. Bei der Probe mit 0,1%iger Methylierung konnte das Ergebnis nicht mehr zu 100% reproduziert werden, da die Probe in einigen Fällen gar nicht detektiert wurde. Hier zeigte sich scheinbar die Nachweisgrenze der qMSP, allerdings liegt dies vermutlich mehr an der absoluten Menge an eingesetzter cfDNA als an der prozentualen Methylierung. In einem qMSP-Reaktionsansatz wurde 1 µl BS-DNA eingesetzt, dies entspricht ca. 5 ng DNA und einer Kopienzahl von ca. 1000. Bei 0,1%iger Methylierung der DNA entspricht dies einer methylierten Kopie, die durch die qMSP detektiert werden muss. Vor dem Hintergrund der dann vorliegenden Poisson-Verteilung erscheint eine mittlere Detektionsrate von 37% für 0,1%ige Methylierung über alle Marker durchaus als akzeptabel. Eine der größten Schwierigkeiten bei der Analyse von ctDNA ist, dass i.d.R. der Anteil von ctDNA in der gesamten cfDNA unbekannt ist und zwischen Individuen stark schwankt, auch zwischen Patientinnen mit ähnlich fortgeschrittenen OvCa (Mathieu et al. 2018). Meistens bildet die ctDNA in einer Probe von cfDNA jedoch nur einen sehr geringen Anteil aus, weshalb die Methode zur Detektion und Quantifizierung eine möglichst hohe analytische SEN erfordert

(Cheung et al. 2018, Vymetalkova et al. 2018). Vor allem in frühen Krankheitsstadien wird eine geringere Konzentration an ctDNA vermutet, welche unter der Nachweisgrenze von Analysemethoden wie qMSP liegen könnte (Cohen et al. 2018). Beim Einsatz größerer absoluter DNA-Mengen wäre möglicherweise auch bei 0,1%iger Methylierung der Probe eine höhere analytische SEN gegeben. In späteren Arbeiten zur Validierung der Marker bzw. in einer späteren klinischen Anwendung ließe sich die Anwendung größerer cfDNA-Mengen besser realisieren, wenn weniger Marker getestet werden müssten und das Probenvolumen dadurch weniger begrenzt wäre.

Aufgrund der Ergebnisse der Reproduzierbarkeitstestung wurde entschlossen, die Methylierung der klinischen Proben in dieser Arbeit mit einmaligen qMSP-Messungen zu testen, da die Reproduzierbarkeit als ausreichend eingestuft wurde und eine Wiederholung jeder Messung mit einem hohen zeitlichen sowie finanziellen Aufwand verbunden wäre. Es wurde eine Messung in einem Ausnahmefall wiederholt, da aufgrund der qMSP-Ergebnisse eine Verunreinigung des PCR-Reaktionsansatzes vermutet wurde.

Eine alternative Analysemethode zur qMSP (*Real-time-PCR* basiert) wäre die digitale MSP (dMSP), bei der eine absolute Quantifizierung der methylierten Kopien durch Amplifikation vereinzelter DNA-Moleküle möglich ist. Generell konnten mit der digitalen PCR (dPCR), verglichen mit der qPCR, in einigen Studien eine höhere analytische SEN und geringere CV erreicht werden (Yu et al. 2015, Carow et al. 2017). Weil mit der dPCR auch ein sehr geringer Grad der Methylierung erkannt werden kann, wäre diese Methode für eine Früherkennung von malignen Geschehnissen möglicherweise überlegen.

5.5. MSP-Primerpaare als Methylierungsmarker zur Differenzierung von Ovarialkarzinomen und benignen Erkrankungen anhand von cfDNA

5.5.1. Sensitivität und Spezifität der Methylierungsmarker

Die sechs MSP-Primerpaare NKX6-1, NKX2-8, NR2F2, PRR15, SPAG6 und SV2C wurden mittels qMSP als Methylierungsmarker an einem Etablierungs- und Validierungsset getestet, um eine möglichst hohe diagnostische SEN und SPE zu erzielen. Damit Patientinnen mit OvCa von der Methylierungsanalyse der cfDNA profitieren können, indem sie bei einem positiven Testergebnis evtl. an ein Schwerpunktzentrum empfohlen werden und eine leitliniengerechte Therapie mit besserer Prognose erhalten können, muss die SEN der Methylierungsmarker möglichst hoch sein. Gleichzeitig sollen Patientinnen mit einer benignen Erkrankung nicht der unnötigen Therapie und der psychischen Belastung einer falsch-positiven Diagnose ausgesetzt werden, weswegen ebenso nicht auf eine hohe SPE verzichtet werden kann.

Es wurden mehrere Methoden der Probenbewertung beurteilt, indem die Methylierungsmarker kombiniert wurden und/oder eine relative Quantifizierung der Methylierung miteinbezogen wurde. Im ersten Schritt wurde eine binäre Einteilung der Proben als „methyliert“ oder „nicht-methyliert“ anhand der qMSP-Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Von den einzelnen Markern im Etablierungsset erwiesen sich PRR15 (SEN 83,3%, SPE 77,3%) und SV2C (SEN 72,2%, SPE 77,3%) als am besten zur Differenzierung der OvCa von den benignen Proben geeignet, da sie gleichzeitig eine relativ hohe SEN und SPE aufwiesen (Abb. 7, S. 50). Im Validierungsset ließen sich diese Ergebnisse nicht bestätigen, die SPE stieg bei diesen zwei Markern stark an (94,9 – 97,4%), dafür lag die SEN für die OvCa-Proben unter 50%. (Abb. 9, S. 51) Die starke Abnahme der SEN von v.a. NKX6-1, PRR15, SPAG6 und SV2C im Validierungsset liegt vermutlich daran, dass die Marker an dem Etablierungsset optimiert wurden und aufgrund einer hohen SEN ausgewählt wurden. Zwischen den OvCa-Proben von Etablierungs- und Validierungsset fand sich keine signifikant unterschiedliche Verteilung von Patientinnenalter, FIGO-Stadium, histologischem Subtyp oder zytologischem Ergebnis, sodass diese Faktoren für die Unterschiede der SEN nicht ursächlich waren.

Auch bei Zweierkombinationen der Marker ergab sich keine Kombination, die im Etablierungs- sowie Validierungsset eine hohe SEN und SPE aufwies (Abb. 10, S. 54). Die Anwendung der Kombination zweier Marker trug im Vergleich zu den einzelnen Markern durchaus zu einer Verbesserung der SEN bei, dagegen nahm die SPE ab. In der Hoffnung, die SPE der Marker durch Ausschluss von leicht methylierten benignen Proben zu verbessern, wurden mittels einer ROC-Kurve Schwellenwerte der relativen Methylierung bestimmt (Abb. 12 und Tab. 12, S. 58). Durch auffallend niedrige Schwellenwerte (0,01 – 1,68%) kam es hier nur bei zwei von sechs Markern (NR2F2 und PRR15) im Etablierungsset zu einer Veränderung der SEN/SPE der einzelnen Marker. NR2F2 erfuhr eine Steigerung der SPE von ca. 9%, und PRR15 eine geringe Abnahme der SEN. Im Validierungsset wurde die SPE von vier aus sechs Markern verbessert (SPAG6, SV2C, NR2F2, PRR15), allerdings blieb die SEN niedrig oder verschlechterte sich. Die erneute Kombination zweier Marker mit den zugehörigen ROC-Schwellenwerten führte (Abb. 13, S. 59) ebenso hauptsächlich zu Verbesserungen der SPE, vor allem im Validierungsset – bei der Kombination NKX6-1/NR2F2 und NR2F2/SPAG6 führte die Anwendung der Schwellenwerte zu einer Steigerung der SPE um ca. 18% bzw. 20% verglichen mit der gleichen Kombination ohne die Schwellenwerte (Abb. 10, S. 54). Dennoch war die SEN der kombinierten Methylierungsmarker weiterhin eher schwankend oder niedrig. Die Schwellenwerte der relativen Methylierung nahmen aufgrund allgemein niedriger relativer Methylierung der Proben nur sehr niedrige Werte an. Trotz der im Vergleich mit den benignen Proben signifikant höheren relativen Methylierung der OvCa-Proben war die Spannungsbreite der relativen Methylierung vor allem in

der OvCa-Probengruppe sehr groß (Abb. 11, S. 55), welches die Festlegung eines höheren Schwellenwertes ohne Verschlechterung der SEN erschwerte. Aufgrund der hohen Mortalität des OvCa wird bei einem diagnostischen Test viel Wert auf die SEN gelegt, damit möglichst wenige OvCa übersehen werden. Demnach waren hier die Markerkombinationen NKX6-1/NR2F2 und NR2F2/SPAG6 (Abb. 13, S. 59) aufgrund der höheren SEN verglichen mit den anderen zwei Kombinationen zur Detektion von OvCa besser geeignet.

5.5.2. Kombination der Methylierungsmarker mit der Zytologie

In dem letzten Schritt der Arbeit wurden die vier besten Kombinationen der Methylierungsmarker mit der zytologischen Diagnostik kombiniert (Abschnitt 4.7., S. 70). Bei der zytologischen Diagnostik wird ebenso Spülflüssigkeit aus dem Bauchraum verwendet, sodass die Kombination dieser beiden Untersuchungsmethoden auch praktisch gut realisierbar wäre. Weiterhin hat die Spülzytologie eine hohe SPE und ein hoher Anteil von OvCa ist zytologisch auffällig (Zuna und Behrens 1996). Eine Studie von *Zuna und Behrens* fand bei einer Probengruppe von 112 OvCa-Patientinnen 109 positive Zytologien (80,4%) (Zuna und Behrens 1996). Das Auftreten eines positiven Zytologie-Ergebnisses ist abhängig von der Ausbreitung und Histologie des Tumors; seröse OvCa sind öfter zytologisch positiv als andere histologische Subtypen (Naz et al. 2015). Die hohe Rate an positiven Zytologien bei OvCa kommt vermutlich auch dadurch zustande, dass die Mehrzahl an OvCa zum Zeitpunkt der Diagnose und Staging schon fortgeschritten und peritoneal disseminiert sind.

Die Kombination von zwei Methylierungsmarkern (mit Anwendung der ROC-Schwellenwerte) und den Zytologie-Ergebnissen ergab zwei Kombinationen, welche gleichzeitig eine relativ hohe SEN und SPE aufwiesen (Abb. 16, S. 72). Die Kombinationen PRR15/SPAG/Zytologie und PRR15/SV2C/Zytologie wiesen beide eine SEN von 84,8% und eine SPE von 92,3% bzw. 100,0% auf. Der Zusatz der Zytologie zu der Bewertung der Proben führte offensichtlich vor allem zu einer Verbesserung der SEN durch die Detektion von zytologisch auffälligen OvCa, bei denen eine Hypermethylierung mit den genannten Methylierungsmarkern nicht detektiert wurde. Das Zytologie-Ergebnis lag jedoch nur bei einer begrenzten Anzahl von benignen Proben vor, sodass die Proben in diesem Abschnitt nicht in ein Etablierungs- und Validierungsset geteilt wurden. Zur Validierung der hohen SEN/SPE dieser Kombinationen müsste eine größere Probenanzahl getestet werden, und es müssten insbesondere mehr Kontrollproben zytologisch untersucht werden.

Eine Limitation der Kombination mit der zytologischen Diagnostik ist, dass bei Frühstadien des OvCa (FIGO IA – IB) per definitionem keine Tumorzellen in der Spülzytologie vorliegen und die Zytologie demnach nicht-maligne ist; beim Nachweis maligner Zellen in der Spülzytologie hat das OvCa zumindest ein FIGO-Stadium IC (siehe Tab. 1, S. 7). Bei Untersuchungen von *Zuna und*

Behrens stieg die SEN der Zytologie von 29,4% bei FIGO I OvCa zu 66,7% bei FIGO II und sogar 92,0% bei FIGO IV, allerdings wurde in den Ergebnissen nicht genauer zwischen FIGO IA/B und IC differenziert (Zuna und Behrens 1996). In dieser Arbeit waren 0% von FIGO IA – IB, 73% von FIGO IC – IIC und 76% von FIGO III – IV OvCa zytologisch auffällig. Im Vergleich wurden 55% der FIGO IA – IB und 36% der FIGO IC – IIC OvCa-Proben mit den Methylierungsmarker-Kombinationen PRR15/SPAG und PRR15/SV2C detektiert. Es wurden deutlich mehr der fortgeschrittenen FIGO III – IV OvCa (PRR15/SPAG6: 63% und PRR15/SV2C: 71%) detektiert. Bei Kombination der Marker und der Zytologie-Ergebnisse wurden schließlich 100% der FIGO IC – IIC und 92% der FIGO III – IV detektiert. Obwohl die zytologische Diagnostik hier nicht zu der Detektion von Frühstadien des OvCa beitragen konnte, führte es bei Kombination mit den Markern insgesamt und vor allem in den mittleren FIGO-Stadien (IC – IIC) zu einer Verbesserung der SEN.

Es geht aus dieser Arbeit hervor, dass von den sechs untersuchten Methylierungsmarkern ein einzelner Marker oder auch eine Zweifachkombination der Marker eine signifikante Differenzierung von OvCa und benignen Kontrollproben anhand cfDNA aus Peritonealflüssigkeit gewährleistet. Für ein diagnostisches OvCa-Screening ist die SEN/SPE nicht ausreichend hoch, allerdings wäre der Einsatz der Methylierungsmarker im Rahmen der Differentialdiagnostik von unklaren ovariellen Raumforderungen und anhand dessen eine adaptierte Therapieplanung denkbar. Eine Kombination mit weiteren Methylierungsmarkern oder zusätzlichen diagnostischen Biomarkern/Methoden, wie z.B. der Zytologie, könnte zusätzlich zu einer höheren SEN/SPE beitragen.

5.5.3. Relative Quantifizierung der cfDNA-Methylierung

Die qMSP ließ eine relative Quantifizierung der Methylierung der einzelnen cfDNA-Proben zu, welche durch Messungen mit β -Aktin als Referenzgen und das Mitführen einer vollständig *in vitro* methylierten Positivkontrolle ermöglicht wurde (siehe Abschnitt 3.2.4.5., S. 37). Es müssen hier jedoch einige Limitationen dieser Quantifizierungsmethode benannt werden. Bei dieser Berechnung der relativen Methylierung wurde angenommen, dass eine vollständige Verdopplung der *Template*-DNA in der Amplifikationsphase der qMSP stattfand (siehe Formel 1, Abschnitt 3.2.4.5., S. 38). Diese Annahme entspricht jedoch nur unter optimalen PCR-Bedingungen der Realität. Die PCR-Effizienz kann durch Temperaturbelastung der Polymerase, Bildung von unspezifischen Produkten sowie zunehmendem Verbrauch (und somit Konzentrationsminderung) der Reaktionsbestandteile sinken und eine 100%ige Verdopplung nicht garantieren. Dies kann die Ergebnisse der relativen Methylierung beeinflussen haben. Das Mitführen von einer Standardkurve einer Verdünnungsreihe könnte Aufschluss über die tatsächliche PCR-Effizienz geben (Svec et al.

2015). Die PCR-Effizienz wurde in dieser Arbeit im Rahmen der Reproduzierbarkeitsanalyse gemessen und schwankte zwischen 82% und 92%. Aufgrund dieser eher geringen Schwankungen wurde mit der oben genannten Formel der Verdopplung gerechnet.

Bei den Messungen mit dem Referenzgen β -Aktin fielen unterschiedliche Ct-Werte als relatives Maß der cfDNA-Konzentration auf, auch innerhalb der einzelnen Probengruppen. Dies lässt sich teilweise dadurch erklären, dass die Bisulfit-Behandlung zu unregelmäßigen DNA-Verlusten führt. Des Weiteren ist es möglich, dass eine erhöhte cfDNA-Konzentration neben der malignen Erkrankung im Vordergrund dieser Untersuchung auch durch Zellstress im Rahmen von proinflammatorischen Erkrankungen oder Traumata verursacht wurde (Kim et al. 2014).

Bei einigen Proben war mit dem β -Aktin-Gen kein Ct-Wert messbar, jedoch ergab die qMSP-Messung mit den Methylierungsmarkern ein positives, methyliertes Ergebnis. In diesem Falle wurde die Probe in Abschnitt 4.3. (S. 49) als „methyliert“ bewertet, aber von der relativen Quantifizierung ausgeschlossen. Bei anderen Proben wurde durch die Berechnung mit dem β -Aktin-Referenzgen eine relative Methylierung von über 100% berechnet. In diesen Fällen ist es möglich, dass die *in vitro* Methylierung der Positivkontrolle durch einen Fehler im Ansatz oder reduzierte Effizienz des Reaktionsenzym (CpG-Methyltransferase) unvollständig war (siehe Abschnitt 3.2.4.4., S. 36). Des Weiteren ist zu bedenken, dass vor allem bei geringen Mengen an cfDNA keine Gleichverteilung der genomischen Regionen gegeben ist, und dass eine vorherige Duplikation oder Amplifikation der Targetregion im (genomisch instabilen) Tumor möglich ist. Auch dies kann zu Berechnungen der relativen Methylierung von $> 100\%$ beigetragen haben.

5.5.4. Benigne Kontrollproben

Zwischen dem Etablierungs- und Validierungsset kam es teilweise zu deutlichen Unterschieden der SPE (Abb. 7, S. 50 und Abb. 9, S. 51). Bei den Markern PRR15 und SV2C gab es zwischen Etablierungs- und Validierungsset einen signifikanten Unterschied im Anteil der methylierten benignen Proben. Bei den Markern NKX2-8, PRR15, SPAG6 und SV2C fand sich ein signifikanter Unterschied der relativen Methylierung der benignen Proben. In allen Fällen war der Anteil methylierter Proben bzw. die relative Methylierung der benignen Kontrollproben im Etablierungsset höher, weswegen die SPE auch bei fünf von sechs Markern im Validierungsset höher war. Da die Kontrollgruppe „benigne Erkrankungen“ sich aus mehreren verschiedenen benignen Erkrankungen zusammensetzte und die Proben zufällig in Etablierungs- und Validierungsset geteilt wurden, wurde die Zusammensetzung nochmal genauer untersucht um etwaige Einflussgrößen für die Methylierungsrate zu identifizieren. Die benignen Proben bestanden aus den Gruppen „Endometriose“ (n=16), „Ovarialzysten“ (n=17), „Myome“ (n=12) und „Andere“ (n=16). Im Vergleich dieser verschiedenen Erkrankungen schien vor allem die

Gruppe der Myome eine höhere Methylierung aufzuweisen. Bei dem Marker NKX2-8 war der Anteil methylierter Myom-Proben sowie die relative Methylierung der Myom-Proben signifikant höher als bei den Endometriose-Proben, Ovarialzysten und Proben der Gruppe „Andere“. Zusätzlich fand sich auch mit PRR15 bei den Myomen ein signifikant höherer Anteil methylierter Proben und eine höhere relative Methylierung im Vergleich mit der Gruppe „Andere“. Die Zusammensetzung des Etablierungs- und Validierungssets unterschied sich in der Hinsicht, dass im Etablierungsset 14% der Proben Endometriose, 14% Ovarialzysten, 41% Myome und 32% „Andere“ waren. Im Validierungsset kamen deutlich mehr Endometriose-Proben (33%) und Ovarialzysten (36%) vor, dafür deutlich weniger Myome (8%) und auch weniger Proben der Gruppe „Andere“ (23%). Dies ist vermutlich einer der Gründe, warum die SPE im Etablierungsset generell niedriger als im Validierungsset war. In zukünftigen Untersuchungen sollte dies beachtet werden und die verschiedenen Untergruppen der Kontrollproben sollten mit ähnlicher Häufigkeit zwischen Etablierungs- und Validierungsset verteilt werden.

Myome sind gutartige Neubildungen des Myometriums und stellen die häufigste gutartige Tumorerkrankung der Gebärmutter bei Frauen im gebärfähigen Alter dar. Mit einer Inzidenz von 70 – 80% bei Frauen im Alter von 50 Jahren ist es eine der häufigsten Diagnosen bei sonographisch detektierten ovariellen Raumforderungen und somit eine wichtige Differentialdiagnose für das OvCa (Vlahos et al. 2017). Es wurde schon in einigen Studien eine DNA-Hypermethylierung bei Myomen beschrieben. *Huang et al.* untersuchten Zervix-Abstriche von Probandinnen mit Endometrium-Ca und Uterusmyomen sowie von gesunden Probandinnen auf die Hypermethylierung von vier Genen (BHLHE22, CDO1, CELF4, ZNF662). Obwohl die Endometrium-Ca deutlich häufiger eine Methylierung aufwiesen, zeigten auch einige Myom-Proben eine Methylierung dieser Gene (*Huang et al.* 2017). Untersuchungen zur DAPK-Hypermethylierung von *Hafner et al.* fanden nicht nur eine Hypermethylierung in 56% bzw. 50% von Serum- und Gewebeproben von OvCa-Patientinnen, sondern auch in 24% bzw. 35% von Serum- und Gewebeproben von Myom-Patientinnen (*Hafner et al.* 2011). Genomweite Methylierungs-*Microarray*-Analysen wiesen eine aberrante Methylierung von vielen verschiedenen Genen, wie z.B. auch Tumorsuppressorgenen, nach, welche zum Teil die Pathogenese der benignen Tumoren erklären könnten (*Navarro et al.* 2012, *Maekawa et al.* 2013). Die hier untersuchten Gene wurden in diesen Studien nicht beschrieben, jedoch weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass vor allem NKX2-8 mit einer Hypermethylierung bei Uterusmyomen assoziiert sein könnte. Gerade weil Uterusmyome eine wichtige Differentialdiagnose zum OvCa darstellen, wäre es bei der Etablierung eines diagnostischen Methylierungsmarkers für das OvCa wichtig, dass er zwischen OvCa und Uterusmyomen differenzieren kann.

Zusätzlich wurde als Grund für die Unterschiede zwischen Etablierungs- und Validierungsset untersucht, ob sich das Alter in den benignen Probengruppen stark unterschied, allerdings fand sich hier kein signifikanter Unterschied. Das durchschnittliche Alter betrug 48,7 Jahre im Etablierungsset und 44,1 Jahre im Validierungsset.

5.5.5. Maligne Proben

Die wesentlichen Probengruppen, zwischen denen anhand von Methylierungsmarkern differenziert werden sollte, waren die OvCa und die benignen Erkrankungen. Da diese jedoch nicht die einzigen Differentialdiagnosen bei gynäkologischen Raumforderungen darstellen, wurden ebenso Proben von anderen gynäkologischen malignen Erkrankungen sowie Borderline-Tumoren des Ovars mitgeführt. Die Ergebnisse der Messungen dieser Proben wurden deskriptiv behandelt, und da die Detektion von Methylierungsmarkern für verschiedene maligne Geschehen oder für Borderline-Tumoren nicht Ziel dieser Arbeit war, wurden die Proben nicht in die Berechnungen der diagnostischen SEN/SPE eingeschlossen und es wurde von weiteren Versuchen mit diesen Proben abgesehen.

Die maligne Probengruppe bestand vor allem aus Sarkomen des Uterus, Karzinomen der Zervix/des Endometriums sowie malignen Keimzell- und Keimstrangtumoren. Die malignen Proben zeigten in den Messungen des Anteils methylierter Proben (Abb. 6, S. 50 und Abb. 8, S. 51) und der relativen Methylierung (Abb. 11, S. 55) sehr unterschiedliche Ergebnisse. Im Etablierungsprobenset unterschied sich der Anteil methylierter Proben und die relative Methylierung der malignen Proben bei keiner der Marker signifikant zu den benignen Proben. Im Vergleich der malignen Proben mit den OvCa waren bei vier der sechs Markern (NKX6-1, PRR15, SPAG6, SV2C) der Anteil methylierter Proben und die relative Methylierung bei den OvCa signifikant höher. Im Validierungsset wurde bei den malignen Proben teilweise eine stärkere Methylierung gemessen – hier fand sich bei vier von sechs Markern (NKX6-1, NKX2-8, PRR15, SV2C) ein signifikant höherer Anteil methylierter Proben gegenüber den benignen Proben, sowie bei allen Markern eine signifikant höhere relative Methylierung. Im Vergleich zu den OvCa unterschieden sich die malignen Proben bei keinem der Marker signifikant. Ein Grund für die fehlende signifikante Unterscheidung zwischen benignen und malignen Proben im Etablierungsset liegt vermutlich auch an dem höheren Anteil von Myomen und dem höheren Methylierungsgrad in der benignen Probengruppe (siehe Abschnitt 5.5.3., S. 82).

Ein Grund für den höheren Methylierungsgrad der malignen Proben im Validierungsset könnte der höhere Anteil an Sarkomen sein: Im Validierungsset enthielt die maligne Probengruppe mit 80% fast doppelt so viele Sarkome wie im Etablierungsset (41,7% Sarkome). Dennoch ist es aufgrund der relativ kleinen Probenanzahl der malignen Proben (n=24 im Etablierungsset, n=10

im Validierungsset) schwierig, eine definitive Aussage zu treffen. Uterussarkome sind hochmaligne Tumoren mit einer frühen Metastasierungstendenz und hohen Mortalität, aber differentialdiagnostisch teilweise schwer von Uterusmyomen zu unterscheiden. Die Differenzierung zwischen Uterussarkomen und -myomen ist jedoch wichtig, da die laparoskopische Zerkleinerung von Uterussarkomen, die fälschlicherweise als Myome gedeutet wurden, die Prognose von Patientinnen erheblich verschlechtern kann (Zhao et al. 2015). In einer Studie von *Sato et al.* konnte anhand des Methylierungsmusters von zwölf Genen mit 70%iger Präzision zwischen Uterussarkomen und -myomen unterschieden werden (Sato et al. 2016). Die Ergebnisse dieser Arbeit suggerieren, dass einige der Marker, vor allem NKX6-1, PRR15 und SV2C, häufiger bei Uterussarkomen methyliert sein könnten und dementsprechend bei der Differenzierung zwischen Uterussarkomen und Uterusmyomen nützlich sein könnten. Es können jedoch mit den Ergebnissen dieser Arbeit keine genaueren Aussagen getroffen werden und es müsste dafür in zukünftigen Arbeiten ein direkter Vergleich der Methylierung von Uterussarkomen und -myomen anhand dieser Marker untersucht werden.

Des Weiteren war die Methylierung einiger Marker bei den malignen Erkrankungen nicht signifikant unterschiedlich zu den OvCa-Proben, welches bedeuten könnte, dass die hier untersuchten Methylierungsmarker teilweise (vor allem NKX2-8 und NR2F2) spezifisch für Malignität, jedoch nicht spezifisch für das OvCa sind. Eine gezieltere Untersuchung der Methylierung von verschiedenen malignen gynäkologischen Geschehen mit einer höheren Probenanzahl der verschiedenen Diagnosen wäre für eine genauere Aussage notwendig.

5.6. Vergleich mit bekannten diagnostischen Biomarkern für das Ovarialkarzinom

Obwohl in der Forschung zunehmend das Interesse an cfDNA als Biomarker für das OvCa zunimmt, sind die Glykoprotein-Biomarker CA125 und HE4 im Blut nach wie vor am besten untersucht und gelten als die geeignetsten Biomarker zur Abklärung von Patientinnen mit ovariellen Raumforderungen. In einer Metaanalyse von *Wang et al.* wurden die Marker HE4, CA125 und der Algorithmus ROMA (vom engl. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*), welcher die Serumkonzentration von HE4, CA125 sowie den menopausalen Status berücksichtigt, bezüglich der Differenzierung von OvCa und benignen gynäkologischen Erkrankungen verglichen (Wang et al. 2014). Insgesamt hatte HE4 die höchste durchschnittliche SPE von ca. 94%, verglichen mit ca. 82% bei CA125 oder ROMA. Allerdings hatten CA125 mit 79% und ROMA mit 85% eine höhere SEN als HE4 (76%). Es fanden sich deutliche Unterschiede der SEN beim Vergleich der Erkrankungsstadien: In den Frühstadien des OvCa hatten HE4 und CA125 eine SEN von ca. 55%, und ROMA die höchste SEN mit 74%. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium stieg die SEN von HE4 und CA125 zu 86% bzw. 89% an, und bei ROMA betrug die SEN hier sogar

96% (Wang et al. 2014). Auffallend in der Metaanalyse sind die Schwankungen der SEN/SPE der verschiedenen Markern je nach Definierung der untersuchten Gruppe – vor allem der Menopausalstatus der Probandinnen, das Erkrankungsstadium, und ob es sich bei den untersuchten OvCa nur um EOC (epitheliale OvCa) handelt und diese auch Borderline-Tumoren einschließt oder nicht, scheinen wichtige Faktoren zu sein. Dies zeigt vor allem die Wichtigkeit einer genau definierten Zielgruppe bei der Etablierung eines klinischen Tests mit diagnostischen Markern, da die errechnete SEN/SPE sich nur auf diese Zielgruppe bezieht. Während das Erkrankungsstadium und die Histologie in dieser Arbeit als Einflussfaktor untersucht wurden, wurde der Menopausalstatus der Probandinnen nicht berücksichtigt. In weiterführenden Studien zur Validierung von Methylierungsmarkern, vor allem im Ausblick auf einen klinischen Test, wäre die Berücksichtigung des Menopausalstatus der Probandinnen wichtig, da postmenopausale Frauen ein höheres Erkrankungsrisiko haben und bei der OvCa-Diagnostik die wichtigste Zielgruppe bilden.

Im Vergleich der diagnostischen SEN/SPE dieser genannten Biomarker mit den untersuchten Methylierungsmarkern dieser Arbeit konnte kein einzelner Methylierungsmarker eine höhere diagnostische Sicherheit erzielen. Allerdings wies eine Kombination von zwei Markern (PRR15/SPAG6 oder PRR15/SV2C) mit der zytologischen Diagnostik eine vergleichbare SEN (84,8%) wie der ROMA (SEN 85%, SPE 82%) bei einer höheren SPE (PRR15/SPAG6/Zytologie: 92,3% bzw. PRR15/SV2C/Zytologie: 100,0%) auf (Wang et al. 2014). Somit lieferten vor allem die Methylierungsmarker PRR15, SPAG6 und SV2C vielversprechende Ergebnisse und könnten in Kombination mit anderen Markern zu einer verbesserten Diagnostik des OvCa beitragen.

5.7. Untersuchung der Zellpellet- und Gewebeproben

5.7.1. Vergleich von cfDNA, Zellpellet und Gewebeproben

Bei 23 OvCa- und Borderline-Tumor-Proben wurden in dieser Arbeit anhand der Methylierungsmarker zusätzlich das dazugehörige Zellpellet und Tumorgewebe auf DNA-Methylierung untersucht. Dies sollte Unterschiede der relativen Methylierung zwischen den verschiedenen Probenmaterialien darstellen (Abb. 14, S. 62). Der Vergleich zeigte eine Tendenz, dass die cfDNA und die Zellpellet-Proben im Durchschnitt eine niedrigere relative Methylierung als die Gewebeproben von PT und Absiedlungen aufwiesen.

Eine Schwierigkeit dieses Vergleiches war, dass die absolute Quantität an Tumor-DNA in cfDNA- und Zellpellet-Proben nicht bekannt war und somit ein genauer Vergleich der relativen Methylierung nicht möglich war. Bei den Gewebeproben war eine Abschätzung des Tumorzellanteiles bekannt, allerdings wurde die gemessene relative Methylierung in diesem

Vergleich nicht in Relation zum Tumorzellanteil gesetzt, weil eine vergleichbare Berechnung der relativen Methylierung abhängig von der ctDNA-Konzentration bei der cfDNA mit den vorhandenen Daten nicht möglich gewesen wäre. Mit der Vermutung, dass die ctDNA-Konzentration in einer Probe von cfDNA oft sehr gering ist, ist es möglich, dass die ctDNA einen ähnlichen Grad an relativer Methylierung wie das Tumorgewebe (mit höherem Tumorzellanteil) aufwies, diese aber aufgrund der geringen ctDNA-Konzentration deutlich niedriger gemessen wurde (Cheung et al. 2018, Vymetalkova et al. 2018). 22 der 23 Gewebeproben vom PT hatten einen Tumorzellanteil von $\geq 10\%$. Bei cfDNA-Proben aus Serum/Plasma wird meist ein deutlich niedrigerer ctDNA-Anteil angenommen und in Proben von Peritonealflüssigkeit wäre nicht von einer erheblich höheren Konzentration auszugehen (Nikolaev et al. 2018). Eine sehr geringe ctDNA-Konzentration unter der qMSP-Nachweisgrenze könnte auch ein Grund sein, warum bei mehreren Zellpellet- und Gewebeproben eine Methylierung von $\geq 0\%$ nachgewiesen und bei der dazugehörigen cfDNA-Probe eine relative Methylierung von 0% gemessen wurde. Demnach ist ungewiss, ob die dargestellten Unterschiede der relativen Methylierung in Abb. 14 (S. 62) aufgrund von tatsächlich unterschiedlichen Methylierungshäufigkeiten in den verschiedenen Probenmaterialien, aufgrund von unterschiedlichen Tumor-DNA-Konzentrationen, oder aufgrund von einer Kombination dieser Tatsachen entstanden sind. Im Vergleich einzelner Proben zeigte sich jedoch, dass eine hohe Methylierung im PT nicht zwangsläufig mit einer höheren relativen Methylierung in der cfDNA-Probe einherging. Ein zusätzlicher Faktor, der einen Vergleich der Probenmaterialien erschwerte, ist dass die Gewebeschnitte nur einen Teil des Tumors repräsentieren – durch intratumorale Heterogenität könnte in der cfDNA eine Hypermethylierung gemessen worden sein, welche in einem Teil des Tumorgewebes vorkommt, der nicht im Gewebeschnitt erfasst wurde.

Es fand kein Vergleich von den Tumorgewebeproben mit Normalgewebe des Ovars statt. Der Ursprung des OvCa wurde schon häufig diskutiert und es wird angenommen, dass OvCa nicht nur aus dem Keimepithel des Ovars, sondern auch aus den Eileitern, der Gebärmutter, der Zervix und dem Darm entspringen können (Dubeau 2008, Kurman und Shih Ie 2011, Yang-Hartwich et al. 2014). Aufgrund dessen wäre ein Vergleich der Methylierung von Tumorgewebe und gesundem Ovargewebe nicht sinnvoll, weil das Ovargewebe nur geringes Epithelgewebe enthält und nicht zwingenderweise das Ursprungsgewebe des Tumors darstellt.

Von den benignen Kontrollproben lagen keine Gewebeproben zum Vergleich vor. Da einige benigne Kontrollproben eine Methylierung der Marker aufwiesen, wäre es nützlich gewesen, die dazugehörigen Gewebebiopsien zu untersuchen. Bei einigen benignen Erkrankungen, wie z.B. Uterusmyomen, wurde bereits aberrante DNA-Methylierung im Gewebe beschrieben. Es wäre somit denkbar, dass die Methylierung der cfDNA die Methylierung des erkrankten Gewebes

widerspiegelt (Maekawa et al. 2013). Bei Methylierung einer cfDNA-Probe ohne Methylierung im Gewebe wäre zu vermuten, dass die Methylierungsdetektion der Marker nicht von der benignen Erkrankung abhängt, sondern dass die methylierte cfDNA evtl. einen anderen Ursprung hat. Ein Vergleich von cfDNA und Gewebeprobe der benignen Erkrankungen könnte demnach Aufschluss über DNA-Methylierung bei benignen Erkrankungen und falsch-positive Ergebnisse geben.

5.7.2. Intratumorale Heterogenität

Ein zusätzlicher Vergleich von dem Methylierungsmuster in Proben von PT und den dazugehörigen Absiedlungen im Bauchraum sollte das Maß der intratumoralen epigenetischen Heterogenität untersuchen. Da von den Gewebeprobe des PT/der Absiedlungen der Tumoranteil bekannt war, war ein direkter Vergleich der relativen Methylierung möglich (Abb. 15, S. 64). Der Tumoranteil wurde anhand von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitten abgeschätzt und die Abschätzung wurde von zwei Personen unabhängig durchgeführt. Für eine genauere Identifizierung von Tumorzellen im Gewebeschnitt wäre eine immunohistochemische Färbung mittels Antikörper für Ki67 und Cytokeratinen möglich gewesen, allerdings war die Schätzung für den hier untersuchten Vergleich ausreichend. Weitestgehend war die relative Methylierung in PT und Absiedlung nicht signifikant unterschiedlich – bei sechs der zwölf Proben war die relative Methylierung homogen. Fünf der zwölf Proben wiesen jedoch eine heterogene relative Methylierung auf, d.h. dass bei der Mehrzahl der Marker ein mehr als zweifacher Unterschied der relativen Methylierung zwischen PT und Absiedlung bestand. In der letzten Probe, die als „unklar“ bewertet wurde, zeigte nur NR2F2 eine heterogene relative Methylierung. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass intratumorale Heterogenität in unterschiedlichem Maße und bei bestimmten Genen häufiger auftritt. Bei drei der Marker – NKX2-8, NR2F2 und PRR15 – zeigte sich eine erhöhte Heterogenität, welche sich als eine erhöhte Methylierung in den Absiedlungen zeigte. Bei NKX2-8 war dieser Unterschied laut Wilcoxon-Test statistisch signifikant ($p=0,041$). Die Ergebnisse in der Literatur zu Methylierungsunterschieden zwischen PT und Metastasen sind verschieden. Bisherige Studien zur epigenetischen Heterogenität zwischen PT und Metastasen beschreiben je nach Tumorart sowohl eine Zu- und Abnahme der Methylierung bei Metastasen wie auch ähnliche Methylierungsmuster (Mazor et al. 2016). Untersuchungen von Melanomen deuten darauf hin, dass einige epigenetische Veränderungen die Metastasierung von Tumoren fördern und demnach in Absiedlungen zu finden sind (Chatterjee et al. 2017, Grzywa et al. 2017). Auch beim Prostatakarzinom wurden erhebliche Unterschiede im Methylierungsstatus zwischen PT und Metastasen gefunden, welche teilweise auf eine Zunahme der Hypomethylierung in Metastasen hindeuten (Yegnasubramanian et al. 2008, Lin et al. 2013).

Beim Kolorektalkrebs wurde dagegen ein sehr ähnlicher Methylierungsstatus von PT und Absiedlungen beschrieben (Ju et al. 2011).

Die Ergebnisse von den PT und Absiedlungen in dieser Arbeit deuten vor allem bei zwei der Marker auf eine intratumorale Heterogenität hin, jedoch ist aufgrund der geringen Probenanzahl (n=12) eine definitive Aussage nicht möglich. Eine intratumorale Heterogenität zwischen PT und Absiedlungen beim OvCa könnte dafür sprechen, dass Gewebeproben für Messungen von tumorspezifischer DNA-Methylierung aufgrund der limitierten Repräsentation des Tumorgenoms nicht bestens geeignet sind, und dass cfDNA evtl. ein umfassenderes Bild des Tumorgenoms bieten könnte.

5.8. Einflussfaktoren der DNA-Methylierung

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene potenzielle Einflussfaktoren der Methylierung bei den OvCa-Proben untersucht: Das Patientinnenalter, das FIGO-Stadium, der histologische Subtyp und die Behandlung mit einer Chemotherapie vor Probenentnahme. Die Auswahl dieser Faktoren basierte auf vorhandene Information über die Probandinnen und beschriebene Zusammenhänge mit den Faktoren und der DNA-Methylierung in der Literatur. Es wurde bei keinem der Faktoren ein eindeutiger Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus beim OvCa gefunden, nur einzelne Marker scheinen durch bestimmte Faktoren beeinflusst zu werden (siehe Tab. 13, S. 70). Bei NKX6-1 zeigte sich ein höherer Anteil methylierter Proben und eine höhere relative Methylierung bei Proben von Probandinnen im Alter von ≥ 65 Jahren. Bei NKX2-8, PRR15, SPAG6 und SV2C fand sich ein Zusammenhang zwischen fortgeschrittenen Krankheitsstadien des OvCa und einer höheren relativen Methylierung. NKX2-8 und SV2C zeigten eine signifikant höhere relative Methylierung bei serösen OvCa gegenüber nicht-serösen OvCa. Eine chemotherapeutische Behandlung in der Patientinnenanamnese zeigte bei keinem der Marker einen Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus. Vor allem bei den Faktoren FIGO-Stadium, histologischer Subtyp und Z.n. Chemotherapie stellte die geringe Probenanzahl in den Untergruppen eine Limitation der Bewertung dieser Faktoren dar. Das OvCa wird in den meisten Fällen in einem späten Krankheitsstadium diagnostiziert, weswegen die deutliche Mehrzahl an Proben ein FIGO-Stadium III – IV hatte. Da seröse OvCa 70% der OvCa-Fälle darstellen, handelte es sich bei den meisten Proben um seröse OvCa. Lediglich 19 von 74 OvCa-Proben waren nicht serös, weshalb alle nicht-serösen OvCa in einer Untergruppe zusammengefasst wurden. Ein möglicher Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus und einem bestimmten nicht-serösen Subtyp (wie z.B. endometrioides OvCa) konnte somit nicht detektiert werden.

Informationen über die untersuchten Probandinnen waren limitiert und somit konnten weitere potenzielle Einflussfaktoren nicht berücksichtigt werden. Bei der weiterführenden Untersuchung

und Validierung von diagnostischen Methylierungsmarkern für das OvCa wären anamnestische Angaben von den Probandinnen zu bekannten Risiko- sowie Schutzfaktoren des OvCa interessant, weil auch hier ein potenzieller Zusammenhang mit einer tumorspezifischen Hypermethylierung möglich wäre. Vor allem Faktoren, welche die Anzahl an ovulatorischen Zyklen beeinflussen, wie z.B. die Anzahl ausgetragener Schwangerschaften oder die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, sind als Einflussfaktoren des Erkrankungsrisikos bekannt (Runnebaum und Stickeler 2001). Da die Mechanismen der Krankheitsentstehung und dessen Zusammenhang mit wiederholter Ovulation noch nicht eindeutig geklärt sind, könnte eine Untersuchung dieser anamnestischen Risikofaktoren und einem potenziellen Zusammenhang mit Hypermethylierung der tumorspezifischen cfDNA zu dem Verständnis der OvCa-Pathogenese beitragen.

5.9. Zukünftige Anwendungen von „Liquid Biopsies“

„Liquid Biopsies“ und die Analyse von zellfreier DNA gewinnen in der Onkologie zunehmend an Relevanz. Verglichen mit Gewebebiopsien wäre die Einfachheit einer minimal-invasiven Entnahme von Körperflüssigkeiten für Patientinnen sowie für das klinische Personal von erheblichem Vorteil und könnte in regelmäßigen Abständen durchgeführt werden. Darüber hinaus repräsentiert eine Gewebebiopsie nur einen Teil des Tumors, sodass molekulargenetische Unterschiede, die auf zeitlicher oder räumlicher Basis entstanden sind, nicht erfasst werden (Cheng et al. 2017, Saini et al. 2018, Vymetalkova et al. 2018). Da tumorspezifische zellfreie DNA (ctDNA) von verschiedenen Teilen des Tumors, oder auch von Absiedlungen stammen kann, könnte es einen besseren Überblick von dem Tumorgenom bieten und dadurch relevante Informationen für Diagnostik, Prognoseeinschätzungen und personalisierte Therapieansätze geben (Cheung et al. 2018).

Die bisherige Forschung von ctDNA und *Liquid Biopsies* fand zum großen Teil an Blutproben (Serum oder Plasma) statt. Maligne Krebserkrankungen werden i.d.R. stark durchblutet und somit wird eine ctDNA-Abgabe sämtlicher Formen von Krebserkrankungen in den Blutstrom vermutet. Darüber hinaus ist die Gewinnung einer Blutprobe im Rahmen einer medizinischen Behandlung oder Diagnostik ein Routineeingriff, sodass ein etablierter klinischer Test mit Analyse einer Blutprobe im klinischen Setting gut realisierbar wäre. Trotzdem ist die Auswahl an Körperflüssigkeiten, in denen cfDNA zu detektieren wäre, nicht auf Blut beschränkt und auch andere flüssige Biopsiematerialien sollten untersucht werden. Am meisten wurden *Liquid Biopsies* bis jetzt in Bezug auf kolorektale Karzinome (CRC, vom engl. *colorectal cancer*) untersucht und zusätzlich zu Blutproben lieferten cfDNA aus Urin und Stuhl vielversprechende Ergebnisse: Es

zeigte sich eine hohe Konkordanz zwischen genetischen Veränderungen in cfDNA und im Tumor (Vymetalkova et al. 2018).

Diese Arbeit untersuchte Hypermethylierung in cfDNA aus Bauchhöhlenspülflüssigkeit, welche bis dato nur in wenigen Studien untersucht wurde. Da das OvCa aber hauptsächlich in die Bauchhöhle streut und in der Peritonealflüssigkeit oft Tumorzellen vorliegen, ist dies eine durchaus relevante Quelle für ctDNA vom OvCa. Die bisherigen Untersuchungen von Blutproben und Peritonealflüssigkeit in Bezug auf cfDNA beim OvCa analysierten meist somatische Mutationen, vor allem p53-Mutationen (Parrella et al. 2003, Swisher et al. 2005, Krimmel et al. 2016, Cheng et al. 2017).

Die Arbeitsgruppe *Muller et al.* untersuchte die Methylierung von 15 Genen in Peritonealflüssigkeiten von OvCa-Patientinnen, allerdings wurden hier nur OvCa-Patientinnen eingeschlossen und es wurde Hypermethylierung als ein prognostischer und nicht diagnostischer Marker bewertet. Die Methylierung der 15 Gene wurde hier mit einer besseren Prognose assoziiert. Es wurden andere Gene als in dieser Arbeit untersucht und es handelten sich um Gene, bei denen eine angebliche Funktion in der Karzinogenese oder Metastasierung bekannt ist (Muller et al. 2004). *Ibanez de Caceres et al.* untersuchten bei 50 OvCa-Patientinnen in Tumorgewebe sowie in den dazugehörigen Peritonealflüssigkeiten und Blutproben sechs bekannte Tumorsuppressorgene (BRCA1, RASSF1A, APC, p14^{ARF}, p16^{INK4a}, DAP-Kinase) und fanden in allen Tumorgewebeproben eine Promotormethylierung von mindestens einem der Gene (Ibanez de Caceres et al. 2004). Auch in 37 von 38 OvCa-Frühestadien (FIGO I) trat eine Promotormethylierung auf. Die Untersuchung der Serumproben zeigte eine 82%ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gewebeproben. Bei den Peritonealflüssigkeiten fand sich eine hohe Übereinstimmung in den FIGO IC – IV OvCa, dagegen kam in nur einer von zwölf Frühestadien (FIGO IA/B) eine Promotormethylierung vor. Des Weiteren konnte in 40 Kontrollproben in den sechs untersuchten Promotorregionen keine Hypermethylierung nachgewiesen werden (SPE 100%) (Ibanez de Caceres et al. 2004). Es fehlen hier noch Studien mit größeren Probenkollektiven zur Bestätigung der Ergebnisse.

Ein Vorteil dieser Arbeit ist, dass durch die genomweite *Microarray*-Analyse auch hypermethylierte Gene erkannt und untersucht wurden, bei denen noch kein eindeutiger Zusammenhang mit Krebserkrankungen besteht. Neben den genannten Studien gab es bisher kaum vergleichbare Untersuchungen von cfDNA aus Peritonealflüssigkeit, bei denen verschiedene Gene als potenzielle diagnostische Methylierungsmarker zur Differenzierung zwischen OvCa und benignen Erkrankungen bewertet wurden. Da von den hier untersuchten Patientinnen nur intraoperative Materialien (Bauchspülflüssigkeit, Tumorgewebe) vorlagen, konnten keine dazugehörigen Blutproben untersucht werden. Um die Relevanz der sechs Gene dieser Arbeit als

diagnostische Biomarker für das OvCa besser einschätzen zu können, wären weitere Untersuchungen von Serum/Plasma sinnvoll, da Blutproben in früheren FIGO-Stadien, bei denen der Tumor auf das Ovar beschränkt ist, evtl. eine bessere SEN als Peritonealflüssigkeit ergeben könnten (Ibanez de Caceres et al. 2004). Bei einem blut-basierten Test wäre auch die Untersuchung von Kontrollproben von „gesunden“ Frauen möglich – da es sich bei dieser Arbeit um die Fragestellung von Patientinnen mit einer ovariellen Raumforderung, die sich einer Operation unterzogen, handelte, bestanden die Kontrollproben aus benignen gynäkologischen Erkrankungen. Im Ausblick einer Etablierung von diagnostischen Methylierungsmarkern wäre jedoch auch eine Untersuchung von gesunden Patientinnengruppen relevant und ließe eine Berechnung der SPE der Marker als Screening-Test zu. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit vor allem Probandinnen mit sonographisch detektierbaren ovariellen Raumforderungen getestet wurden, erschwerte vor allem die Detektion von Frühstadien des OvCa, welche noch sehr klein sein können (< 3mm). Auch Peritonealkarzinosen sind schwieriger durch Ultraschall zu erkennen, da sie oft nicht zu einer Vergrößerung des Ovars führen (Mathieu et al. 2018). TVU hat als die erste Methode in einem Screening (vom engl. *First-line-screening*) den Vorteil, dass es kostengünstig und nicht-invasiv ist, jedoch stellt eine hohe Rate an falsch-negativen Ergebnissen bei der OvCa-Diagnostik einen wichtigen, Sensitivitäts-limitierenden Nachteil dar. Im Ausblick auf einen Screening-Test für das OvCa mit Methylierungsmarkern könnte es sinnvoll sein, die blut-basierte Messung der Methylierungsmarker an erster Stelle zu setzen und den TVU bei Probandinnen mit auffälliger Hypermethylierung anzuwenden (vom engl. *Second-line-Screening*) (Mathieu et al. 2018). Da bei der Suche nach diagnostischen Markern für das OvCa vor allem eine Mortalitätsreduktion durch eine frühere Detektion angestrebt wird, sollte der Marker auch OvCa detektieren können, welche noch nicht oder nur schlecht sonographisch detektierbar sind. Es müsste sich hier jedoch auch um einen OvCa-spezifischen Marker handeln, damit anhand einer tumorspezifischen Hypermethylierung im Blut auf die Lokalisation des PT geschlossen werden kann.

Auch eine Kombination von Methylierungsmarkern und anderen diagnostischen Methoden/Messwerten wie z.B. CA125, HE4 oder TVU wäre durchaus denkbar und könnte die SPE erhöhen (Shao et al. 2015). Die Arbeitsgruppe *Cohen et al.* stellte einen blut-basierten Test zur Krebsdiagnostik vor, genannt „CancerSEEK“, der aus einem Gen- und Protein-Panel bestand (Cohen et al. 2018). Anhand der Analyse von Mutationen in der cfDNA sowie zirkulierenden Proteinen konnten acht verschiedene Tumorentitäten (Ovarial-, Leber-, Magen-, Pankreas-, Ösophagus-, Kolorektal-, Lungen- oder Mamma-Ca) detektiert und zum großen Teil (83%) sogar lokalisiert werden. Vor allem beim OvCa fand sich eine sehr hohe SEN (98%) und allgemein bestand eine SPE von > 99%. Für die Detektion des OvCa waren vor allem TP53-Mutationen

sowie die Protein-Biomarker CA125 und PRL ausschlaggebend. Der Test konnte in 79% der OvCa-Fälle auch korrekt vorhersagen, dass es sich um ein OvCa handelte. Eine Kombination der in diesem Panel angewendeten Marker mit Methylierungsmarkern wäre denkbar und wird von *Cohen et al.* selbst vorgeschlagen (Cohen et al. 2018).

Des Weiteren könnte eine generelle Messung der Konzentration/Menge an cfDNA als zusätzlicher diagnostischer Faktor herangezogen werden – eine Metaanalyse von *Zhou et al.* evaluierte neun Studien zur quantitativen Analyse von cfDNA beim OvCa und fand eine diagnostische SEN von 70% und SPE von 90% (Shao et al. 2015, Zhou et al. 2016).

Diese Arbeit fokussierte sich auf die Untersuchung und Etablierung von potenziellen diagnostischen Biomarkern des OvCa basierend auf cfDNA-Hypermethylierung. Allerdings haben sich Methylierungsmarker beim OvCa in der Forschung nicht nur für diagnostische Zwecke als relevant erwiesen; zahlreiche Studien haben prognostische sowie therapeutisch-prädiktive Methylierungsmarker beim OvCa untersucht und Gene identifiziert, die bei Hyper-/Hypomethylierung mit einem kürzeren/längeren (progressionsfreien) Überleben oder einer Chemoresistenz korrelieren (Singh et al. 2019). Da bei den hier untersuchten Proben keine Informationen über das Überleben und das Therapieansprechen der Patientinnen bekannt war, und dies nicht das Ziel dieser Arbeit war, konnte der Nutzen der hier untersuchten Marker als prognostische oder prädiktive Marker nicht evaluiert werden. Als relevante hypermethylierte Gene des OvCa könnten diese jedoch diesbezüglich in zukünftigen Arbeiten untersucht werden. Vor allem die Marker mit einer höheren relativen Methylierung in fortgeschrittenen Stadien (NKX2-8, PRR15, SPAG6 und SV2C) könnten durchaus eine prognostische Relevanz haben.

6. Schlussfolgerungen

Die untersuchten Methylierungsmarker ermöglichten anhand von cfDNA aus Bauchraumspülungen eine Differenzierung von OvCa und benignen gynäkologischen Erkrankungen. Es konnten sechs Gene bestätigt werden, die beim OvCa eine relevante Hypermethylierung aufweisen: NKX6-1, NKX2-8, NR2F2, PRR15, SPAG6 und SV2C. Diese Hypermethylierung der einzelnen Gene ließ mit methylierungsspezifischen Primerpaaren und qMSP eine signifikante Unterscheidung von OvCa und benignen Erkrankungen anhand von cfDNA aus Bauchraumspülflüssigkeiten zu (Odds-Ratio 2,9–22,8; $p < 0,05$; siehe Abs. 4.3, Tab. 11, S. 53). Die einzelnen Marker erreichten eine SEN von 45 – 89% und eine SPE von 51 – 100%. Die einzelnen Marker sowie die Markerkombinationen wurden in einem Etablierungs- und Validierungsprobenset bewertet und zwischen den Probensets zeigten sich einige Unterschiede der SEN und SPE. Dennoch war eine signifikante Unterscheidung der OvCa-Proben und benignen Proben mit fünf der sechs Marker in beiden Probensets gegeben. Durch Kombination der Marker und Einschluss des Zytologie-Ergebnisses ließ sich die SEN und SPE auf 85% bzw. 100% steigern. Obwohl die Hinzunahme der Zytologie-Diagnostik die SEN verbesserte und die Kombination der Marker mit der Zytologie vielversprechende Ergebnisse lieferte, basierten diese Ergebnisse auf nur einem Probenset und müssten in weiteren Arbeiten noch validiert werden.

Der Einschluss und die Untersuchung von den zusätzlichen Probengruppen der weiteren malignen gynäkologischen Erkrankungen ergab unterschiedliche Methylierungsergebnisse und deutete darauf hin, dass die Methylierungsmarker allgemein tumorspezifisch und nicht speziell OvCa-spezifisch sein könnten. Allerdings ließ sich mit den vorhandenen Daten keine genauere Schlussfolgerung treffen. Eine signifikante Unterscheidung der OvCa-Probengruppe von der malignen Probengruppe anhand der Methylierungsmarker war zum Großteil nicht gegeben. Der Einschluss von einigen Borderline-Tumor-Proben deutete darauf hin, dass die Methylierungsmarker zur Diagnostik von Borderline-Tumoren nicht geeignet sind, aufgrund der geringen Probenanzahl ließ sich indes keine genauere Aussage treffen.

Vergleiche der cfDNA mit Zellpellet- und Gewebeproben deuteten auf eine häufigere und stärkere Methylierung der Gewebeproben hin. Untersuchungen der intratumoralen Heterogenität des Tumorgewebes zeigten ein weitestgehend, aber nicht ausschließlich homogenes Methylierungsmuster. Die Bewertung der Zellpellet-Proben mit den Methylierungsmarkern konnte zeigen, dass cfDNA-Proben zur Differenzierung von OvCa und benignen Proben mit dieser Methodik besser geeignet als Zellpellet-Proben sind.

Aufgrund von Literaturrecherche wurden potenzielle Einflussfaktoren der DNA-Methylierung identifiziert und untersucht. Das Patientinnenalter, die Histologie sowie eine vorherige

Chemotherapie konnten weitestgehend als Einflussfaktoren der Methylierung der hier genannten Gene ausgeschlossen werden. Nur bei einzelnen Markern fand sich eine Signifikanz der Faktoren: Es zeigte sich ein höheres Patientinnenalter bei NKX6-1 sowie eine seröse Histologie bei NKX2-8 und SV2C als potenzieller Einflussfaktor der Methylierung. Bei vier der sechs Marker (NKX2-8, PRR15, SPAG6 und SV2C) fand sich eine signifikant höhere relative Methylierung in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (FIGO III – IV) gegenüber frühen (FIGO IA – IB) oder mittleren (FIGO IC – IIC) Stadien, welches die Idee, dass DNA-Methylierung sich aufgrund genomischer Instabilität in fortgeschrittenen Krebserkrankungen anhäufen kann, unterstützen würde.

Die etablierten Methylierungsmarker dieser Arbeit bieten eine interessante Ergänzung zur aktuellen Forschung bezüglich OvCa-Diagnostik anhand von Methylierungsmarkern und *Liquid Biopsies*. Anhand dieser Marker könnte eine kostengünstige, minimal-invasive Unterscheidung von ovariellen Raumforderungen ermöglicht werden. Zur Verbesserung der diagnostischen SEN/SPE könnten die Methylierungsmarker miteinander sowie mit anderen Biomarkern oder diagnostischen Methoden kombiniert werden und eine Untersuchung der Marker in anderen Körperflüssigkeiten wie Plasma/Serum könnte weiteren Aufschluss über DNA-Methylierung in cfDNA beim OvCa bieten. Patientinnen mit ovariellen Raumforderungen könnten somit zukünftig mithilfe dieser Methylierungsmarker von einer verbesserten und weniger invasiven Unterscheidung der Raumforderungen profitieren. Bei Verdacht auf ein OvCa könnten Patientinnen gezielt an spezialisierte Therapeuten bzw. an Schwerpunkt-/Universitätskliniken empfohlen werden und dadurch eine genauere, leitliniengerechte und prognoserelevante Therapieplanung erhalten.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Agostini M, Pucciarelli S, Enzo MV, Del Bianco P, Briarava M, Bedin C, Maretto I, Friso ML, Lonardi S, Mescoli C, Toppan P, Urso E, Nitti D. 2011. Circulating cell-free DNA: a promising marker of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*, 18 (9):2461-2468.
- Ahluwalia A, Yan P, Hurteau JA, Bigsby RM, Jung SH, Huang TH, Nephew KP. 2001. DNA methylation and ovarian cancer. I. Analysis of CpG island hypermethylation in human ovarian cancer using differential methylation hybridization. *Gynecol Oncol*, 82 (2):261-268.
- Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, Bannon F, Ahn JV, Johnson CJ, Bonaventure A, Marcos-Gragera R, Stiller C, Azevedo e Silva G, Chen WQ, Ogunbiyi OJ, Rachet B, Soeberg MJ, You H, Matsuda T, Bielska-Lasota M, Storm H, Tucker TC, Coleman MP, Group CW. 2015. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*, 385 (9972):977-1010.
- Altenberger C, Heller G, Ziegler B, Tomasich E, Marhold M, Topakian T, Mullauer L, Heffeter P, Lang G, End-Pfutzenreuter A, Dome B, Arns BM, Klepetko W, Zielinski CC, Zochbauer-Muller S. 2017. SPAG6 and L1TD1 are transcriptionally regulated by DNA methylation in non-small cell lung cancers. *Mol Cancer*, 16 (1):1.
- Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger L, Zilch H. 2010. *Duale Reihe Anatomie*. 2 Aufl. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag, 715-732.
- Ayantunde AA, Parsons SL. 2007. Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol*, 18 (5):945-949.
- Ayhan A, Gultekin M, Taskiran C, Dursun P, Firat P, Bozdog G, Celik NY, Yuce K. 2007. Ascites and epithelial ovarian cancers: a reappraisal with respect to different aspects. *Int J Gynecol Cancer*, 17 (1):68-75.
- Bandala C, Miliar-Garcia A, Mejia-Barradas CM, Anaya-Ruiz M, Luna-Arias JP, Bazan-Mendez CI, Gomez-Lopez M, Juarez-Mendez S, Lara-Padilla E. 2012. Synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13 (10):5063-5067.
- Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. 2005. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG*, 112 (7):857-865.
- Barekati Z, Radpour R, Kohler C, Zhong XY. 2010. Specificity of methylation assays in cancer research: a guideline for designing primers and probes. *Obstet Gynecol Int*, 2010.
- Bast RC, Jr. 2004. Early detection of ovarian cancer: new technologies in pursuit of a disease that is neither common nor rare. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 115:233-247; discussion 247-238.
- Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K. 2005. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*, 15 Suppl 3:274-281.
- Baylin SB, Jones PA. 2011. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*, 11 (10):726-734.
- Bedin C, Enzo MV, Del Bianco P, Pucciarelli S, Nitti D, Agostini M. 2017. Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int J Cancer*, 140 (8):1888-1898.
- Bell A, Bell D, Weber RS, El-Naggar AK. 2011. CpG island methylation profiling in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer*, 117 (13):2898-2909.
- Berdasco M, Esteller M. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*, 19 (5):698-711.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong

- SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih I M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA, Jr. 2014. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 6 (224):224ra224.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16 (1):6-21.
- Bird AP. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321 (6067):209-213.
- Burges A, Schmalfeldt B. 2011. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 108 (38):635-641.
- Butler TM, Johnson-Camacho K, Peto M, Wang NJ, Macey TA, Korkola JE, Koppie TM, Corless CL, Gray JW, Spellman PT. 2015. Exome Sequencing of Cell-Free DNA from Metastatic Cancer Patients Identifies Clinically Actionable Mutations Distinct from Primary Disease. *PLoS One*, 10 (8):e0136407.
- Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, Reding DJ, Greenlee RT, Yokochi LA, Kessel B, Crawford ED, Church TR, Andriole GL, Weissfeld JL, Fouad MN, Chia D, O'Brien B, Ragard LR, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hartge P, Pinsky PF, Zhu CS, Izmirlian G, Kramer BS, Miller AB, Xu JL, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD, Team PP. 2011. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 305 (22):2295-2303.
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*, 21 (1):103-107.
- Carow K, Read C, Hafner N, Runnebaum IB, Corner A, Durst M. 2017. A comparative study of digital PCR and real-time qPCR for the detection and quantification of HPV mRNA in sentinel lymph nodes of cervical cancer patients. *BMC Res Notes*, 10 (1):532.
- Chatterjee A, Stockwell PA, Ahn A, Rodger EJ, Leichter AL, Eccles MR. 2017. Genome-wide methylation sequencing of paired primary and metastatic cell lines identifies common DNA methylation changes and a role for EBF3 as a candidate epigenetic driver of melanoma metastasis. *Oncotarget*, 8 (4):6085-6101.
- Chen Y, Du H, Bao L, Liu W. 2018. Opportunistic salpingectomy at benign gynecological surgery for reducing ovarian cancer risk: a 10-year single centre experience from China and a literature review. *J Cancer*, 9 (1):141-147.
- Cheng X, Zhang L, Chen Y, Qing C. 2017. Circulating cell-free DNA and circulating tumor cells, the "liquid biopsies" in ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 10 (1):75.
- Cheung AH, Chow C, To KF. 2018. Latest development of liquid biopsy. *J Thorac Dis*, 10 (Suppl 14):S1645-S1651.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1):156-159.
- Chu DC, Chuang CK, Fu JB, Huang HS, Tseng CP, Sun CF. 2002. The use of real-time quantitative polymerase chain reaction to detect hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking the GSTP1 gene to diagnose prostate carcinoma. *J Urol*, 167 (4):1854-1858.
- Chudecka-Glaz AM. 2015. ROMA, an algorithm for ovarian cancer. *Clin Chim Acta*, 440:143-151.
- Cibula D, Widschwendter M, Majek O, Dusek L. 2011. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 17 (1):55-67.
- Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, Douville C, Javed AA, Wong F, Mattox A, Hruban RH, Wolfgang CL, Goggins MG, Dal Molin M, Wang TL, Roden R,

- Klein AP, Ptak J, Dobbyn L, Schaefer J, Silliman N, Popoli M, Vogelstein JT, Browne JD, Schoen RE, Brand RE, Tie J, Gibbs P, Wong HL, Mansfield AS, Jen J, Hanash SM, Falconi M, Allen PJ, Zhou S, Bettgowda C, Diaz LA, Jr., Tomasetti C, Kinzler KW, Vogelstein B, Lennon AM, Papadopoulos N. 2018. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*, 359 (6378):926-930.
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian C, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. 2008. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*, 371 (9609):303-314.
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian C, Beral V, Gaitskell K, Hermon C, Moser K, Reeves G, Peto R. 2012. Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis including 28,114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *Lancet Oncol*, 13 (9):946-956.
- Collaborative Group On Epidemiological Studies Of Ovarian C, Beral V, Gaitskell K, Hermon C, Moser K, Reeves G, Peto R. 2015. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *Lancet*, 385 (9980):1835-1842.
- Cramer DW, Bast RC, Jr., Berg CD, Diamandis EP, Godwin AK, Hartge P, Lokshin AE, Lu KH, McIntosh MW, Mor G, Patriotis C, Pinsky PF, Thornquist MD, Scholler N, Skates SJ, Sluss PM, Srivastava S, Ward DC, Zhang Z, Zhu CS, Urban N. 2011. Ovarian cancer biomarker performance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4 (3):365-374.
- Cuellar-Partida G, Lu Y, Dixon SC, Australian Ovarian Cancer S, Fasching PA, Hein A, Burghaus S, Beckmann MW, Lambrechts D, Van Nieuwenhuysen E, Vergote I, Vanderstichele A, Doherty JA, Rossing MA, Chang-Claude J, Rudolph A, Wang-Gohrke S, Goodman MT, Bogdanova N, Dork T, Durst M, Hillemanns P, Runnebaum IB, Antonenkova N, Butzow R, Leminen A, Nevanlinna H, Pelttari LM, Edwards RP, Kelley JL, Modugno F, Moysich KB, Ness RB, Cannioto R, Hogdall E, Hogdall C, Jensen A, Giles GG, Bruinsma F, Kjaer SK, Hildebrandt MA, Liang D, Lu KH, Wu X, Bisogna M, Dao F, Levine DA, Cramer DW, Terry KL, Tworoger SS, Stampfer M, Missmer S, Bjorge L, Salvesen HB, Kopperud RK, Bischof K, Aben KK, Kiemeny LA, Massuger LF, Brooks-Wilson A, Olson SH, McGuire V, Rothstein JH, Sieh W, Whittemore AS, Cook LS, Le ND, Blake Gilks C, Gronwald J, Jakubowska A, Lubinski J, Kluz T, Song H, Tyrer JP, Wentzensen N, Brinton L, Trabert B, Lissowska J, McLaughlin JR, Narod SA, Phelan C, Anton-Culver H, Ziogas A, Eccles D, Campbell I, Gayther SA, Gentry-Maharaj A, Menon U, Ramus SJ, Wu AH, Dansonka-Mieszkowska A, Kupryjanczyk J, Timorek A, Szafron L, Cunningham JM, Fridley BL, Winham SJ, Bandera EV, Poole EM, Morgan TK, Goode EL, Schildkraut JM, Pearce CL, Berchuck A, Pharoah PD, Webb PM, Chenevix-Trench G, Risch HA, MacGregor S. 2016. Assessing the genetic architecture of epithelial ovarian cancer histological subtypes. *Hum Genet*, 135 (7):741-756.
- Dahl E, Klotten V. 2015. [Liquid biopsy analysis using cell-free DNA (cfDNA): Opportunities and limitations]. *Pathologie*, 36 (6):572-578.
- Daugaard I, Dominguez D, Kjeldsen TE, Kristensen LS, Hager H, Wojdacz TK, Hansen LL. 2016. Identification and validation of candidate epigenetic biomarkers in lung adenocarcinoma. *Sci Rep*, 6:35807.
- Davidson B, Trope CG. 2014. Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects. *Womens Health (Lond)*, 10 (5):519-533.
- De Marzo AM, Marchi VL, Yang ES, Veeraswamy R, Lin X, Nelson WG. 1999. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*, 59 (16):3855-3860.
- Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50 (4):227-230.

- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Jr., Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. 2005. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (45):16368-16373.
- Ding N, Bonham EM, Hannon BE, Amick TR, Baylin SB, O'Hagan HM. 2016. Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage. *J Mol Cell Biol*, 8 (3):244-254.
- du Bois A, Pfisterer J, Kellermann L. 2001. Die Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms in Deutschland. *Der Gynäkologe*, 34 (11):1029 - 1040.
- du Bois A, Rochon J, Pfisterer J, Hoskins WJ. 2009a. Variations in institutional infrastructure, physician specialization and experience, and outcome in ovarian cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol*, 112 (2):422-436.
- du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. 2009b. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115 (6):1234-1244.
- Dubeau L. 2008. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol*, 9 (12):1191-1197.
- Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J, Rustin GJ, Soletormos G, Torre GC, Tuxen MK, Zwirner M. 2005. CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer*, 15 (5):679-691.
- Dvorska D, Brany D, Nagy B, Grendar M, Poka R, Soltesz B, Jagelkova M, Zelinova K, Lasabova Z, Zubor P, Dankova Z. 2019. Aberrant Methylation Status of Tumour Suppressor Genes in Ovarian Cancer Tissue and Paired Plasma Samples. *Int J Mol Sci*, 20 (17).
- Earp MA, Cunningham JM. 2015. DNA methylation changes in epithelial ovarian cancer histotypes. *Genomics*, 106 (6):311-321.
- Enjuanes A, Fernandez V, Hernandez L, Navarro A, Bea S, Pinyol M, Lopez-Guillermo A, Rosenwald A, Ott G, Campo E, Jares P. 2011. Identification of methylated genes associated with aggressive clinicopathological features in mantle cell lymphoma. *PLoS One*, 6 (5):e19736.
- Faryna M, Konermann C, Aulmann S, Bermejo JL, Brugger M, Diederichs S, Rom J, Weichenhan D, Claus R, Rehli M, Schirmacher P, Sinn HP, Plass C, Gerhauser C. 2012. Genome-wide methylation screen in low-grade breast cancer identifies novel epigenetically altered genes as potential biomarkers for tumor diagnosis. *FASEB J*, 26 (12):4937-4950.
- Fiegl H, Windbichler G, Mueller-Holzner E, Goebel G, Lechner M, Jacobs IJ, Widschwendter M. 2008. HOXA11 DNA methylation--a novel prognostic biomarker in ovarian cancer. *Int J Cancer*, 123 (3):725-729.
- Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, Klocker H, Goebel G, Widschwendter M. 2005. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res*, 65 (4):1141-1145.
- Flanagan JM, Brook MN, Orr N, Tomczyk K, Coulson P, Fletcher O, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow A, Brown R, Garcia-Closas M. 2015. Temporal stability and determinants of white blood cell DNA methylation in the breakthrough generations study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24 (1):221-229.
- Flanagan JM, Wilson A, Koo C, Masrour N, Gallon J, Loomis E, Flower K, Wilhelm-Benartzi C, Hergovich A, Cunnea P, Gabra H, Braicu EI, Sehouli J, Darb-Esfahani S, Vanderstichele A, Vergote I, Kreuzinger C, Castillo-Tong DC, Wisman GBA, Berns EM, Siddiqui N, Paul J, Brown R. 2017. Platinum-Based Chemotherapy Induces Methylation Changes in Blood DNA Associated with Overall Survival in Patients with Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*, 23 (9):2213-2222.

- Flaum N, Crosbie EJ, Edmondson RJ, Smith MJ, Evans DG. 2020. Epithelial ovarian cancer risk: A review of the current genetic landscape. *Clin Genet*, 97 (1):54-63.
- Force USPST, Grossman DC, Curry SJ, Owens DK, Barry MJ, Davidson KW, Doubeni CA, Epling JW, Jr., Kemper AR, Krist AH, Kurth AE, Landefeld CS, Mangione CM, Phipps MG, Silverstein M, Simon MA, Tseng CW. 2018. Screening for Ovarian Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*, 319 (6):588-594.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (5):1827-1831.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 366 (10):883-892.
- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. 1998. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17 (1):89-97.
- Gloss BS, Samimi G. 2014. Epigenetic biomarkers in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*, 342 (2):257-263.
- Goff B. 2012. Symptoms associated with ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol*, 55 (1):36-42.
- Gong TT, Wu QJ, Vogtmann E, Lin B, Wang YL. 2013. Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*, 132 (12):2894-2900.
- Gozzi G, Chelbi ST, Manni P, Alberti L, Fonda S, Saponaro S, Fabbiani L, Rivasi F, Benhattar J, Losi L. 2016. Promoter methylation and downregulated expression of the TBX15 gene in ovarian carcinoma. *Oncol Lett*, 12 (4):2811-2819.
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. 2001. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res*, 29 (13):E65-65.
- Grzywa TM, Paskal W, Wlodarski PK. 2017. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl Oncol*, 10 (6):956-975.
- Gupta D, Lis CG. 2009. Role of CA125 in predicting ovarian cancer survival - a review of the epidemiological literature. *J Ovarian Res*, 2:13.
- Hafner N, Diebolder H, Jansen L, Hoppe I, Durst M, Runnebaum IB. 2011. Hypermethylated DAPK in serum DNA of women with uterine leiomyoma is a biomarker not restricted to cancer. *Gynecol Oncol*, 121 (1):224-229.
- Hafner N, Steinbach D, Jansen L, Diebolder H, Durst M, Runnebaum IB. 2016. RUNX3 and CAMK2N1 hypermethylation as prognostic marker for epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 138 (1):217-228.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5):646-674.
- Harter P, Hauke J, Heitz F, Reuss A, Kommoss S, Marme F, Heimbach A, Prieske K, Richters L, Burges A, Neidhardt G, de Gregorio N, El-Balat A, Hilpert F, Meier W, Kimmig R, Kast K, Sehouli J, Baumann K, Jackisch C, Park-Simon TW, Hanker L, Krober S, Pfisterer J, Gevensleben H, Schnelzer A, Dietrich D, Neunhoffer T, Krockenberger M, Brucker SY, Nurnberg P, Thiele H, Altmuller J, Lamla J, Elser G, du Bois A, Hahnen E, Schmutzler R. 2017. Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS One*, 12 (10):e0186043.
- Hauptmann S, du Bois A, Meinhold-Herlein I, Pfisterer J, Avril S. 2014. [Histological grading of epithelial ovarian cancer. Review and recommendation]. *Pathologe*, 35 (5):497-503.
- Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S, Beller U. 2006. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 95 Suppl 1:S161-192.

- Hengen PN. 1996. Carriers for precipitating nucleic acids. *Trends Biochem Sci*, 21 (6):224-225.
- Hervouet E, Peixoto P, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M, Cartron PF. 2018. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clin Epigenetics*, 10:17.
- Huang H, Li YJ, Lan CY, Huang QD, Feng YL, Huang YW, Liu JH. 2013a. Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *Neoplasma*, 60 (5):546-552.
- Huang LL, Zhang Y, Zhang JX, He LJ, Lai YR, Liao YJ, Tian XP, Deng HX, Liang YJ, Kung HF, Xie D, Zhu SL. 2015. Overexpression of NKX6.1 is closely associated with progressive features and predicts unfavorable prognosis in human primary hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*, 36 (6):4405-4415.
- Huang RL, Su PH, Liao YP, Wu TI, Hsu YT, Lin WY, Wang HC, Weng YC, Ou YC, Huang TH, Lai HC. 2017. Integrated Epigenomics Analysis Reveals a DNA Methylation Panel for Endometrial Cancer Detection Using Cervical Scrapings. *Clin Cancer Res*, 23 (1):263-272.
- Huang RL, Gu F, Kirma NB, Ruan J, Chen CL, Wang HC, Liao YP, Chang CC, Yu MH, Pilrose JM, Thompson IM, Huang HC, Huang TH, Lai HC, Nephew KP. 2013b. Comprehensive methylome analysis of ovarian tumors reveals hedgehog signaling pathway regulators as prognostic DNA methylation biomarkers. *Epigenetics*, 8 (6):624-634.
- IARC. 1999. Hormonal Contraception and Post-menopausal Hormonal Therapy. International Agency for Research on Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 72:156 - 168.
- Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, Herman JG, Dulaimi E, Edelson MI, Bergman C, Ehya H, Eisenberg BL, Cairns P. 2004. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res*, 64 (18):6476-6481.
- Ishizawa M, Kobayashi Y, Miyamura T, Matsuura S. 1991. Simple procedure of DNA isolation from human serum. *Nucleic Acids Res*, 19 (20):5792.
- Jacobs IJ, Menon U. 2004. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics*, 3 (4):355-366.
- Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi JK, Amso NN, Apostolidou S, Benjamin E, Cruickshank D, Crump DN, Davies SK, Dawnay A, Dobbs S, Fletcher G, Ford J, Godfrey K, Gunu R, Habib M, Hallett R, Herod J, Jenkins H, Karpinskyj C, Leeson S, Lewis SJ, Liston WR, Lopes A, Mould T, Murdoch J, Oram D, Rabideau DJ, Reynolds K, Scott I, Seif MW, Sharma A, Singh N, Taylor J, Warburton F, Widschwendter M, Williamson K, Woolas R, Fallowfield L, McGuire AJ, Campbell S, Parmar M, Skates SJ. 2016. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*, 387 (10022):945-956.
- Jeong S, Liang G, Sharma S, Lin JC, Choi SH, Han H, Yoo CB, Egger G, Yang AS, Jones PA. 2009. Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol Cell Biol*, 29 (19):5366-5376.
- Jiang P, Lo YMD. 2016. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet*, 32 (6):360-371.
- Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. 2015. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*, 14 (6):924-932.
- Jones PA, Baylin SB. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3 (6):415-428.
- Ju HX, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Shimizu Y, Sano T, Sawaki A, Tajika M, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Ito H, Takeuchi I, Sekido Y, Kondo Y. 2011. Distinct profiles of epigenetic evolution between colorectal cancers with and without metastasis. *Am J Pathol*, 178 (4):1835-1846.
- Kader F, Ghai M. 2017. DNA methylation-based variation between human populations. *Mol Genet Genomics*, 292 (1):5-35.

- Kalia M. 2015. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism*, 64 (3 Suppl 1):S16-21.
- Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, Baldwin MF, Han LY, Lin YG, Merritt WM, Landen CN, Jr., Lu C, Gershenson DM, Simpson JL, Sood AK. 2006. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 5 (10):1369-1374.
- Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D, Han LY, Godwin A, Karlan BY, Simpson JL, Gershenson DM, Coleman RL, Bischoff FZ, Sood AK. 2010. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer*, 116 (8):1918-1925.
- Keita M, Wang ZQ, Pelletier JF, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Mes-Masson AM, Paquet ER, Bachvarov D. 2013. Global methylation profiling in serous ovarian cancer is indicative for distinct aberrant DNA methylation signatures associated with tumor aggressiveness and disease progression. *Gynecol Oncol*, 128 (2):356-363.
- Kim HJ, Kim CY, Jin J, Bae MK, Kim YH, Ju W, Kim YH, Kim SC. 2018. Aberrant single-minded homolog 1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Diagn Cytopathol*, 46 (1):15-21.
- Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S, Lee S. 2014. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res*, 86 (3):136-142.
- Kint S, De Spiegelaere W, De Kesel J, Vandekerckhove L, Van Criekinge W. 2018. Evaluation of bisulfite kits for DNA methylation profiling in terms of DNA fragmentation and DNA recovery using digital PCR. *PLoS One*, 13 (6):e0199091.
- Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. 2016. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res*, 76 (12):3446-3450.
- Kobayashi E, Ueda Y, Matsuzaki S, Yokoyama T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M, Kimura T, Enomoto T. 2012. Biomarkers for screening, diagnosis, and monitoring of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21 (11):1902-1912.
- Kobayashi H, Yamada Y, Sado T, Sakata M, Yoshida S, Kawaguchi R, Kanayama S, Shigetomi H, Haruta S, Tsuji Y, Ueda S, Kitanaka T. 2008. A randomized study of screening for ovarian cancer: a multicenter study in Japan. *Int J Gynecol Cancer*, 18 (3):414-420.
- Koukoura O, Spandidos DA, Daponte A, Sifakis S. 2014. DNA methylation profiles in ovarian cancer: implication in diagnosis and therapy (Review). *Mol Med Rep*, 10 (1):3-9.
- Krimmel JD, Schmitt MW, Harrell MI, Agnew KJ, Kennedy SR, Emond MJ, Loeb LA, Swisher EM, Risques RA. 2016. Ultra-deep sequencing detects ovarian cancer cells in peritoneal fluid and reveals somatic TP53 mutations in noncancerous tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (21):6005-6010.
- Kristensen LS, Hansen LL. 2009. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin Chem*, 55 (8):1471-1483.
- Kron K, Liu L, Trudel D, Pethe V, Trachtenberg J, Fleshner N, Bapat B, van der Kwast T. 2012. Correlation of ERG expression and DNA methylation biomarkers with adverse clinicopathologic features of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 18 (10):2896-2904.
- Kurman RJ, Shih Ie M. 2011. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*, 42 (7):918-931.
- Kurman RJ, Shih Ie M. 2016. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*, 186 (4):733-747.
- Lai HC, Lin YW, Huang TH, Yan P, Huang RL, Wang HC, Liu J, Chan MW, Chu TY, Sun CA, Chang CC, Yu MH. 2008. Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *Int J Cancer*, 123 (1):161-167.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*, (62).

- Leitlinienprogramm Onkologie. 2020. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 4.0 Berlin: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF.
- Li HJ, Yu PN, Huang KY, Su HY, Hsiao TH, Chang CP, Yu MH, Lin YW. 2016. NKX6.1 functions as a metastatic suppressor through epigenetic regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 35 (17):2266-2278.
- Liggett TE, Melnikov A, Yi Q, Replogle C, Hu W, Rotmensch J, Kamat A, Sood AK, Levenson V. 2011. Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecol Oncol*, 120 (1):113-120.
- Lin PC, Giannopoulou EG, Park K, Mosquera JM, Sboner A, Tewari AK, Garraway LA, Beltran H, Rubin MA, Elemento O. 2013. Epigenomic alterations in localized and advanced prostate cancer. *Neoplasia*, 15 (4):373-383.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4):402-408.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350 (9076):485-487.
- Luan NN, Wu QJ, Gong TT, Vogtmann E, Wang YL, Lin B. 2013. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 98 (4):1020-1031.
- Lund RJ, Huhtinen K, Salmi J, Rantala J, Nguyen EV, Moulder R, Goodlett DR, Lahesmaa R, Carpen O. 2017. DNA methylation and Transcriptome Changes Associated with Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer. *Sci Rep*, 7 (1):1469.
- Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Takaki E, Nakai A, Sugino N. 2013. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One*, 8 (6):e66632.
- Mahapatra S, Klee EW, Young CY, Sun Z, Jimenez RE, Klee GG, Tindall DJ, Donkena KV. 2012. Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 18 (10):2882-2895.
- Mandel P, Metais P. 1948. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*, 142 (3-4):241-243.
- Mathieu KB, Bedi DG, Thrower SL, Qayyum A, Bast RC, Jr. 2018. Screening for ovarian cancer: imaging challenges and opportunities for improvement. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 51 (3):293-303.
- Mavaddat N, Peock S, Frost D, Ellis S, Platte R, Fineberg E, Evans DG, Izatt L, Eeles RA, Adlard J, Davidson R, Eccles D, Cole T, Cook J, Brewer C, Tischkowitz M, Douglas F, Hodgson S, Walker L, Porteous ME, Morrison PJ, Side LE, Kennedy MJ, Houghton C, Donaldson A, Rogers MT, Dorkins H, Miedzybrodzka Z, Gregory H, Eason J, Barwell J, McCann E, Murray A, Antoniou AC, Easton DF, Embrace. 2013. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*, 105 (11):812-822.
- Mazor T, Pankov A, Song JS, Costello JF. 2016. Intratumoral Heterogeneity of the Epigenome. *Cancer Cell*, 29 (4):440-451.
- McCluggage WG. 2011. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology*, 43 (5):420-432.
- Meinhold-Heerlein I, Hauptmann S. 2014. The heterogeneity of ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 289 (2):237-239.
- Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, Hauptmann S, Sehoul J, Kommission Ovar of the AGO. 2015. Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 75 (10):1021-1027.
- Melnikov A, Scholtens D, Godwin A, Levenson V. 2009. Differential methylation profile of ovarian cancer in tissues and plasma. *J Mol Diagn*, 11 (1):60-65.

- Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, Cao L. 2015. DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci*, 11 (5):604-617.
- Menon U, Griffin M, Gentry-Maharaj A. 2014. Ovarian cancer screening--current status, future directions. *Gynecol Oncol*, 132 (2):490-495.
- Meunier D, Patra K, Smits R, Hagebarth A, Luttges A, Jaussi R, Wieduwilt MJ, Quintanilla-Fend L, Himmelbauer H, Fodde R, Fundele RH. 2011. Expression analysis of proline rich 15 (Prr15) in mouse and human gastrointestinal tumors. *Mol Carcinog*, 50 (1):8-15.
- Micci F, Haugom L, Abeler VM, Davidson B, Trope CG, Heim S. 2014. Genomic profile of ovarian carcinomas. *BMC Cancer*, 14:315.
- Michaelson-Cohen R, Keshet I, Straussman R, Hecht M, Cedar H, Beller U. 2011. Genome-wide de novo methylation in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 21 (2):269-279.
- Mitchell SM, Ross JP, Drew HR, Ho T, Brown GS, Saunders NF, Duesing KR, Buckley MJ, Dunne R, Beetson I, Rand KN, McEvoy A, Thomas ML, Baker RT, Wattchow DA, Young GP, Lockett TJ, Pedersen SK, Lapointe LC, Molloy PL. 2014. A panel of genes methylated with high frequency in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 14:54.
- Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, Ushijima T. 2005. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer*, 116 (3):407-414.
- Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, Lisyanskaya A, Floquet A, Leary A, Sonke GS, Gourley C, Banerjee S, Oza A, Gonzalez-Martin A, Aghajanian C, Bradley W, Mathews C, Liu J, Lowe ES, Bloomfield R, DiSilvestro P. 2018. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*, 379 (26):2495-2505.
- Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, Steinhoff M, Messerlian G, DiSilvestro P, Granai CO, Bast RC, Jr. 2008. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*, 108 (2):402-408.
- Mouliere F, Rosenfeld N. 2015. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (11):3178-3179.
- Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR. 2011. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*, 6 (9):e23418.
- Muller HM, Millinger S, Fiegl H, Goebel G, Ivarsson L, Widschwendter A, Muller-Holzner E, Marth C, Widschwendter M. 2004. Analysis of methylated genes in peritoneal fluids of ovarian cancer patients: a new prognostic tool. *Clin Chem*, 50 (11):2171-2173.
- Navarro A, Yin P, Monsivais D, Lin SM, Du P, Wei JJ, Bulun SE. 2012. Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma. *PLoS One*, 7 (3):e33284.
- Naz S, Hashmi AA, Ali R, Faridi N, Hussian SD, Edhi MM, Khan M. 2015. Role of peritoneal washing cytology in ovarian malignancies: correlation with histopathological parameters. *World J Surg Oncol*, 13:315.
- Ness RB, Cottreau C. 1999. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 91 (17):1459-1467.
- Nikolaev S, Lemmens L, Koessler T, Blouin JL, Nospikel T. 2018. Circulating tumoral DNA: Preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory. *Anal Biochem*, 542:34-39.
- Nossov V, Amneus M, Su F, Lang J, Janco JM, Reddy ST, Farias-Eisner R. 2008. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *Am J Obstet Gynecol*, 199 (3):215-223.
- Oishi T, Iino K, Okawa Y, Kakizawa K, Matsunari S, Yamashita M, Taniguchi T, Maekawa M, Suda T, Oki Y. 2017. DNA methylation analysis in malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *J Clin Transl Endocrinol*, 7:12-20.

- Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolahdooz F, Webb PM. 2007. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 43 (4):690-709.
- Parrella P, Zangen R, Sidransky D, Nicol T. 2003. Molecular analysis of peritoneal fluid in ovarian cancer patients. *Mod Pathol*, 16 (7):636-640.
- Partridge E, Kreimer AR, Greenlee RT, Williams C, Xu JL, Church TR, Kessel B, Johnson CC, Weissfeld JL, Isaacs C, Andriole GL, Ogden S, Ragard LR, Buys SS, Team PP. 2009. Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial. *Obstet Gynecol*, 113 (4):775-782.
- Pfisterer J, du Bois A. 2002. *Das Ovarialkarzinom: Therapeutische Standards - klinische Empfehlungen*. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag, 1-49.
- Pieta B, Chmaj-Wierzchowska K, Opala T. 2012. Past obstetric history and risk of ovarian cancer. *Ann Agric Environ Med*, 19 (3):385-388.
- Pinsky PF, Yu K, Kramer BS, Black A, Buys SS, Partridge E, Gohagan J, Berg CD, Prorok PC. 2016. Extended mortality results for ovarian cancer screening in the PLCO trial with median 15years follow-up. *Gynecol Oncol*, 143 (2):270-275.
- Prat J. 2012. New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol*, 23 Suppl 10:x111-117.
- Qu L, Deng B, Zeng Y, Cao Z. 2014. Decreased expression of the Nkx2.8 gene correlates with tumor progression and a poor prognosis in HCC cancer. *Cancer Cell Int*, 14:28.
- Rahmatpanah FB, Carstens S, Guo J, Sjahputera O, Taylor KH, Duff D, Shi H, Davis JW, Hooshmand SI, Chitma-Matsiga R, Caldwell CW. 2006. Differential DNA methylation patterns of small B-cell lymphoma subclasses with different clinical behavior. *Leukemia*, 20 (10):1855-1862.
- Rauch TA, Pfeifer GP. 2009. The MIRA method for DNA methylation analysis. *Methods Mol Biol*, 507:65-75.
- Reade CJ, Riva JJ, Busse JW, Goldsmith CH, Elit L. 2013. Risks and benefits of screening asymptomatic women for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 130 (3):674-681.
- Redshaw N, Huggett JF, Taylor MS, Foy CA, Devonshire AS. 2014. Quantification of epigenetic biomarkers: an evaluation of established and emerging methods for DNA methylation analysis. *BMC Genomics*, 15:1174.
- Reyes HD, Devor EJ, Warriar A, Newton AM, Mattson J, Wagner V, Duncan GN, Leslie KK, Gonzalez-Bosquet J. 2019. Differential DNA methylation in high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) is associated with tumor behavior. *Sci Rep*, 9 (1):17996.
- RKI, GEKID. 2019. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. Berlin: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. 1999. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, 27 (11):2291-2298.
- Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. 2016. *Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment*. *Int J Mol Sci*, 17 (12).
- Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. 2001. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*, 20 (24):3156-3165.
- Runnebaum IB, Stickeler E. 2001. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127 (2):73-79.
- Saah AJ, Hoover DR. 1997. "Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Ann Intern Med*, 126 (1):91-94.
- Saheb A, Patterson S, Josowicz M. 2014. Probing for DNA methylation with a voltammetric DNA detector. *Analyst*, 139 (4):786-792.
- Saini A, Pershad Y, Albadawi H, Kuo M, Alzubaidi S, Naidu S, Knuttinen MG, Oklu R. 2018. Liquid Biopsy in Gastrointestinal Cancers. *Diagnostics (Basel)*, 8 (4).

- Sakane J, Taniyama K, Miyamoto K, Saito A, Kuraoka K, Nishimura T, Sentani K, Oue N, Yasui W. 2015. Aberrant DNA methylation of DLX4 and SIM1 is a predictive marker for disease progression of uterine cervical low-grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol*, 43 (6):462-470.
- Salazar C, Campbell IG, Gorringer KL. 2018. When Is "Type I" Ovarian Cancer Not "Type I"? Indications of an Out-Dated Dichotomy. *Front Oncol*, 8:654.
- Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U, Conteduca V, Tedaldi G, Calistri D, Casadio V. 2016. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther*, 9:6549-6559.
- Sato S, Maekawa R, Yamagata Y, Tamura I, Lee L, Okada M, Jozaki K, Asada H, Tamura H, Sugino N. 2016. Identification of uterine leiomyoma-specific marker genes based on DNA methylation and their clinical application. *Sci Rep*, 6:30652.
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (5):1412-1417.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 11 (6):426-437.
- Shao X, He Y, Ji M, Chen X, Qi J, Shi W, Hao T, Ju S. 2015. Quantitative analysis of cell-free DNA in ovarian cancer. *Oncol Lett*, 10 (6):3478-3482.
- Sharma S, De Carvalho DD, Jeong S, Jones PA, Liang G. 2011. Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance. *PLoS Genet*, 7 (2):e1001286.
- Shen H, Fridley BL, Song H, Lawrenson K, Cunningham JM, Ramus SJ, Cicek MS, Tyrer J, Stram D, Larson MC, Kobel M, Consortium P, Ziogas A, Zheng W, Yang HP, Wu AH, Wozniak EL, Woo YL, Winterhoff B, Wik E, Whittemore AS, Wentzensen N, Weber RP, Vitonis AF, Vincent D, Vierkant RA, Vergote I, Van Den Berg D, Van Altena AM, Tworoger SS, Thompson PJ, Tessier DC, Terry KL, Teo SH, Templeman C, Stram DO, Southey MC, Sieh W, Siddiqui N, Shvetsov YB, Shu XO, Shridhar V, Wang-Gohrke S, Severi G, Schwaab I, Salvesen HB, Rzepecka IK, Runnebaum IB, Rossing MA, Rodriguez-Rodriguez L, Risch HA, Renner SP, Poole EM, Pike MC, Phelan CM, Pelttari LM, Pejovic T, Paul J, Orlow I, Omar SZ, Olson SH, Odunsi K, Nickels S, Nevanlinna H, Ness RB, Narod SA, Nakanishi T, Moysich KB, Monteiro AN, Moes-Sosnowska J, Modugno F, Menon U, McLaughlin JR, McGuire V, Matsuo K, Adenan NA, Massuger LF, Lurie G, Lundvall L, Lubinski J, Lissowska J, Levine DA, Leminin A, Lee AW, Le ND, Lambrechts S, Lambrechts D, Kupryjanczyk J, Krakstad C, Konecny GE, Kjaer SK, Kiemeny LA, Kelemen LE, Keeney GL, Karlan BY, Karevan R, Kalli KR, Kajiyama H, Ji BT, Jensen A, Jakubowska A, Iversen E, Hosono S, Hogdall CK, Hogdall E, Hoatlin M, Hillemanns P, Heitz F, Hein R, Harter P, Halle MK, Hall P, Gronwald J, Gore M, Goodman MT, Giles GG, Gentry-Maharaj A, Garcia-Closas M, Flanagan JM, Fasching PA, Ekici AB, Edwards R, Eccles D, Easton DF, Durst M, du Bois A, Dork T, Doherty JA, Despierre E, Dansonka-Mieszkowska A, Cybulski C, Cramer DW, Cook LS, Chen X, Charbonneau B, Chang-Claude J, Campbell I, Butzow R, Bunker CH, Brueggmann D, Brown R, Brooks-Wilson A, Brinton LA, Bogdanova N, Block MS, Benjamin E, Beesley J, Beckmann MW, Bandera EV, Baglietto L, Bacot F, Armasu SM, Antonenkova N, Anton-Culver H, Aben KK, Liang D, Wu X, Lu K, Hildebrandt MA, Australian Ovarian Cancer Study G, Australian Cancer S, Schildkraut JM, Sellers TA, Huntsman D, Berchuck A, Chenevix-Trench G, Gayther SA, Pharoah PD, Laird PW, Goode EL, Pearce CL. 2013. Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat Commun*, 4:1628.
- Shi H, Li Y, Wang X, Lu C, Yang L, Gu C, Xiong J, Huang Y, Wang S, Lu M. 2013. Association between RASSF1A promoter methylation and ovarian cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, 8 (10):e76787.

- Shih Ie M, Kurman RJ. 2004. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*, 164 (5):1511-1518.
- Singh A, Gupta S, Sachan M. 2019. Epigenetic Biomarkers in the Management of Ovarian Cancer: Current Prospectives. *Front Cell Dev Biol*, 7:182.
- Smith HJ, Straughn JM, Buchsbaum DJ, Arend RC. 2017. Epigenetic therapy for the treatment of epithelial ovarian cancer: A clinical review. *Gynecol Oncol Rep*, 20:81-86.
- Stiekema A, Lok CA, Kenter GG, van Driel WJ, Vincent AD, Korse CM. 2014. A predictive model combining human epididymal protein 4 and radiologic features for the diagnosis of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 132 (3):573-577.
- Strathdee G, Appleton K, Illand M, Millan DW, Sargent J, Paul J, Brown R. 2001. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am J Pathol*, 158 (3):1121-1127.
- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. 2001. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*, 313 (1-2):139-142.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. 1989. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46 (5):318-322.
- Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. 2000. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*, 906:161-168.
- Suehiro Y, Hashimoto S, Higaki S, Fujii I, Suzuki C, Hoshida T, Matsumoto T, Yamaoka Y, Takami T, Sakaida I, Yamasaki T. 2018. Blood free-circulating DNA testing by highly sensitive methylation assay to diagnose colorectal neoplasias. *Oncotarget*, 9 (24):16974-16987.
- Sun XX, Yu Q. 2015. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. *Acta Pharmacol Sin*, 36 (10):1219-1227.
- Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*, 3:9-16.
- Swisher EM, Wollan M, Mahtani SM, Willner JB, Garcia R, Goff BA, King MC. 2005. Tumor-specific p53 sequences in blood and peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 193 (3 Pt 1):662-667.
- Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, Kannall HD, Smyth C, Curto J, Siddiqui N, Gabra H, McLeod HL, Strathdee G, Brown R. 2005. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer Res*, 65 (19):8961-8967.
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (15):8681-8686.
- Trabert B, Tworoger SS, O'Brien KM, Townsend MK, Fortner RT, Iversen ES, Hartge P, White E, Amiano P, Arslan AA, Bernstein L, Brinton LA, Buring JE, Dossus L, Fraser GE, Gaudet MM, Giles GG, Gram IT, Harris HR, Bolton JH, Idahl A, Jones ME, Kaaks R, Kirsh VA, Knutsen SF, Kvaskoff M, Lacey JV, Lee IM, Milne RL, Onland-Moret NC, Overvad K, Patel AV, Peters U, Poynter JN, Riboli E, Robien K, Rohan TE, Sandler DP, Schairer C, Schouten LJ, Setiawan VW, Swerdlow AJ, Travis RC, Trichopoulou A, van den Brandt PA, Visvanathan K, Wilkens LR, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Wentzensen N, Ovarian Cancer Cohort C. 2020. The Risk of Ovarian Cancer Increases with an Increase in the Lifetime Number of Ovulatory Cycles: An Analysis from the Ovarian Cancer Cohort Consortium (OC3). *Cancer Res*, 80 (5):1210-1218.
- Tsilidis KK, Allen NE, Key TJ, Dossus L, Lukanova A, Bakken K, Lund E, Fournier A, Overvad K, Hansen L, Tjonneland A, Fedirko V, Rinaldi S, Romieu I, Clavel-Chapelon F, Engel P, Kaaks R, Schutze M, Steffen A, Bamia C, Trichopoulou A, Zylis D, Masala G, Pala V, Galasso R, Tumino R, Sacerdote C, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Braem MG, Onland-Moret NC, Gram IT, Rodriguez L, Travier N, Sanchez MJ, Huerta JM,

- Ardanaz E, Larranaga N, Jirstrom K, Manjer J, Idahl A, Ohlson N, Khaw KT, Wareham N, Mouw T, Norat T, Riboli E. 2011. Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer*, 105 (9):1436-1442.
- Um SW, Kim Y, Lee BB, Kim D, Lee KJ, Kim HK, Han J, Kim H, Shim YM, Kim DH. 2018. Genome-wide analysis of DNA methylation in bronchial washings. *Clin Epigenetics*, 10:65.
- Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, Gligorich KM, Rostomily RC, Bronner MP, Shendure J. 2016. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet*, 12 (7):e1006162.
- van Nagell JR, Jr., Miller RW, DeSimone CP, Ueland FR, Podzielinski I, Goodrich ST, Elder JW, Huang B, Kryscio RJ, Pavlik EJ. 2011. Long-term survival of women with epithelial ovarian cancer detected by ultrasonographic screening. *Obstet Gynecol*, 118 (6):1212-1221.
- Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Jr., Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, Coukos G, Crum CC, Drapkin R, Etamadmoghadam D, Friedlander M, Gabra H, Kaye SB, Lord CJ, Lengyel E, Levine DA, McNeish IA, Menon U, Mills GB, Nephew KP, Oza AM, Sood AK, Stronach EA, Walczak H, Bowtell DD, Balkwill FR. 2011. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer*, 11 (10):719-725.
- Visintin I, Feng Z, Longton G, Ward DC, Alvero AB, Lai Y, Tenthorey J, Leiser A, Flores-Saaib R, Yu H, Azori M, Rutherford T, Schwartz PE, Mor G. 2008. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 14 (4):1065-1072.
- Vlahos NF, Theodoridis TD, Partsinevelos GA. 2017. Myomas and Adenomyosis: Impact on Reproductive Outcome. *Biomed Res Int*, 2017:5926470.
- Vymetalkova V, Cervena K, Bartu L, Vodicka P. 2018. Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*, 19 (11).
- Wang J, Gao J, Yao H, Wu Z, Wang M, Qi J. 2014. Diagnostic accuracy of serum HE4, CA125 and ROMA in patients with ovarian cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*, 35 (6):6127-6138.
- Wang YQ, Yan Q, Zhang JR, Li SD, Yang YX, Wan XP. 2013. Epigenetic inactivation of BRCA1 through promoter hypermethylation in ovarian cancer progression. *J Obstet Gynaecol Res*, 39 (2):549-554.
- Watts GS, Futscher BW, Holtan N, Degeest K, Domann FE, Rose SL. 2008. DNA methylation changes in ovarian cancer are cumulative with disease progression and identify tumor stage. *BMC Med Genomics*, 1:47.
- Wilbur MA, Shih IM, Segars JH, Fader AN. 2017. Cancer Implications for Patients with Endometriosis. *Semin Reprod Med*, 35 (1):110-116.
- Wu X, Rauch TA, Zhong X, Bennett WP, Latif F, Krex D, Pfeifer GP. 2010. CpG island hypermethylation in human astrocytomas. *Cancer Res*, 70 (7):2718-2727.
- Yang CM, Wang TH, Chen HC, Li SC, Lee MC, Liou HH, Liu PF, Tseng YK, Shiue YL, Ger LP, Tsai KW. 2016. Aberrant DNA hypermethylation-silenced SOX21-AS1 gene expression and its clinical importance in oral cancer. *Clin Epigenetics*, 8:129.
- Yang-Hartwich Y, Gurrea-Soteras M, Sumi N, Joo WD, Holmberg JC, Craveiro V, Alvero AB, Mor G. 2014. Ovulation and extra-ovarian origin of ovarian cancer. *Sci Rep*, 4:6116.
- Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, Irizarry RA, Morgan J, Hicks J, DeWeese TL, Isaacs WB, Bova GS, De Marzo AM, Nelson WG. 2008. DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res*, 68 (21):8954-8967.
- Yeung TL, Leung CS, Yip KP, Au Yeung CL, Wong ST, Mok SC. 2015. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 309 (7):C444-456.

- Yu M, Carter KT, Makar KW, Vickers K, Ulrich CM, Schoen RE, Brenner D, Markowitz SD, Grady WM. 2015. MethyLight droplet digital PCR for detection and absolute quantification of infrequently methylated alleles. *Epigenetics*, 10 (9):803-809.
- Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong X. 2008. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol*, 112 (4):843-850.
- Zhang B, Cai FF, Zhong XY. 2011. An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 158 (2):119-123.
- Zhang Q, Hu G, Yang Q, Dong R, Xie X, Ma D, Shen K, Kong B. 2013. A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA. *Gynecol Oncol*, 130 (1):132-139.
- Zhao WC, Bi FF, Li D, Yang Q. 2015. Incidence and clinical characteristics of unexpected uterine sarcoma after hysterectomy and myomectomy for uterine fibroids: a retrospective study of 10,248 cases. *Onco Targets Ther*, 8:2943-2948.
- Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z, Zuo M, Chen A. 2016. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11 (6):e0155495.
- Zhu J, Wu G, Song L, Cao L, Tan Z, Tang M, Li Z, Shi D, Zhang S, Li J. 2019. NKX2-8 deletion-induced reprogramming of fatty acid metabolism confers chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *EBioMedicine*, 43:238-252.
- Zuna RE, Behrens A. 1996. Peritoneal washing cytology in gynecologic cancers: long-term follow-up of 355 patients. *J Natl Cancer Inst*, 88 (14):980-987.

Anhang

Anhang Tabellen

Anhang Tab. I: Literaturverzeichnis der untersuchten Kandidatengene

Kandidatengene für die Etablierung der qMSP wurden anhand frei zugänglicher Datenbanken recherchiert und ausgewählt. Im Folgenden werden die wesentlichen Publikationen genannt, die zur Auswahl der Kandidatengene beigetragen haben.

Kandidatengen	MSP-Primer	Literatur
NKX2-8 (NK2 Homeobox 8)	NKX2-8	(Qu et al. 2014)
NKX6-1 (NK6 Homeobox 1)	NKX6-1	(Lai et al. 2008, Wu et al. 2010, Huang et al. 2015)
NR2F2 (Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2)	NR2F2	(Bell et al. 2011, Enjuanes et al. 2011)
POU3F3 (POU Class 3 Homeobox 3)	POU3F3 (a), POU3F3 (b)	(Rahmatpanah et al. 2006, Bell et al. 2011, Mahapatra et al. 2012)
PRR15 (Proline-Rich 15)	PRR15	(Meunier et al. 2011, Um et al. 2018)
SIM1 (SIM bHLH Transcription Factor 1)	SIM1	(Miyamoto et al. 2005, Faryna et al. 2012, Sakane et al. 2015, Daugaard et al. 2016, Kim et al. 2018)
SOX21 (SRY-Box 21)	SOX21	(Mitchell et al. 2014, Yang et al. 2016)
SPAG6 (Sperm-Associated Antigen 6)	SPAG6	(Altenberger et al. 2017)
SV2C (Synaptic Vesicle Glycoprotein 2C)	SV2C	(Bandala et al. 2012)
TBX15 (T-Box 15)	TBX15	(Kron et al. 2012, Gozzi et al. 2016, Um et al. 2018)

Anhang Tab. II: Spezifikation des Etablierungsprobensets (n=65)

Einteilung der Proben in die Gruppen benigne Erkrankungen (n=22), maligne Erkrankungen (n=24), Borderline-Tumore (n=1) und OvCa (n=18). Neben Diagnose, FIGO-Stadium, Histologie und Zytologie ist das Alter zum Zeitpunkt der Operation sowie die Herkunft der Bauchraumflüssigkeit angegeben. Ca = Karzinom, BT = Borderline-Tumor, Nr. = Nummer, k.A. = keine Angabe, i.d. = in der, endometr. = endometrioid

Nr.	Diagnose	Gruppe	FIGO-Stadium	Histologie	Zytologie-Gruppe	Alter	Bauchraumflüssigkeit
394	Myom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	43	Aszites
407	Myom	benigne	k.A.	k.A.	I + II	38	Douglasspülung
569	Myom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	39	Douglasspülung
580	Myom	benigne	k.A.	k.A.	I + II	62	Spülzytologie
585	Myom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	48	Spülzytologie
589	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	23	Spülzytologie
594	Corpus luteum, Endometriom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	37	Douglaspunktat
632	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	I + II	47	Spülzytologie
698	Zystadenofibrom	benigne	k.A.	k.A.	I + II	84	Aszites
727	Myom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	46	Spülzytologie
747	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	54	Spülzytologie
756	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	II	55	Spülzytologie
757	Serometra i.d. Postmenopause	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	66	Spülzytologie
759	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	IV	30	Spülzytologie
761	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	14	Spülzytologie
775	Endometr. Hyperplasie	benigne	k.A.	k.A.	II	76	Spülzytologie
846	Ovar-Reimplantation	benigne	k.A.	k.A.	I + II	43	Spülzytologie

Nr. (Fs.)	Diagnose	Gruppe	FIGO-Stadium	Histologie	Zytologie-Gruppe	Alter	Bauchraum-flüssigkeit
876	Multiple peritoneale Zysten	benigne	k.A.	k.A.	III	55	Flüssigkeit Abdomen
879	Uterus myomatosus	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	61	Spülzytologie
880	Myom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	50	Spülzytologie
906	Leberzirrhose	benigne	k.A.	k.A.	I + II	52	Aszites
909	Myom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	48	Spülzytologie
388	Keimzelltumor (Dysgerminom)	maligne	k.A.	k.A.	I + II	22	Aszites
409	Sarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	73	Bauchspülung
410	Keimzelltumor (Dysgerminom)	maligne	k.A.	k.A.	I + II	22	Spülzytologie
411	Sarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	44	Aszites
419	Sarkom	maligne	k.A.	k.A.	IV	82	Aszites
563	Leiomyosarkom	maligne	k.A.	k.A.	IV	83	Spülzytologie
586	endometr. Stromasarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	45	Spülzytologie
600	Endometrium-Ca, Karzinosarkom, Müller-Mischtumor	maligne	k.A.	k.A.	I + II	83	Spülzytologie
630	Vulva-Ca	maligne	k.A.	k.A.	I + II	62	Spülzytologie
633	Keimzelltumor (Dysgerminom)	maligne	k.A.	k.A.	I + II	45	Spülzytologie
637	Leiomyosarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	45	Spülzytologie
695	Granulosazelltumor	maligne	k.A.	k.A.	k.A.	71	Spülzytologie
719	Ovarialtumor, muzinöses Zystadenom	maligne	k.A.	k.A.	k.A.	61	Spülzytologie
847	Zervix-Ca	maligne	k.A.	k.A.	I + II	44	Spülzytologie
848	Vaginal-Ca	maligne	k.A.	k.A.	I + II	73	Spülzytologie
849	Endometrium-Ca	maligne	k.A.	k.A.	I + II	55	Spülzytologie
853	Endometrium-Ca	maligne	k.A.	k.A.	I + II	64	Spülzytologie
854	Zervix-Ca	maligne	k.A.	k.A.	I + II	60	Spülzytologie
882	Endometrium-Ca	maligne	k.A.	k.A.	III	75	Spülzytologie
885	Sarkom des Uterus	maligne	k.A.	k.A.	k.A.	56	Spülzytologie
890	Sarkom des Uterus	maligne	k.A.	k.A.	I + II	67	Spülzytologie
896	Endometrium-Ca	maligne	k.A.	k.A.	IV	68	Spülzytologie
903	Endometrium-Ca	maligne	k.A.	k.A.	I + II	70	Spülzytologie
908	Sarkom	maligne	k.A.	k.A.	k.A.	46	Spülzytologie
875	BOT	BOT	k.A.	k.A.	I + II	53	Spülzytologie
62	OvCa	OvCa	IC	serös	I + II	43	Aszites
112	OvCa	OvCa	IA	serös/endo- metr. Anteile	I + II	67	Aszites
187	OvCa	OvCa	IA	muzinös	k.A.	49	Aszites
370	OvCa	OvCa	IA	muzinös	I + II	27	Aszites
417	OvCa	OvCa	IIIC	serös	k.A.	61	Aszites
418	OvCa	OvCa	IC	muzinös	I + II	39	Aszites
420	OvCa	OvCa	IV	serös	k.A.	63	Aszites
421	OvCa	OvCa	IV	serös	k.A.	70	Aszites
422	OvCa	OvCa	IIIB	serös	I + II	71	Spülzytologie
501	OvCa	OvCa	IA	serös	I + II	65	Spülzytologie
605	Tuben-Ca	OvCa	IC	endometr.	V	61	Spülzytologie
606	Peritoneal-Ca	OvCa	IV	serös	V	70	Spülzytologie
794	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	84	Aszites
850	OvCa	OvCa	IV	serös	V	54	Douglaspunktat
901	OvCa	OvCa	IIIC	serös	k.A.	74	Aszites
902	OvCa	OvCa	IVA	serös	V	78	Aszites
904	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	50	Spülzytologie
905	OvCa	OvCa	IV	serös	I + II	61	Aszites

Anhang Tab. III: Spezifikation des Validierungsprobensets (n=116)

Einteilung der Proben in die Gruppen benigne Erkrankungen (n=39), maligne Erkrankungen (n=10), Borderline-Tumore (n=11) und OvCa (n=56). Neben Diagnose, FIGO-Stadium, Histologie und Zytologie ist das Alter zum Zeitpunkt der Operation sowie die Herkunft der Bauchraumflüssigkeit angegeben. Ca = Karzinom, BOT = Borderline-Tumor, Nr. = Nummer, k.A. = keine Angabe, i.d. = in der, endometr. = endometrioid

Nr.	Diagnose	Gruppe	FIGO-Stadium	Histologie	Zytologie-Gruppe	Alter	Bauchraumflüssigkeit
4	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	42	Douglasflüssigkeit
128	Deszensus uteri	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	53	Zytologie
153	Adenomyosis	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	32	Douglaspunktat
161	Adenomyosis, Ovarzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	50	Douglaspunktat
215	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	29	Douglasspülung
233	Adnexektomie	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	52	Spülzytologie
235	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	30	Douglaspunktat
239	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	58	Douglasspülung
245	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	66	Spülzytologie
249	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	47	Spülzytologie
253	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	63	Douglasspülung
255	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	31	Douglasspülung
258	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	48	Douglasspülung
267	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	54	Douglaspunktat
269	benigne Peritonealzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	51	Spülzytologie
499	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	I + II	42	Aszites
527	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	47	Spülzytologie
529	benignes Zystadenom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	62	Aszites
538	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	I + II	37	Douglasspülung
554	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	I + II	65	Zystenpunktat
559	Myom	benigne	k.A.	k.A.	I + II	39	Spülzytologie
834	Lymphozele	benigne	k.A.	k.A.	I + II	63	Douglasflüssigkeit
841	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	I + II	12	Spülzytologie
3284	Uterusmyom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	44	Aszites
3294	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	16	Aszites
3369	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	40	Aszites
3707	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	39	Aszites
3814	Leberzirrhose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	45	Aszites
7067	Kystom	benigne	k.A.	k.A.	I + II	56	Aszites
7187	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	III	32	Douglasflüssigkeit
7715	Ovarialzyste	benigne	k.A.	k.A.	I + II	46	Douglasflüssigkeit
7736	Uterusmyom	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	40	Douglasflüssigkeit
7770	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	I + II	45	Douglasflüssigkeit
10307	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	42	Douglasflüssigkeit
10394	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	I + II	42	Douglasflüssigkeit
10438	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	I + II	34	Douglasflüssigkeit
10439	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	I + II	53	Douglasflüssigkeit
xxx1	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	42	Douglasflüssigkeit
xxx3	Endometriose	benigne	k.A.	k.A.	k.A.	29	Douglasflüssigkeit
513	Keimstrangtumor	maligne	k.A.	k.A.	I + II	26	Spülzytologie
517	Karzinom des Uterus	maligne	k.A.	k.A.	I + II	75	Spülzytologie
555	Zervix-Ca	maligne	k.A.	k.A.	k.A.	51	Spülzytologie
3722	Uterussarkom	maligne	k.A.	k.A.	k.A.	62	Aszites
6931	Leiosarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	69	Aszites
7179	Liposarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	65	Aszites
7248	Uterussarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	69	Aszites
7512	Uterusstromasarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	34	Aszites

Nr. (Fs.)	Diagnose	Gruppe	FIGO-Stadium	Histologie	Zytologie-Gruppe	Alter	Bauchraumflüssigkeit
7786	endometr. Stromasarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	44	Aszites
xxx2	Uterussarkom	maligne	k.A.	k.A.	I + II	75	Spülzytologie
557	BOT	BOT	k.A.	k.A.	I + II	50	Spülzytologie
571	BOT	BOT	k.A.	k.A.	IV	35	Spülzytologie
612	BOT	BOT	k.A.	k.A.	I + II	81	Spülzytologie
631	BOT	BOT	k.A.	k.A.	I + II	60	Spülzytologie
641	BOT	BOT	k.A.	k.A.	I + II	81	Spülzytologie
655	BOT	BOT	k.A.	k.A.	I + II	47	Spülzytologie
658	BOT	BOT	k.A.	k.A.	k.A.	56	Spülzytologie
709	BOT	BOT	k.A.	k.A.	I + II	71	Spülzytologie
746	BOT	BOT	k.A.	k.A.	III	34	Spülzytologie
758	BOT	BOT	k.A.	k.A.	III	49	Spülzytologie
802	BOT	BOT	k.A.	k.A.	II	75	Spülzytologie
114	OvCa	OvCa	IB	serös	I + II	53	Aszites
218	OvCa	OvCa	IC	endometr.	I + II	48	Douglasflüssigkeit
284	OvCa	OvCa	IA	schlecht differenziert	I + II	66	Spülzytologie
372	OvCa	OvCa	IA	Teratom	I + II	53	Aszites
424	OvCa	OvCa	IC	serös	V	67	Aszites
503	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	78	Aszites
548	OvCa	OvCa	IIIC	serös	II	79	Aszites
556	Peritoneal-Ca	OvCa	k.A.	serös	k.A.	64	Aszites
558	Tuben-Ca	OvCa	IIIC	serös	V	68	Aszites
573	OvCa	OvCa	IA	serös	I + II	41	Spülzytologie
584	OvCa	OvCa	IA	schlecht differenziert	I + II	53	Spülzytologie
620	OvCa	OvCa	IC	serös	V	48	Spülzytologie
629	OvCa	OvCa	IC	serös	V	65	Spülzytologie
657	OvCa	OvCa	IV	serös	IV	49	Aszites
668	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	74	Spülzytologie
670	Tuben-Ca	OvCa	IIIC	serös	V	47	Aszites
673	Tuben-Ca	OvCa	IIIC	serös	V	77	Spülzytologie
687	OvCa	OvCa	IA	muzinös	I + II	45	Spülzytologie
689	OvCa	OvCa	IV	serös	IV	49	Aszites
692	OvCa	OvCa	IV	serös	V	51	Aszites
700	OvCa	OvCa	IV	serös	IV	60	Aszites
713	Peritoneal-Ca	OvCa	IIIC	serös	V	76	Aszites
769	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	63	Spülzytologie
796	OvCa	OvCa	IA	muzinös	III	57	Spülzytologie
798	OvCa	OvCa	IIIC/IV	serös	V	80	Aszites
799	OvCa	OvCa	IIIC	serös	I + II	62	Aszites
805	OvCa	OvCa	IIIC	serös	I + II	74	Aszites
807	OvCa	OvCa	IIIC	serös	k.A.	76	Aszites
809	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	71	Spülzytologie
811	OvCa	OvCa	IIIB	serös	k.A.	44	Aszites
814	OvCa	OvCa	IA	serös	k.A.	49	Spülzytologie
818	OvCa	OvCa	IIIB	serös	V	51	Aszites
819	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	62	Spülzytologie
821	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	74	Aszites
822	OvCa	OvCa	IC	klarzellig	V	44	Douglasflüssigkeit
824	OvCa	OvCa	IVA	serös	V	73	Aszites
844	OvCa	OvCa	IC	serös	IV	55	Spülzytologie
845	Peritoneal-Ca	OvCa	IIIC	endometr.	I + II	78	Spülzytologie
6075	OvCa Rezidiv	OvCa	IIIC	serös	k.A.	77	Aszites
6487	OvCa	OvCa	IIIC	serös	k.A.	44	Aszites
6656	OvCa Rezidiv	OvCa	IIIC	un-differenziert	k.A.	60	Aszites

Nr. (Fs.)	Diagnose	Gruppe	FIGO-Stadium	Histologie	Zytologie-Gruppe	Alter	Bauchraumflüssigkeit
6684	OvCa	OvCa	IV	serös	k.A.	44	Aszites
6866	OvCa	OvCa	IIIC	serös	IV	61	Aszites
6868	OvCa Rezidiv	OvCa	IIIB	serös	V	41	Aszites
6940	OvCa Rezidiv	OvCa	IIC	serös	V	70	Aszites
6959	OvCa	OvCa	IIIC	muzinös	I + II	71	Aszites
7077	OvCa Rezidiv	OvCa	IIIC	serös	I + II	67	Aszites
7086	OvCa Rezidiv	OvCa	IIIB	serös	V	55	Aszites
7087	OvCa	OvCa	IC	Siegelringzellkarzinom	k.A.	46	Aszites
7118	OvCa	OvCa	IV	Siegelringzellkarzinom	V	46	Aszites
7297	OvCa	OvCa	IA	muzinös	III	75	Spülzytologie
7322	OvCa	OvCa	IIIC	serös	II	53	Aszites
7434	OvCa	OvCa	IIIC	serös	V	63	Aszites
7547	OvCa	OvCa	IV	serös	V	67	Aszites
7621	OvCa	OvCa	IV	serös	V	68	Aszites
7663	OvCa	OvCa	IC	endometr.	V	71	Aszites

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Sequenzveränderung der DNA nach Bisulfit-Behandlung	33
Abb. 2: Reaktionsschritte der chemischen Bisulfit-Behandlung	33
Abb. 3: Schmelzkurvenanalyse der Gradienten-PCR für NKX6-1	45
Abb. 4: Sensitivität des SV2C Primerpaars in der qMSP	47
Abb. 5: Relative Methylierung (in %) der Intra-Assay-Triplikate in der Verdünnungsreihe	49
Abb. 6: Anteil methylierter Proben im Etablierungsprobenset nach Probengruppe	50
Abb. 7: Sensitivität und Spezifität der MSP-Primerpaare im Etablierungsprobenset.....	50
Abb. 8: Anteil methylierter Proben im Validierungsprobenset nach Probengruppe.....	51
Abb. 9: Sensitivität und Spezifität der MSP-Primerpaare im Validierungsprobenset	51
Abb. 10: Sensitivität und Spezifität der vier besten Markerkombinationen	54
Abb. 11: Verteilung der relativen Methylierung für alle MSP-Primerpaare in cfDNA-Proben des Etablierungs- und Validierungsprobensets.....	55
Abb. 12: ROC-Kurve der relativen Methylierung des Etablierungsprobensets (benigne Erkrankungen und OvCa) mit den sechs MSP-Primerpaaren	58
Abb. 13: Sensitivität und Spezifität der vier besten Markerkombinationen mit Schwellenwerten	59
Abb. 14: Verteilung der relativen Methylierung für alle MSP-Primerpaare in Proben von cfDNA, Zellpellet, Primärtumorgewebe und Gewebe von Tumorabsiedlungen.....	62
Abb. 15: Verteilung der relativen Methylierung für alle MSP-Primerpaare in Proben von Primärtumorgewebe und Gewebe von Tumorabsiedlungen	64
Abb. 16: Sensitivität und Spezifität der Markerkombinationen mit Zytologie.....	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: System zur Einteilung des Ovarialkarzinoms	7
Tab. 2: Tabellarisches Verzeichnis der verwendeten Chemikalien	27
Tab. 3: Tabellarisches Verzeichnis der verwendeten Geräte	28
Tab. 4: Tabellarisches Verzeichnis der verwendeten Kits und Enzyme	29
Tab. 5: Tabellarisches Verzeichnis der MSP-Primerpaare	29
Tab. 6: Tabellarisches Verzeichnis der verwendeten Software zur Erstellung und Auswertung von Daten	30
Tab. 7: Ablauf des Gradienten-PCR-Programms im Eppendorf Mastercycler Gradient.....	36
Tab. 8: Ablauf/Temperaturprotokoll der qMSP.....	38
Tab. 9: Variationskoeffizienten der Intra- <i>Assay</i> -Triplikate	48
Tab. 10: Variationskoeffizienten der Inter- <i>Assay</i> -Triplikate	48
Tab. 11: Odds-Ratio („Exp(B)“) der OvCa-Wahrscheinlichkeit bei Methylierung.....	53
Tab. 12: Fläche unter der Kurve, Schwellenwerte und entsprechende Sensitivität/Spezifität der MSP-Primerpaare nach Ergebnissen der ROC-Kurve	58
Tab. 13: Übersicht der Mann-Whitney-U-Test-Ergebnisse von den untersuchten Einflussfaktoren	70
Anhang Tab. I: Literaturverzeichnis der untersuchten Kandidatengene	I
Anhang Tab. II: Spezifikation des Etablierungsprobensets (n=65)	I
Anhang Tab. III: Spezifikation des Validierungsprobensets (n=116).....	III

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, **Patricia Irma Herta Rothen**, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: **Herr Dr. rer. nat. Norman Häfner** (*Betreuung, Auswahl und Auswertung des Materials*); **Herr Lars Jansen** (*Anfertigung von Gewebeschnitten*),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers