

Aus der Klinik für Gynäkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Neue prädiktive und prognostische Faktoren beim high-grade
Ovarialkarzinom: BRCA1-Mutationen im Fokus**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Desislava Dimitrova

aus Vratza, Bulgarien

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract Deutsch	Seite 3
2. Abstract Englisch	Seite 4
3. Einleitung	Seite 5
4. Auswahl der Patientinnen und Methodik	Seite 9
○ BRCA1-Mutationsanalyse	Seite 9
○ BRCA1-Methylierungsanalyse	Seite 11
○ EpCAM-Expressionsanalyse	Seite 13
5. Statistische Auswertung	Seite 13
6. Ergebnisse	Seite 13
7. Diskussion	Seite 17
8. Literaturverzeichnis	Seite 19
9. Eidesstattliche Versicherung	Seite 23
10. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen	Seite 24
11. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	Seite 26
12. Lebenslauf	Seite 27
13. Publikationsliste	Seite 28
14. Danksagung	Seite 31

Abstract Deutsch

Das high-grade Ovarialkarzinom (HGOC) stellt eine Subgruppe der malignen Ovarialtumoren mit ungünstigem Verlauf dar. Diese Tumoren entstehen „de novo“ ohne Vorläuferläsion und weisen häufig genetische Alterationen wie BRCA1- und p53-Mutationen auf. Diese Tumore sprechen primär gut auf platinhaltige Chemotherapien an, entwickeln aber im Verlauf eine Therapieresistenz. Daher ist die Identifizierung neuer prädiktiven und prognostischen Faktoren beim high-grade Ovarialkarzinom eine wichtige klinische Herausforderung. Zahlreiche Studien beschreiben bei Tumoren mit BRCA1-Mutation einen günstigeren klinischen Verlauf. Ein alternativer Mechanismus für Genregulation ist die Hypermethylierung im Promotorbereich des BRCA1-Gens, die ebenso eine Gendysfunktion mit verminderter Expression zur Folge hat.

Ziel dieser Arbeit ist die Bedeutung der BRCA1-Gen Dysfunktion bei Patientinnen mit high-grade Ovarialkarzinom zu erforschen. Weiterhin wurde die Überexpression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls - EpCAMs im Gewebe von Primär- und Rezidivtumoren untersucht.

Methoden: Blut- und Gewebeproben von Patientinnen mit high-grade Ovarialkarzinomen wurden im Rahmen des TOC-Netzwerks prospektiv zwischen 2000 und 2011 gesammelt. Blutproben von 263 Patientinnen mit primären HGOC wurden für Keimbahnmutationen im Exon 11 des BRCA1-Gens mittels DNA-Sequenzierung untersucht. Weitere Tumorgewebeproben von 257 primären HGOC wurden für BRCA1-Promotorhypermethylierung mittels real-time PCR untersucht und bei 19 gepaarten Gewebeproben von den Primär- und Rezidivtumoren wurde die EpCAM-Überexpression mittels Immunohistochemie analysiert.

Ergebnisse: Bei 18/263 Patientinnen (6,8 %) wurde eine BRCA-1 Mutation im Exon 11 mit klinischer Bedeutung nachgewiesen. Weitere 10/263 Patientinnen (3,8%) hatten eine BRCA1-Genvariante mit unklarer klinischen Bedeutung (VUS). Alle Patientinnen mit BRCA1-Mutationen hatten ein HGOC ($p=0.05$). Das Vorliegen einer BRCA1-Mutation im Exon 11 hatte keinen Einfluss auf das klinische Outcome der Patientinnen. Bei 38 von den 257 Gewebeproben (14,8 %) wurde eine BRCA1-Promotorhypermethylierung nachgewiesen. Der Prozentsatz der Patientinnen mit Hypermethylierung war signifikant höher bei Patientinnen jünger als 58 Jahre (20,8 % < 58 J. vs 8,7 % bei > 58 J., $p=0.008$). Die Ansprechraten auf Chemotherapie, die Tumorreduktionsraten, sowie OS und PFS waren ähnlich zwischen beiden Gruppen. Bei der Untersuchung der EpCAM-Expression wurde bei 17 (89 %) der Primärtumore und 16 (84 %) der Rezidivtumore eine EpCAM Überexpression nachgewiesen ($p=1.0$).

Zusammenfassung: Der Nachweis einer BRCA1-Mutation im Exon 11 war signifikant häufiger bei HGOC. Eine BRCA1-Promotorhypermethylierung trat häufiger bei jüngeren Patientinnen auf. Sowohl das Vorliegen einer Mutation als auch die Promotorhypermethylierung waren keine unabhängigen Prognosefaktoren für den Krankheitsverlauf, sind aber von klinischer Bedeutung als mögliche Faktoren, die eine bessere Stratifizierung der Patientinnen für individualisierte Therapien ermöglichen. Die EpCAM Überexpression bleibt konstant im Krankheitsverlauf und stellt ein weiteres Target für zielgerichtete Therapien bei Ovarialkarzinomrezidiven dar.

Abstract English

Introduction: High grade ovarian cancer (HGOC) is an aggressive disease with unfavourable clinical course. Most of the tumors have no precursor lesion and develop rapidly. They reveal genetic alterations such as BRCA1- and p53- mutations. These tumors are primarily highly responsive to platinum-based therapy but after several courses of treatment acquire resistance. There is a strong need of new prognostic and predictive factors, which can help better address this clinical challenge. Recent studies brought evidence that patients with BRCA1 mutation have a favourable prognosis. Among the sporadic HGOC the aberrant methylation of the BRCA1 promotor region represent an alternative mechanism of BRCA1 gene silencing. We aimed to examine the clinical importance of BRCA1 gene dysfunction in HGOC patients. Furthermore we analysed the EpCAM expression in tumour tissues from matched primary and recurrent HGOC patients.

Methods: Blood samples and fresh frozen tissue from HGOC patients, treated at the Charité Klinik Berlin between 2000 and 2011 were collected from TOC (Tumor Ovarian Cancer) Network. Direct sequencing of exon 11 was performed as method for BRCA1 mutation detection for 263 HGOC patients. BRCA1 gene promothor hyper methylation rate was assessed using real time PCR among 257 HGSOC patients. The EpCAM overexpression in 19 matched tumour tissue samples was measured with immunohistochemistry.

Results: Mutations in BRCA1 exon 11 were found in 18 of 263 patients (6.8 %). Further 10/263 (3.8 %) cases showed variants of uncertain importance (VUS). All exon 11 BRCA1-positive tumours were high grade serous (p=0.05). The BRCA1 exon 11 mutational status was not found to be an independent predicitive factor for optimal cytoreduction, platinum response or survival. A BRCA1 promotor hypermethylation was found in 38 of 257 samples (14.8 %). The rate of hypermethylation was significantly higher in younger patients (20.8 % < 58 J. vs 8.7 % >58 J., p=0.008). The BRCA1 hypermethylation did not influence the PFS or OS rates between the groups. The EpCAM expression analysis revealed an EpCAM overexpression in 17 (89 %) of the primary and 16 (84 %) of the recurrent tumours (p=1.0).

Conclusion: A BRCA1-mutation in exon 11 was found predominantly among the HGOC. A BRCA1 promotor hypermethylation was detected more frequently among younger patients. Although the BRCA1 mutational status and BRCA1 methylation did not influence the clinical outcome in this population, the BRCA 1 gene dysfunction might be of interest as factor for tailoring the oncologic treatment among HGOC. In the setting of recurrent HGOC the EpCAM overexpression might be also a possible treatment target.

Einleitung

Das Ovarialkarzinom gehört zu den aggressivsten Tumoren der weiblichen Geschlechtsorgane. Die Diagnose, bedingt durch mangelhafte Früherkennungsmaßnahmen und unspezifische Symptomatik, wird häufig in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt. Die 5-Jahres-Überlebensraten in diesem Stadium sind unter 40 % und haben sich trotz der Verfügbarkeit neuer Therapien nur gering erhöht in letzten 10 Jahren. Weltweit wurden 2012 238700 neue Erkrankungen registriert und 151900 an Ovarialkarzinom verstorbene Frauen (Torre et al).

Das relative Risiko in der Gesamtpopulation an einem Ovarialkarzinom zu erkranken liegt bei 1.4%-1.6%. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ca. 63 Jahren. Es ist eine Zunahme der Inzidenz- und Mortalitätsrate des Ovarialkarzinoms mit dem Alter zu beobachten.

Zu den bekannten Risikofaktoren für die Entstehung des Eierstockkrebses zählen: höheres Lebensalter; Nullipartität; Infertilität; frühere Menarche; spätere Menopause; hormonelle Faktoren wie z. B.: Hormonersatztherapie mit Östrogen-Gestagen-Kombinationen länger als 10 Jahren, Ovulationsauslösung im Rahmen der Sterilitätsbehandlung; Umweltfaktoren wie z. B.: Diät (fett- und fleischhaltige Nahrung), perineale Applikation von kosmetischem Talk und molekulare Alterationen bestimmter Oncogene wie z. B.: K-Ras, ErBB-2, das p-53 Tumorsuppressor Gen, BRC1 und BRCA 2 (Sehouli J. Multimodales Management des Ovarialkarzinoms).

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist komplex und multifaktoriell bedingt. Die neuen Erkenntnisse zu der Ätiologie stellen das Ovarialkarzinom als eine heterogene Erkrankung dar. Es wird aktuell zwischen high-grade and low-grade Karzinomen unterschieden, die unterschiedliche Entstehungswege und Krankheitsverläufe haben (Li et al, Bowtell et al). Als Vorläuferläsion der low-grade Typ 1 Karzinome werden Inklusionszysten identifiziert, die über gutartige Zystadenome in Borderlinetumoren schließlich in gut differenzierte Ovarialkarzinome transformiert werden. Diese Karzinome haben ein geringeres Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie aber insgesamt eine gute Prognose dank des langsamen Krankheitsverlaufs. Im Gegensatz dazu sind die Typ-2 Karzinome hoch aggressive Tumore mit ungünstiger Prognose charakterisiert durch genomische Instabilität und Mutationen in verschiedenen Genen wie: p53 und BRCA 1 und 2. Diese Tumore entstehen vermutlich vom Tubenepithel des Fimbrientrichters. Dort wurden Vorläuferläsionen, die so genannten "p-53-

Signaturen" erkannt, die sich in STIC entwickeln können. Die Transformation zu invasiven Karzinomen entsteht rasch ohne Zwischenläsionen. Diese Karzinome sind meistens platin-sensitive Tumore. Zu den Typ I Karzinomen gehören laut diesem 2-er System: die niedrig differenzierten serösen Karzinome, die niedrig differenzierten endometrioiden, muzinösen und Klarzellkarzinome. Zu den Typ II Karzinomen gehören die hoch differenzierten serösen, endometrioiden Karzinome, alle undifferenzierte Tumore und die Karzinosarkome (Li et al).

Mutationen in BRCA 1 und 2 Gene sind einer der bedeutsamsten Faktoren, die zu einer Erhöhung des kumulativen Risikos für Ovarialkarzinomentstehung beitragen. Beim Vorliegen einer BRCA1 Mutation wird das kumulative Risiko um 39 % erhöht (Antoniou et al). Einige Studien haben gezeigt, dass in 50 % der high grade serösen Karzinome ein „Loss-of-function“ von verschiedenen Genen nachweisbar ist, die in der so genannten HR-DNA-Reparatur beteiligt sind. Der Begriff „BRCAness“ beschreibt dieses Phänomen, bei dem die Tumore eine HR-Reparatur Mangel aufweisen ohne das Vorliegen einer BRCA1 oder BRCA2 Mutation (Tan et al). Als mögliche Ursache werden epigenetische Veränderungen im Promotorbereich bestimmter Gene, wie z. B. BRCA1-Gen, die zu einer verminderten Expression dieser Gene führen beschrieben. (Catteau et al). Die Hypermethylierung im Promotorbereich des BRCA1-Gens hat eine verminderte Expression und mangelhafte Funktionalität des Proteins zur Folge. Beim Nachweis einer BRCA1 Mutation liegt eine Dysfunktion des Gens vor. BRCA Mutation werden in ca. 15% der epithelialen Ovarialkarzinome nachgewiesen. Verschiedene Mutationsvarianten sind beschrieben, davon sind ca. 80 % die so genannten „Frameshift“ oder „Nonsense“ Mutationen, die eine klinische Auswirkung haben. Es gibt keine standardisierten Verfahren um die Auswirkung von den verschiedenen Mutationen klinisch zu testen, aber einige Studien zeigten, dass Mutationen in verschiedenen Regionen des Gens mit unterschiedlichem Risiko für Krebsentstehung verbunden sind und andere klinische Bedeutungen haben können (Drost et al). Untersuchungen zur Lokalisation von BRCA1-Keimbahnmutationen in Familien mit Mamma- und Ovarialkarzinom deuten eine Genotype-Phenotype Korrelation an: Mutationen im 3`-Ende des BRCA1-Gens (außerhalb des Exons 11) scheinen mit einer geringeren Anzahl von Ovarialkarzinomen verbunden zu sein. Im Gegensatz dazu, sind Mutationen in der Zentralregion des Gens, wo sich Exon 11 befindet, mit einer erhöhten Anzahl von Ovarialkarzinomen verbunden (Thompson et al). Mit 3426 Basen ist Exon 11 das größte Exon des BRCA1-Gens und umfasst 60% der kodierenden Region (Chen et al, Raponi et al).

BRCA1 Gen besteht aus 24 Exons und liegt auf dem langen Arm von Chromosom 17. 22 von den 24 Exons werden in eine 7,8 KB RNA transkribiert, die ein aus 1863 Aminosäuren bestehendes Protein kodiert Das BRCA1-Protein weist multiple Funktionen wie die Reparatur geschädigter DNA und Zellzykluskontrolle auf (Baer et al).. Die Rolle von BRCA1 bei der DNA Reparatur und homologen Rekombination wird aufgrund ihrer Co-lokalisierung mit anderen Schlüsselproteinen, wie z.B. RAD 51, BRCA2 in Zellen mit DNA-Schäden vermutet. Alle drei Proteine zusammen beteiligen sich an der

Reparatur geschädigter DNA. Das BRCA-1 Protein aktiviert u.a. die Transkription des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21 und kann dadurch wahrscheinlich einen G2/M Zellzyklusarrest und beim Vorliegen einer irreversiblen DNA-Schaden eine Apoptose auslösen. Eine loss-of-function Mutation oder Deletion dieses Gens erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung. Das durch das BRCA-1 Gen kodierte Protein beteiligt sich an der Reparatur geschädigter DNA und Beibehaltung der Integrität des Genoms. Bei Verminderung der BRCA1-Genexpression wurden die DNA-Schädigungen mangelhaft repariert und dadurch kann eine maligne Transformation des ovariellen Oberflächenepithels ausgelöst werden (Yoshida et al).

Interessant für das klinische Management ist, dass BRCA1-assoziierte Tumore spezifische klinisch-pathologische Charakteristika aufweisen. Dies sind meistens high grade seröse Karzinome, die früher im Vergleich zu den nicht BRCA1-assoziierten Karzinomen entstehen, sie sprechen gut auf platinhaltige Therapien an und haben ein längeres rezidivfreies und Gesamtüberleben, wie einige Studien zeigten (Cass et al, Bolton et al). Im Gegensatz dazu konnte dieser Überlebensvorteil in anderen Studien nicht bestätigt werden (Buller et al) oder nur für die BRCA 2 mutierten Karzinome (Hyman et al). Daten für das Langzeitüberleben zeigen, dass der Vorteil die ersten Jahre nach der Diagnose bleibt, aber nach 10 Jahren sind keine Unterschiede mehr nachweisbar (Kotsopoulos et al).

Verschiedene Studien weisen außerdem darauf hin, dass Tumore, die durch Methylierungsveränderungen entstehen, bei ähnlicher Klinikopathologie mit BRCA1-mutation-assoziierten Tumoren ein unterschiedliches klinisches Überlebensprofil zeigen. Chiang et al. haben in einer Studie das Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom in Folge einer Keimbahnmutation in BRCA1-Gen mit dem Überleben von Patientinnen, bei deren Tumoren BRCA1-Promotorhypermethylierung nachgewiesen werden konnte, verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben (9.8 Monaten vs 39.5 Monaten) und Gesamtüberleben (35.6 Monaten vs 78.6 Monaten) in der Gruppe mit der BRCA1-Promotorhypermethylierung im Vergleich zur Gruppe von Patientinnen mit BRCA1-Mutationen. Auch die Arbeitsgruppe von Wei et al hat gezeigt, dass ein höherer DNA-Methylierungsgrad bei Ovarialkarzinom mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben nach Chemotherapie verbunden ist. Im Gegensatz dazu konnte dieser Unterschied in anderen Studien nicht nachgewiesen werden (Yang et al).

Ein weiterer interessanter Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf des Ovarialkarzinoms ist die Überexpression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls: EpCAM. EpCAM ist ein transmembranes Glykoprotein und wird von den vielen normalen Epitelzellen mit Ausnahme von Hepatozyten und Keratinozyten expremiert. Eine EpCAM-Überexpression ist bei vielen Karzinomzellen beschrieben. Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül weist verschiedenen Funktionen auf, wie z.B. durch die Unterbrechung der durch E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell Adhäsion hat das Protein möglicherweise

eine Rolle bei der Tumormetastasierung, sowie eine Rolle in der Karzinogenese mit Induktion von c-myc und cyclin A und E Expression (van der Gun et al.). Einige Studien haben, gezeigt dass eine Überexpression des EpCAM Proteins mit einem verkürzten Gesamtüberleben verbunden ist (Baeuerle et al, Spizzo et al).

Andererseits zeigten andere Arbeiten ein verlängertes Gesamtüberleben bei einer EpCAM-Überexpression. Möglicherweise durch seine Rolle in der Stabilisierung des Zytoskeletts kann das EpCAM die Tumorinvasion regulieren.

Eine EpCAM-Überexpression ist sowohl beim Primärtumor, als auch bei den Metastasen beschrieben (Bellone et al). Aus klinischer Sicht ist das Protein als Target für zielgerichtete Therapien interessant.

Die Standardtherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms besteht aus einer zytoreduktiven Operation gefolgt von einer kombinierten Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel in Kombination mit einer zielgerichteten Therapie gegen VEGF. Trotz optimaler Therapie entwickeln ca. 65 % der Patientinnen ein Rezidiv. Wichtige Prognosefaktoren für den weiteren Krankheitsverlauf sind der postoperative Tumorrest und das Ansprechen auf die Chemotherapie. Patientinnen die ihr Rezidiv > 6 Mon nach der primären Therapie entwickeln haben eine bessere Prognose und längeres therapiefreies Intervall bei den Folgetherapien als diejenigen, die ihr Rezidiv < 6 Mon bekommen.

Neben den oben genannten etablierten Prognosefaktoren ist die Suche und Entdeckung neuer Prognosefaktoren, die eine genauere Risikoeinschätzung und Stratifizierung der Patientinnen in Subgruppen mit unterschiedlichem Outcome ermöglichen von großer Bedeutung für eine optimale patientenorientierte Therapieentscheidung

Das Ziel dieser Arbeit war die prognostische Relevanz von der BRCA1 Gen-Dysfunktion bedingt durch Mutation oder epigenetischen Veränderungen für das klinische Outcome und Therapieansprechen auf platinhaltige Chemotherapie zu erforschen. Ein anderer Aspekt war die Expression des epithelialen Zelladhäsionsmolekül EpCAM beim primären und rezidierten epithelialen Ovarialkarzinom zu untersuchen. Die beiden Faktoren sind als Prognosefaktoren in mehreren Studien untersucht und können in der Therapieentscheidung eine Rolle spielen.

Die prognostische Relevanz der BRCA-1 Dysfunktion in folge einer BRCA1-Mutation oder Promotor Hypermethylierung beim Ovarialkarzinom wurde durch Bewertung der Korrelation mit konventionellen Prognosefaktoren und dem rezidivfreien und Gesamtüberleben in einer multivariaten Analyse geprüft. Die Expression der EPCAM wurde zwischen Primär- und Rezidivtumoren verglichen.

Auswahl der Patientinnen und Methodik

Es wurden 260 Fälle mit primärem Ovarialkarzinom und 3 Fälle mit primärem Peritonealkarzinom für die BRCA1- Mutationsanalyse ausgewählt. Alle Blut und Gewebe-Proben werden im Rahmen des TOC-Projektes im Zeitraum von 2000 bis 2008 an der Klinik für Gynäkologie, Campus Virchow Klinikum gesammelt und nach entsprechender Aufarbeitung eingefroren. Patienten wurden vor der Probengewinnung vom Arzt über die Sammlung der Proben aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis wurde eingeholt. Einschlusskriterien bei der Zusammenstellung des Kollektivs waren die gültige Einwilligungserklärung, die klinische Diagnose eines Primärovarialkarzinoms und die histologische Bestätigung eines Ovarialkarzinoms, Ausschlusskriterien waren bekannte BRCA1 oder 2 Mutation in anderen Bereich des Gens, sowie die Behandlung mit einer neoadjuvanten Chemotherapie vor der Operation.

Für die BRCA-Methylierungsanalyse aus der ausgewählten Kohorte waren 118 Gewebeproben von Patientinnen mit high grade Ovarialkarzinom, die in dem Zeitraum von 2000 bis 2011 im Rahmen des Tumorbank Ovarian Cancer Projektes „TOC“ asserviert wurden, vorhanden. Weitere 89 Proben aus der TOC Gewebebank und 50 Proben, die im Rahmen des OVCAD Projektes eingeschlossen wurden, wurden für die Methylierungsanalyse in einer konsekutiven Kohorte untersucht. Alle Proben wurden intraoperativ gewonnen und nach entsprechender Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Der Auswahl der Patientinnen für die Methylierungsanalyse erfolgte unabhängig von dem BRCA1-Mutationsstatus. Einschlusskriterien bei der Zusammenstellung des Kollektivs waren die gültige Einwilligungserklärung, die klinische Diagnose eines primären Ovarialkarzinoms, die histologische Bestätigung eines epithelialen Ovarialkarzinoms, eine platinhaltige Chemotherapie nach primärer operativen zytoreduktiven Therapie. Die Mehrheit der Patientinnen wurden mit einer Carboplatin/Paclitaxel Kombinationschemotherapie behandelt, Die Patientinnen, die eine neoadjuvante Chemotherapie bekommen haben, wurden ausgeschlossen. Alle Proben wurde vor der Analyse erneut pathoanatomisch begutachtet und nur Proben mit Tumorinhalt >50 % wurden eingeschlossen.

Aus der Patientenkohorte, die für die Mutationsanalyse ausgewählt wurde, waren Gewebeproben von 17 Patientinnen mit primären serösen Ovarialkarzinomen und entsprechende Tumorproben von den Rezidivoperationen für die EpCAM Analyse vorhanden. Geweberoben von 2 weiteren Patientinnen, sowie Ovargewebe aus Nicht-Karzinom Patientinnen als Kontrolle wurden für die EpCAM Expressionsanalyse aus der TOC-Gewebebank rekrutiert. Die entsprechenden klinischen Daten wurden aus der TOC - Datenbank eingeholt.

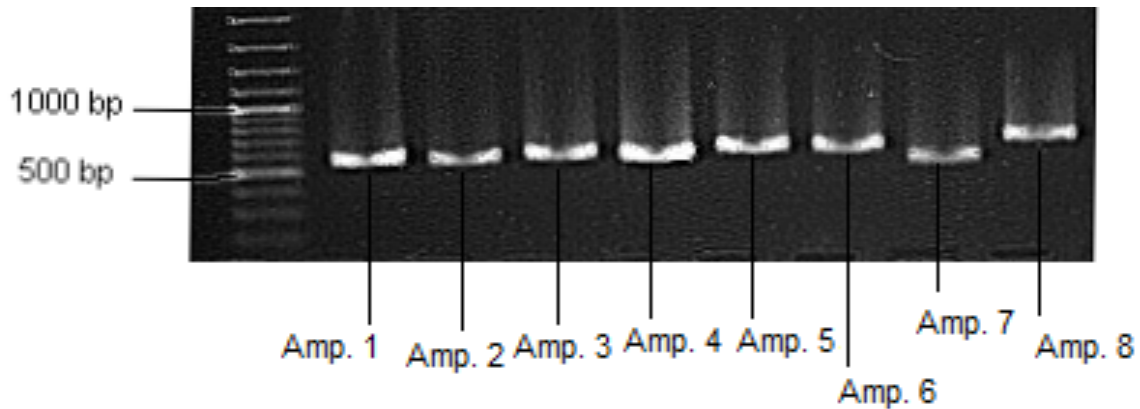
BRCA1-Mutationsanalyse

Die DNA für die BRCA1-Mutationsanalyse wurde von 2ml EDTA-Blut mit Hilfe des Qiagen System (QIAamp DNA blood Midi Kit, Germany) laut der Anweisungen des Qiagen-Protokolls extrahiert.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration nach der Extraktion erfolgte am einen Spektrometer.

In einem nächsten Schritt wurde das Screening für BRCA1 Mutationen im Exon 11 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 8 Primerpaare entworfen, die das gesamte Exon 11 abdecken. Die entsprechenden PCR-Produkte (Amplicons) 1 bis 8 sind in der Abbildung 1 gezeigt.

Abb. 1 PCR -Produkte



Die PCR-Bedingungen sind wie folgt: ein denaturierender Anfangsschritt bei 95 °C für 15 Minuten; anschließend 35 Zyklen bestehend aus: 1. Denaturierung bei 95 °C für 20 Sekunden; 2. Primärhybridisierung bei 60°C für 30 Sekunden; 3. Verlängerung bei 72°C für 1 Minute. Anschließend eine Endverlängerung bei 72°C für 3 Minuten und als letzter Schritt Kühlung bei 4°C für 10 Minuten.

Die Materialien pro 1 PCR-Reaktion sind wie folgt:

<i>Ansatz für 1 PCR-Reaktion</i>
DNA 1µl (100ng/ µl)
10x PCR Puffer: 2,5 µl
dNTPs: 0,5 µl (10pmol/ µl)
Primerpaar: 1 µl (10pmol/ µl)
Hot Star Taq D N A Polymerase: 0,2 µl (1UI)
DMSO (100%): 0,75 µl (3%)
H2O 25 µl

Die PCR Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel mit 6x Loading Dye (Fermentas) aufgetragen, bei 150V Elektrophorese getrennt und mittels UV–Beleuchtung visualisiert.

Als nächster Schritt wurden die PCR-Produkte (5 µl Produkt) mittels des Enzyms ExoSAP-IT(2 µl Enzym) gereinigt. Das ist die Vorbereitung für die Sequenzierung-PCR, wo die gereinigten ExoSAP–Produkte mit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) und entsprechenden Primer vorwärts oder rückwärts amplifiziert werden.

Die ExoSap-Reinigung läuft in zwei Schritten: Inkubation bei 37 °C für 45 Minuten, gefolgt von der Enzyminaktivierung bei 95°C für 15 Minuten.

Die Materialien und Reaktionsschritten der Sequenzierung-PCR pro 1 Reaktion sind:

<i>Ansatz für 1 PCR-Reaktion</i>
ExoSap Produkt: 1 µl
Sequenzierungspuffer: 2 µl
Big Dye Terminator Mix v1.1: 1 µl
Primer* – jeweils vorwärts oder rückwärts: 1 µl
H2O ad 10 µl

Die Sequenzierung-PCR-Bedingungen beinhalten einen denaturierenden Anfangsschritt bei 96 °C für 2 Minuten; anschließend 24 Zyklen bestehend aus: 1. Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden; 2. Primärhybridisierung bei 60°C für 15 Sekunden; 3. Verlängerung bei 60°C für 4 Minute.

Danach folgt eine Ethanol-Fällung der Produkte mit Natriumacetat und 70% Ethanol über 3 Schritte und Trocknen bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Am Ende wurden die Produkte mit Betain aufgelöst und sequenziert am 3100 Applied Biosystems Genetic Analyzer. Die Sequenzierungsdaten wurden mit dem Bio - Edit Programm für Windows –Software Version 5.0.6 (North Carolina State University, Department of Microbiology) analysiert und mit der BRCA Mutation BIC Datenbank verglichen (<http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/>).

BRCA1-Methylierungsanalyse

Die DNA wurde mittels QIAGEN DNeasy® Tissue Kit nach dem von der Firma Qiagen GmbH beschriebenen Protokoll extrahiert. Anschließend wurden alle DNA-Proben mittels Qiagen EpiTect Kit bisulfit – konvertiert.

Die Reaktion läuft über 5 Stunden bei den folgenden Bedingungen:

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	25 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	85 min	60°C
Denaturierung	5 min	95°C
Inkubation	175 min	60°C

Danach wird die bisulfit-konvertierte einzelsträngige DNA auf den EpiTect Spin-Säule aufgeladen. Nach einem Waschschrift erfolgt die Desulfonierung der membran-gebundenen DNA mittels eines im Kit vorhandenen Desulfonierungspuffers. Nach zwei Waschschriften kann die konvertierte DNA eluiert werden und ist direkt für DNA-Methylierungsanalyse verwendbar.

Real-time PCR für BRCA1-Promotormethylierung

Anschließend wurde die DNA-Promotormethylierung des BRCA-1Gens mittels Real-time PCR am Light Cycler 480 (Roche) gemessen. Für die Messung der Promotormethylierung wurde ein Real-Time Assay von der Firma Epiontis GmbH, Berlin verwendet.

Die Anzahl der methylierten Kopien des BRCA1-Promotors wurde relativ gegenüber ein als Referenz ausgewählten „Housekeeping“ Gen- Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) quantifiziert. Um zu Überleben braucht jeder Zelle das GAPDH-Gen in einem aktiven demethylierten Zustand.

Für Erstellen des Standards wurde ein Plasmid, das die gewünschte BRCA1 und GAPDH-Sequenzen beinhaltet, verwendet und in pUC57 Klonierungsvektor mittels des Enzym EcoRV von der Firma „GenScript“ kloniert. Nach Konzentrationsmessung und Bestimmung der Reinheit des Plasmids wurde ein Verdau mittels des Restriktionsenzym ScaI bei 37Grad für 3h durchgeführt.

Ziel-Konzentration des linearisierten Plasmids: 10 ng/ µl in 100 µl Ansatz

100 µl Ansatz beinhaltet:

- 6,74 µl Plasmid (148,5 ng/ µl)
- 10 µl NE Buffer 3(10X)
- 5 µl Sca I (10 000 Units pro µl)
- 78,26 H2O

Nach dem Enzymverdau wurde eine Verdünnungsreihe vom linearisierten Plasmid mit definierter DNA-Kopienzahl für Standards eingesetzt.

Verdünnungsreihe von BRCA1-Standards

Standard-Reihe:	Kopien / 6ul	Kopien / 1ul
für methylierte (BRCA1) und demethylierte (GAPDH) System	12500	2083,3
	2500	416,7
	500	83,3
	100	16,7
	20	3,3
	4	0,7

Es wurden 2 parallel laufenden Messungen für das demethylierte und für das methylierte System durchgeführt:

Ansatz für demethylierte System (GAPDH)	Ansatz für methylierte System (BRCA1)
3 µl DNA (>40ng)	3 µl DNA (>40ng)
1 µl Lambda DNA (50 ng/µl)	1 µl Lambda DNA (50 ng/µl)
0.5 µl GAPDH-Sonde (5 pmol/ml)	0.5 µl BRCA1-Sonde: P1m (5 pmol/ml)
0.5 µl Primer-Mix GAPDH (30 pmol/ml)	0.5 µl Primer-Mix qPCR6m (30 pmol/ml)
5 µl 2x Probe MM (Roche)	10 µl 2x Probe MM (Roche)
Reaktionsvolumen: 10 µl	Reaktionsvolumen: 10 µl

Für Erhöhung der Reaktionsspezifität wurden TaqMan Sonden eingesetzt.

Die Reaktionsbedingungen sind wie folgt:

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Pre-inkubation	1	95	10 min
Elongation	50	95	15 sec
		59	1min
Kühlung	1	42	15sec

EpCAM-Expressionsanalyse

Die Beurteilung der EpCAM Expression erfolgte nach immunohistochemischer Färbung mit der Avidin-Biotin Methode mittels eines anti-EpCAM mause Antikörper HO-3 (Trion Research) anhand eines Score-Systems. Als positive Kontrolle wurde Kolonkarzinomgewebe eingesetzt und als negative Kontrolle normales Ovargewebe. Vier Gruppen wurden gebildet: 0 bis 10 % keine Expression, 11 bis 50 % niedrige Expression, 51 bis 75 % moderate Expression und 76 bis 100 % Überexpression.

Statistische Auswertung

Für die Überprüfung der Korrelation zwischen BRCA1 Mutation im Exon 11 oder der BRCA1-Hypermethylierung und den klinischen Faktoren wie z. B. FIGO, Aszitesmenge und Tumorrest wurden der Chi-Quadrat Test nach Pearson und der zweiseitige exakte Test nach Fischer verwendet. Als Signifikanzniveau wurde ein p-wert kleiner als 0.05 akzeptiert. In einer binär logistischen Regression wurde der Wert der Promotorhypermethylierung oder der Mutationsstatus zusammen mit anderen klinischen Faktoren als unabhängiger prädiktiver Faktor für den postoperativen Tumorrest und das Ansprechen nach platinhaltiger 1st-line Chemotherapie geprüft.

Für die Beurteilung des Einflusses auf das rezidivfreie und postoperative Überleben wurde die Kaplan-Meier Analyse verwendet. Die Bedeutung von Promotormethylierung oder der Nachweis einer Mutation als unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben wurden in einem multivariaten Cox-Regression Modell geprüft.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 263 Patientinnen für Mutationen in Exon 11 des BRCA1-Gens untersucht. Die klinischen Charakteristika der Patientinnen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Patienten Charakteristika

	BRCA 1 MUT	BRCA1 WT	P
Anzahl der Patientinnen	18 (6.8 %)	235 (89.4 %)	
Alter	53 (41-67)	57(22-92)	0.06
Ovarialkarzinome	18(100 %)	232 (98.7 %)	1
Peritonealkarzinome		3 (1.3%)	
FIGO I/II	2 (11.1%)	63 (26.8%)	0.17
FIGO III/IV	16 (88.9 %)	172 (73.2%)	
Typ I Karzinome	0	42 (17.9 %)	0.05
Typ II Karzinome	18 (100 %)	193 (82.1%)	
Aszites <500 ml	14 (77.8 %)	170 (72.3 %)	0.79
Ascites >500ml	4 (22.2 %)	65 (27.7 %)	
Peritonealkarzinose			0.61
Ja	11 (61.1 %)	158 (67.2%)	
Nein	7(38.9 %)	77 (32.8 %)	
Kein Tumorrest	14 (77.8 %)	174 (74 %)	1
Tumorrest	4 (22.2 %)	61 (26 %)	

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei 57 Jahren. Die Mehrheit der Fälle wurden in einem fortgeschrittenem Stadium III-IV nach FIGO (74,5 % 196/263) diagnostiziert. Eine optimale Tumorfreiheit konnte bei 73,8 % der Patientinnen bei der Operation erreicht werden. 83,6 % (220/263) der Patientinnen hatten ein Typ 2 Ovarialkarzinom.

Es konnten insgesamt bei 28 Patientinnen (10.6 %) Mutationen im Exon 11 des BRCA1 Gens nachgewiesen werden, davon 18 (6.8 %) mit bekannter klinischen Bedeutung und 10 (3,8 %) mit unklarer klinischen Bedeutung (VUS-variants mit uncertain significance).

Die Frameshift und Nonsense Mutationen (insgesamt bei 18 Patientinnen-6.8%) haben eine klinische Bedeutung, weil alle zu Veränderung im Leseraster der DNA und/oder zur Bildung ein Stopkodon führen, so dass sich ein verkürztes Protein mit mangelhafter Aktivität und Funktion bildet. Bei den VUS (insgesamt bei 10-Patientinnen -3.8%) führt der Basenaustausch zu einem Aminosäureaustausch, dessen Auswirkung auf die Proteinfunktionalität unklar ist.

Die Tabelle 2 beschreibt die Mutationsvariante im Exon 11 des BRCA1-Gens

Nukleotid	Codon	Basenaustausch/ Substitution/Deletion	Aminosäure Substitution	Bezeichnung	Mutationstyp	Anzahl der Mutation- Trägerinnen
882	255	G→T	Glu to Stop 255	E255X	N	1/28

962	281	Del CTCA	Stop 297	962del4	F	2/28
1100	327	Del AT	Stop 328	1100delAT	F	1/28
1163	348	Del TG	Stop 348	1163delTG	F	1/28
1806	563	C→T	Gln→Stop	Q563X	N	5/28
2334	739	Ins CT	Stop 753	2334insCT	F	1/28
2640	840	C→T	Arg→Trp	R481W	VUS	1/28
2382	755	G→T	Stop 755	E755X	N	1/28
2634	839	Del C	Stop 845	2534delC	F	1/28
2804	895	Del AA	Stop 901	2804delAA	F	1/28
3238	1040	G→A	Ser→Asn	S1040N	VUS	4/28
3819	895	Del GTAAA	Stop 1242	3819del5	F	2/28
3875	1234	Del GTCT	Stop 1262	3875del4	F	1/28
4154	1345	Del A	Stop 1365	4154delA	F	1/28
4158	1347	A→G	Arg→Gly	R1347G	VUS	5/28
Abkürzungen: Gln (Q) – Glutamin; Arg (R) – Arginin; Asp (Asparginsäure); Asn (N) - Aspargin; Ser – Serin; Leu – Leucin; Pro (P) – Prolin; Glu (E) – Glutaminsäure; Gly (G) – Glycin; Lys (K) - Lysin F – Frameshift Mutation; N-Nonsense Mutation; VUS-Variant mit unklarer Bedeutung						

Die 10 Patientinnen mit Mutationen unklarer klinischer Bedeutung wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

253 Patientinnen standen zur Verfügung für die Korrelation mit konventionellen Prognosefaktoren und dem rezidivfreien und Gesamtüberleben in der multivariaten Analyse.

Es konnten keine signifikante Unterschiede zwischen BRCA1-mutierten (MUT) Patientinnen im Exon 11 und BRCA-negativen (WT) im Bezug auf Alter der Erstdiagnose, FIGO Stadium, Aszitesmenge, Peritonealkarzinose, Resttumor nach der Operation gezeigt werden. Dennoch wurden Mutationen im Exon 11 nur unter den Patientinnen mit Typ II Ovarialkarzinomen ($p=0.05$) gefunden.

Den weiteren Vergleich zwischen BRCA1-mutierten und BRCA-negativen Patientinnen wurde daher nur bei den Patientinnen, die ein Karzinom Typ II aufgewiesen haben durchgeführt.

Es zeigte sich, dass MUT Patientinnen mit Typ II signifikant jünger zum Zeitpunkt der Diagnose (53 J. vs 59 J.) waren im Vergleich zu den Typ II WT Patientinnen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Ansprechraten auf platinhaltige Chemotherapie zwischen MUT (81.2 %) und WT Patientinnen (83.4%) ($p=0.73$) gezeigt werden. Ebenso konnte nach einem medianen Follow-up von 51 Monaten kein Überlebensvorteil für eine der beiden Gruppen gefunden werden. Die 5-Jahres rezidivfreie Überlebensrate in der Gruppe der MUT Patientinnen war 29.4% und in der Gruppe der WT Patientinnen 26%. Das 5-Jahres Gesamtüberleben war jeweils 47,1 % bei den MUT und 46,8 % bei den WT Patientinnen.

Unabhängige prädiktive Faktoren für den Tumorrest nach der Operation waren das Alter bei der Diagnose ($p<0.0001$), die Aszitesmenge ($p=0.04$) und der Nachweis einer Peritonealkarzinose

($p < 0.0008$). Der Tumorrest nach der Operation war ($p = 0.035$) prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf Chemotherapie.

Unabhängige Prognosefaktoren für das rezidivfreie Überleben waren das FIGO Stadium ($p = 0.005$), postoperativer Tumorrest ($p = 0.0013$) und der Nachweis einer Peritonealkarzinose.

Unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben waren das FIGO Stadium ($p = 0.018$), der postoperative Tumorrest ($p < 0.0001$) und das Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie ($p < 0.0001$).

Bei der Methylierungsanalyse wurden insgesamt 257 Patientinnen mit Typ II Ovarialkarzinom auf eine Hypermethylierung im Bereich des BRCA-1 Promotors untersucht. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 58 Jahren. 94 % der Patientinnen hatten ein Stadium III oder IV nach FIGO. Die klinischen Charakteristika sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Bei 38 der Patientinnen wurde mindestens 5% Methylierung im Promotorbereich des Gens nachgewiesen. In dieser Gruppe mit BRCA1-Hypermethylierung betrug das mittlere Erkrankungsalter 54 Jahren. Insgesamt wurde eine BRCA1-Hypermethylierung signifikant häufiger bei Patientinnen jünger als 58 Jahre gefunden, im Gegensatz zu der Gruppe der Patientinnen älter als 58 Jahre (22.0 % vs 8.7 %, $p = 0.008$). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem BRCA1 Hypermethylierungsstatus und den anderen klinischen Parametern wie z.B. das FIGO Stadium, Aszitesmenge, postoperativer Tumorrest oder das Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie gefunden werden.

Nach einer medianen Follow-up Zeit von 24,5 Monaten betrug das rezidivfreie Überleben jeweils 23.1 Monate für die Patientinnen mit und 22.7 Monate für die Patientinnen ohne BRCA1-Hypermethylierung ($p = 0.566$). Bei dem Gesamtüberlebenszeit fanden sich ebenso keine signifikante Unterschiede für die beiden Gruppen ($p = 0.019$).

Die Auswertung der BRCA1-Methylierung im Promotorbereich des Gens bei einer Subgruppe von 107 Patientinnen ohne Nachweis einer Mutation im Exon 11 bei der BRCA1-Mutationsanalyse ergab ähnliche Ergebnisse.

Eine BRCA1-Hypermethylierung war signifikant häufiger bei Patientinnen < 58 Jahren als bei Patientinnen > 58 Jahren ($P = 0.002$) zu finden. Es gab keine signifikante Überlebensunterschiede im Bezug auf PFS (22 Mon. vs 24 Mon.) oder OS (45 Mon vs. 56 Mon.) in der Gruppen mit und ohne BRCA1-Hypermethylierung.

Insgesamt 19 Patientinnen mit High-grade serösen Karzinomen waren für die EpCAM Überexpressionsanalyse vorhanden. Davon waren bei 17 Information von der BRCA1-Mutationsanalyse vorhanden. 23,5 % (4/17) hatte eine BRCA1 Mutation im Exon 11 des BRCA1 Gens.

Eine EpCAM Überexpression wurde bei 17 Patientinnen (89,5%) bei der Erstdiagnose und bei 16 Patientinnen (84,2 %) in der Rezidivsituation nachgewiesen. Es gab keine Unterschiede in der EpCAM – Überexpression im Gewebe aus Primär- und Rezidivtumoren ($p = 1.0$). Zwei Patientinnen,

deren Tumore eine EpCAM Überexpression beim Primärtumor zeigten, hatten im Rezidivtumor nur eine moderate EpCAM – Expression. Bei einer Patientin bei der im Primärtumor eine moderate EpCAM-Überexpression nachgewiesen wurde, zeigte sich im Rezidiv eine EpCAM-Überexpression.

Diskussion

Das Ovarialkarzinom bleibt trotz der Fortschritte in der Diagnostik eine Erkrankung mit ungünstiger Prognose und steht an fünfter Stelle als Ursache für die Gesamtkrebsmortalität bei Frauen in Europa.

Die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien in den letzten 10 Jahren ist ein bedeutsamer Schritt für das Erreichen eines längeren therapiefreien Intervalls bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen. Die neuen Erkenntnisse zu der Ätiologie des Ovarialkarzinoms bringen sowohl neues Verständnis zu der Krebsentstehung, aber ermöglichen auch eine bessere Stratifizierung der Patientinnen und individualisierte Therapien.

Diese Arbeit stellt eine der größten Untersuchungen dar, die verschiedene Aspekte der BRCA1-Gen Dysfunktion, sowie die EpCAM-Überexpression im Verlauf der Erkrankung bei einer Kohorte von Patientinnen mit high grade Ovarialkarzinom erforscht hat.

Die Bedeutung der BRCA1- Mutationen als Risikofaktor für die Krebsentstehung bei Patientinnen mit familiärer Belastung für Eierstock- und/oder Brustkrebs ist lange bekannt. Bei Patientinnen mit sporadischen high-grade Karzinomen finden sich häufig andere genetische oder epigenetische Alterationen wie z. B. somatische Mutationen oder Hypermethylierung bestimmter Genbereiche, die zu einem BRCA-Funktionsverlust führen. Wie die Studie der Cancer Genome Research Group zeigte, fand sich in einer Kohorte von 489 high-grade Karzinomen bei 9 % der Fälle eine BRCA1-Keimbahnmutation und in 11% der Fälle lag eine BRCA-Promotorhypermethylierung vor. In unserer Kohorte, wo Exon 11 untersucht wurde, waren 6.8 % der Patientinnen Trägerinnen einer BRCA1-Mutation mit klinischer Bedeutung. Im Anklang mit der Annahme, dass die Mehrheit der BRCA1-Mutationen, die ein Ovarialkarzinom verursachen im Zentralregion des Gens liegen, ist die Anzahl der entdeckten BRCA1-Mutationen vergleichbar mit den von den Literatur beschriebenen Häufigkeiten.

Bei der Methylierungsanalyse wurde bei 14 % der untersuchten Population eine BRCA-Promotorhypermethylierung nachgewiesen. Verschiede Studien berichten eine Häufigkeit der Methylierung zwischen 5 - 40 % (Baldwin et al, Wang et al.), was sich mit der Verwendung unterschiedlicher Screeningmethoden erklären lässt. Esteller et al, die eine ähnliche

Untersuchungsmethode wie in unsere Analyse verwendet haben, haben von einer ähnlichen Zahl von Patientinnen mit Hypermethylierung berichtet.

Sowohl bei den Patientinnen mit BRCA1-Mutation als auch mit BRCA1-Promotorhypermethylierung wurden kein signifikanter Unterschied bezüglich des Erreichens einer postoperativen Tumorfreiheit und Response auf Chemotherapie nachgewiesen. Der Überlebensvorteil der Patientinnen mit BRCA1-Mutationen, der in vielen Studien berichtet wurde, konnte in der untersuchten Kohorte nicht bestätigt werden. Als Ursache für den Überlebensvorteil dieser Patientinnen wird eine erhöhte Platinsensitivität der Tumore vermutet. Wir konnten keinen Überlebensvorteil in der Gruppe von Mutationsträgerinnen oder Patientinnen mit BRCA1-Promotorhypermethylierung feststellen. Unabhängiger prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf Chemotherapie war der postoperative Tumorrest. Die Mehrheit der untersuchten Patientinnen (73,8 %) wurde kurativ operiert mit Erreichen einer kompletten Tumorreduktion. Eine Hypothese, die diese Diskrepanz erklären kann ist, dass bei einer Kohorte mit einer hohen Anzahl von tumorfrei operierten Patientinnen sich dieser Überlebensvorteil nicht nachweisen lässt.

Ähnlich wie bei den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Hyman et al, war das Vorliegen einer Mutation bei der multivariaten Analyse kein unabhängiger prädiktiver Faktor für das Erreichen einer kompletten Tumorreduktion. Das Alter bei der Diagnose, Aszitesmenge über 500 ml und der Nachweis einer diffusen Peritonealkarzinose haben sich als signifikante prädiktive Faktoren für eine nicht optimale Tumorreduktion erwiesen.

Eine BRCA1-Promotorhethylierung fand sich signifikant häufiger bei Patientinnen unter 58 Jahren in der Untersuchungskohorte, was auch von anderen Autoren als Teil des „BRCA-ness“ Phänomen berichtet wurde. Diese Beobachtung ist besonders bei jüngeren Patientinnen interessant, die keine BRCA1-Mutation Trägerinnen sind, aber trotzdem eine BRCA-Gen Dysfunktion aufgrund einer BRCA1-Promotorhypermethylierung haben können. Diese Gruppe von Patientinnen kann aufgrund der vorliegenden BRCA-Dysfunktion von einer Therapie mit PARP Inhibitoren profitieren. Diese neue Klasse von zielgerichteten Therapien, die ihren Wirkungsmechanismus an Zellen mit defekter HR-Reparatur ausüben, zeigen vielversprechende Ergebnisse bei Patientinnen mit BRCA1-Dysfunktion (Ledermann et al, Oza et al). Die BRCA-1 Promotorhypemethylierung wird neben dem Vorliegen einer BRCA1-Mutation als einer der wichtigsten Ursachen für die Entwicklung einer defekten HR-Reparatur beschrieben.

Die EpCAM Überexpression wurde von einigen Studien mit aggressivem Krankheitsverlauf und schlechterem Outcome in Verbindung gebracht. Einige Autoren haben eine gesteigerte Überexpression in der Rezidivsituation gefunden. Im Gegensatz dazu fand die Arbeitsgruppe von Spizzo et al., die die EpCAM- Überexpression in verschiedenen Tumorgeweben untersucht hat, eine konstante Überexpression bei den primären Tumoren und Metastasen. Die Ergebnisse unserer EpCAM-

Überexpressionsanalyse sind im Anklang mit Spizzo et al. Eine stabile EpCAM-Expression war bei den primären und Rezidivtumoren nachweisbar.

Die Suche nach neuen Prognose- und Prädiktivfaktoren bei high-grade Ovarialkarzinomen ist von besonderer Bedeutung, weil die Mehrheit der Patientinnen im Verlauf der Erkrankung ein Rezidiv entwickeln werden. Obwohl das Vorliegen einer BRCA1-Mutation im Exon 11 oder BRCA1-Hypermethylierung kein signifikanter unabhängiger Prognosefaktor bei der untersuchten Population war, fand sich eine BRCA1-Gendysfunktion signifikant häufiger bei jüngeren Patientinnen mit Typ II Ovarialkarzinomen. Dies könnte im Klinikalltag eine Stratifizierung der Patientinnen ermöglichen, die von einer zielgerichteten Therapie mit PARP-Inhibitoren profitieren werden. Der natürliche Verlauf der Ovarialkarzinomerkkrankung ist mit wiederholten Rezidiven verbunden. Daher stellen Faktoren wie die EpCAM-Überexpression, die auch im Rezidivgewebe konstant bleibt, wichtige Therapietargets dar.

Literatur:

1. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(5):1117-30.
2. Baer R, Lee W.H. Functional domains of the BRCA1 and BRCA2 proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998 Oct; 3(4):403-12.
3. Baeuerle PA and Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer* (2007) 96, 417 – 423
4. Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, Karlan BY. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2000;60(19):5329-33.
5. Bellone S, Siegel ER, Cocco E, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule in primary, metastatic, and recurrent/chemotherapy-resistant epithelial ovarian cancer: implications for epithelial cell adhesion molecule-specific immunotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:860–6.
6. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA.* 2012; 307:382-90.
7. Bowtell DD. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2010 Nov; 10(11): 803-8.

8. Buller RE, Shahin MS, Geisler JP, Zogg M, De Young BR, Davis CS. Failure of BRCA1 dysfunction to alter ovarian cancer survival. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:1196-202.
9. Cass I, Baldwin RL, Varkey T, Moslehi R, Narod SA, Karlan BY. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer.* 2003; 97:2187-95.
10. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012; 490(7418):61-70.
11. Chen Y, Farmer AA, Chen CF, Jones DC, Chen PL, Lee WH. BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Res.* 1996;56:3168-72.
12. Chiang JW, Karlan BY, Cass L, Baldwin RL. BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis. *Gynecol Oncol.* 2006; 101(3):403-10.
13. Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene.* 1999 Mar 18; 18(11):1957-65.
14. Drost R, Bouwman P, Rottenberg S, Boon U, Schut E, Klarenbeek S, Klijn C, van der Heijden I, van der Gulden H, Wientjens E, Pieterse M, Catteau A, Green P, Solomon E, Morris JR, Jonkers J. BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. *Cancer Cell.* 2011;20:797-809.
15. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(7):564-9.
16. Hyman DM, Long KC, Tanner EJ, Grisham RN, Arnold AG, Bhatia J, Phillips MF, Spriggs DR, Soslow RA, Kauff ND, Levine DA. Outcomes of primary surgical cytoreduction in patients with BRCA-associated high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2012; 126:224-8
17. Hyman DM, Zhou Q, Iasonos A, Grisham RN, Arnold AG, Phillips MF, Bhatia J, Levine DA, Aghajanian C, Offit K, Barakat RR, Spriggs DR, Kauff ND. Improved survival for BRCA2-associated serous ovarian cancer compared with both BRCA-negative and BRCA1-associated serous ovarian cancer. *Cancer.* 2012 Aug 1; 118(15): 3703-9.
18. Kotsopoulos J, Rosen B, Fan I, Moody J, McLaughlin JR, Risch H, May T, Sun P6, Narod SA. Ten-year survival after epithelial ovarian cancer is not associated with BRCA mutation status. *Gynecol Oncol.* 2016 Jan;140(1):42-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.11.009. Epub 2015 Nov 7.

19. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott CL, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Fielding A, Spencer S, Dougherty B, Orr M, Hodgson D, Barrett JC, Matulonis U. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Jul;15(8):852-61
20. Li J, Fadare O, Xiang L, Kong B, Zheng W. Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis *J Hematol Oncol.* 2012; 5:8Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:87-108.
21. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, Poole C, Mathijssen RH, Sonke GS, Colombo N, Spaček J, Vuylsteke P, Hirte H, Mahner S, Plante M, Schmalfeldt B, Mackay H, Rowbottom J, Lowe ES, Dougherty B, Barrett JC, Friedlander M. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Dec 3. pii: S1470-2045(14)71135-0
22. Raponi M, Smith LD, Silipo M, Stuani C, Buratti E, Baralle D. BRCA1 exon 11 a model of long exon splicing regulation. *RNA Biol.* 2014;11:351-9
23. Sehouli J. Multimodales Management des Ovarialkarzinoms. *Epidemiologie.* 2 Auflage-Bremen: UNI-MED, 2012:16-20
24. Spizzo G, Went P, Dirnhofner S, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;103:483–8.
25. Spizzo G, Fong D, Wurm M, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2011; 64: 415–20.
26. Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, Ardern-Jones A, Norman A, Kaye SB, Gore ME. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol.* 2008; 26:5530-6.
27. Thompson D, Easton D; Breast Cancer Linkage Consortium Variation in BRCA1 cancer risks by mutation position. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11(4):329-36
28. van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis.* 2010 Nov;31(11):1913-21
29. Wang C, Horiuchi A, Imai T, Ohira S, Itoh K, Nikaido T, Katsuyama Y, Konishi I. Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *J Pathol.* 2004;202(2):215-23

30. Wei SH, Chen CM, Strathdee G, Harnsomburana J, Shyu CR, Rahmatpanah F, Shi H, Ng SW, Yan PS, Nephew KP, Brown R, Huang TH. Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. *Clin Cancer Res.* 2002 Jul;8(7):2246-52.
31. Yang D, Khan S, Sun Y, Hess K, Shmulevich I, Sood AK, Zhang W. Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer. *JAMA.* 2011;306(14):1557-65.
32. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004 Nov; 95(11):866-71.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Desislava Dimitrova, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neue prädiktive und prognostische Faktoren beim high-grade Ovarialkarzinom: BRCA1-Mutationen im Fokus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

_____ Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Desislava Dimitrova hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Pietzner K, Woopen H, Richter R, Joens T, Braicu EI, Dimitrova D, Mellstedt H, Darb-Esfahani S, Denkert C, Lindhofer H, Fotopoulou C, Sehouli J. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in paired tumor samples in patients with primary and recurrent serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23:797-802.

Impact Factor: 1,941

Beitrag im Einzelnen: Erstellung des Patientenkollektivs, Datenaquirierung

Publikation 2:

Ruscito I, Dimitrova D (geteilte Erstautherschaft), Vasconcelos I, Gellhaus K, Schwachula T, Bellati F, Zeillinger R, Benedetti-Panici P, Vergote I, Mahner S, Cacsire-Tong D, Concin N, Darb-Esfahani S, Lambrechts S, Sehouli J, Olek S, Braicu EI. BRCA1 gene promoter methylation status in high-grade serous ovarian cancer patients--a study of the tumour Bank ovarian cancer (TOC) and ovarian cancer diagnosis consortium (OVCAD). *Eur J Cancer*. 2014;50:2090-8.

IF: 5,4117

Beitrag im Einzelnen: Erstellung des Patientenkollektivs, Datenaquirierung, Auswertung der Daten, Literatur, Statistische Auswertung

Publikation 3:

D. Dimitrova, I. Ruscito (geteilte Erstautherschaft), S. Olek, R. Richter, A. Hellwag, I. Türbachova, H. Woopen, U. Baron, E.I. Braicu, J. Sehouli. Germline mutations of BRCA1 gene exon 11 are not associated with platinum response neither with survival advantage in patients with primary ovarian cancer: understanding the clinical importance of one of the biggest human exons. A study of the Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC) Consortium. *Tumour Biol*. 2016 Jun 14

IF: 3,611

Beitrag im Einzelnen: Schreiben des Amendments für den Ethikantrag, Erstellung des Patientenkollektivs, Datenaquirierung, Datenauswertung, univariate und multivariate Statistik, Literatur, Schreiben der Publikation, Überarbeitung des Manuskriptes nach der peer-review Begutachtung.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1

Pietzner K, Woopen H, Richter R, Joens T, Braicu EI, Dimitrova D, Mellstedt H, Darb-Esfahani S, Denkert C, Lindhofer H, Fotopoulou C, Sehouli J. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in paired tumor samples in patients with primary and recurrent serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23:797-802.

<http://dx.doi.org/10.1097/IGC.0b013e3182929056>

Impact Factor: 1,941

Publikation 2:

Ruscito I, Dimitrova D (geteilte Erstautherschaft), Vasconcelos I, Gellhaus K, Schwachula T, Bellati F, Zeillinger R, Benedetti-Panici P, Vergote I, Mahner S, Cacsire-Tong D, Concin N, Darb-Esfahani S, Lambrechts S, Sehouli J, Olek S, Braicu EI. BRCA1 gene promoter methylation status in high-grade serous ovarian cancer patients--a study of the tumour Bank ovarian cancer (TOC) and ovarian cancer diagnosis consortium (OVCAD). *Eur J Cancer*. 2014;50: 2090-8.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.05.001>

Impact Factor: 5,4117

Publikation 3:

D. Dimitrova, I. Ruscito (geteilte Erstautherschaft), S. Olek, R. Richter, A. Hellwag, I. Türbachova, H. Woopen, U. Baron, E.I. Braicu, J. Sehouli. Germline mutations of BRCA1 gene exon 11 are not associated with platinum response neither with survival advantage in patients with primary ovarian cancer: understanding the clinical importance of one of the biggest human exons. A study of the Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC) Consortium. . *Tumour Biol*. 2016 Jun 14

<http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5109-8>

Impact Factor: 3,611

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste:

Abstracts und Vorträge (Erstautorenschaft):

1. Dimitrova D., Braicu E. I., Chekerov R., Richter R., Oskay-Özcelik G., Lichtenegger W., Olek S., Sehouli J. BRCA1-mutation Status and Polymorphisms Significantly Influence the Histological Grading and Lymph Nodes Involvement in Ovarian Cancer Patients Targeted Tumor Therapies Fabisch Symposium. 4th Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology; Poster no. C-01, April 2009
2. Dimitrova D. , Braicu E. I., Chekerov R. , Richter R. , Oskay-Özcelik G., Lichtenegger W. , Olek S. , Sehouli J. A previously described BRCA1 missense mutation with unknown clinical importance significantly correlates with surgical outcome and aggressive disease in ovarian cancer patients. Poster 3-1. Symposium der TraFo Kommission der AGO, September 2009
3. D. Dimitrova, I. Braicu, R. Richter, R. Chekerov, G. Oskay-Oezcelik, A. Parashkevova, W. Lichtenegger, S. Olek, J. Sehouli. BRCA1 positive status significantly influences surgical outcome and lymph node involvement in ovarian cancer patients. 29. Deutscher Krebskongress, 24-27. Februar 2010, Berlin; (PP407)
4. D. Dimitrova, E.I. Braicu, R. Chekerov, R. Richter, G. Oskay-Özcelik, A. Parashkevova, W. Lichtenegger, S. Olek, J. Sehouli. BRCA1 positive status significantly influences tumor characteristics and lymph node involvement in ovarian cancer patients. Poster, 6 Charité – Mayo - Conference. 5.-8. Mai, TOC International Symposium.
5. D. Dimitrova, E. I. Braicu, R. Richter, R. Chekerov, G. Oskay-Özcelik, K. Pietzner, A. Parashkevova, W. Lichtenegger, S. Olek, J. Sehouli. Impact of BRCA1 gene alterations on tumor characteristics and clinical outcome in ovarian cancer (OC) patients 2010 ASCO Annual Meeting Abstract No 5019, J Clin Oncol 28:15s, 2010 (suppl; abstr 5019)
6. Desislava Dimitrova, Elena Ioana Braicu, Rolf Richter, Tim Schwachula, Radoslav Chekerov, Gülten Oskay-Özcelik, Werner Lichtenegger, Sven Olek, Jalid Sehouli. A subgroup with BRCA1 promotor hypermethylation among sporadic ovarian cancer is associated with adverse tumor characteristics 58.DGGG Kongress, October.2010, München. Abstract number: dggg00901, FV-Onko 01.05
7. D. Dimitrova, E.I. Braicu, R. Richter, Tim Schwachula, R. Chekerov, G. Oskay-Özcelik, W. Lichtenegger, S. Olek, J. Sehouli. A subgroup with BRCA1 promotor hypermethylation is associated with poor differentiated, serous, advanced ovarian cancer 13th Biennial Meeting of the International Gynecological Cancer Society Prague, October 23-26, 2010, Poster 561 Abstract A-214-0003-01407
8. D. Dimitrova, B. Naghavi, K. Neumann , M. David R. Chekerov E. I. Braicu (1), U. Torsten (3), C. Kronenberger G. Oskay-Özcelik I. Blau U. Keilholz J. Sehouli. Erste Ergebnisse der Expression V Studie – Berliner Umfrage zu Erwartungen und Wünsche von Patientinnen mit

und ohne Migrationshintergrund und gynäkologische Malignome. Freier Vortrag im Rahmen der GGGB-Sitzung 01/2015, Berlin

9. Desislava Dimitrova, Baharan Naghavi, Konrad Neumann, Matthias David, Radoslav Chekerov, Elena Ioana Braicu, Uwe Torsten, Christel Kronenberger, Gülten Oskay-Özcelik, Ilona Blau, Ulrich Keilholz, Jalid Sehoul. First results of Expression V Study, a survey by the North-Eastern-German Society of Gynaecological Oncology (NOGGO), assessing the therapy expectations of breast and ovarian cancer patients with different ethnicity in Germany. 2015 Annual ASCO Meeting Abstract No # e16582
10. Desislava Dimitrova, Baharan Naghavi, Matthias David, Uwe Torsten, Christel Kronenberger, Gülten Oskay-Özcelik, Ilona Blau, Jens-Uwe Blohmer, Ulrich Keilholz, Jalid Sehoul. Zwischenergebnisse der Expression V Studie – Berliner Umfrage zu Erwartungen und Wünschen von Patientinnen mit und ohne Migrationshintergrund und gynäkologischen Malignomen. Freier Vortrag im Rahmen des 45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Psychosomatische Frauenheilkunde und Geburtshilfe (DGPF), 02/2016, Hamburg.

Abstracts (Koautorenschaft):

1. A. Parashkevova, I. Braicu, R. Chekerov, R. Richter, G. Oskay-Özcelik, D. Dimitrova, W. Lichtenegger, J. Sehoul. Predictive value of preoperative CA-125 serum level for surgical outcome in advanced primary (POC) and recurrent ovarian cancer (ROC) patients. 16th International Meeting of the European Society of Gynecological Oncology (ESGO), 10-14 October 2009, Belgrade, Serbia; Abstract 965
2. A. Parashkevova, I. Braicu, R. Chekerov, R. Richter, G. Oskay-Oezcelik, D. Dimitrova, W. Lichtenegger, J. Sehoul. Preoperative Serum level of CA 125 as a predictivte marker for surgical outcome in advanced primary (POC) and recurrent ovarian cancer (ROC). 29. Deutscher Krebskongress, 24-27. Februar 2010, Berlin; (PO201)
3. Ines Vasconcelos, Sven Olek, Katharina Gellhaus, Tim Schwachula, Ioana Braicu, Christina Fotopoulou, Radoslav Chekerov, Desislava Dimitrova, Jalid Sehoul. Tumor infiltrating t-lymphocytes significantly contribute to the aggressiveness of epithelial ovarian tumors. 2012 ASCO Annual Meeting Abstract No #95130
4. Ilary Ruscito, Elena Ioana Braicu, Pierluigi Benedetti Panici, Radoslav Chekerov, Desislava Dimitrova, Ram N. Ganapathi, Ines Vasconcelos, Filippo Bellati, Christina Fotopoulou, Werner Lichtenegger, Sven Olek, Jalid Sehoul. BRCA1 methylation status in high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) patients (pts). 2012 ASCO Annual Meeting Abstract No #98176
5. Roshni Deepa Kalachand, Ilary Ruscito, Desislava Dimitrova, Pierluigi Benedetti Panici, Jalid Sehoul, Sven Olek, Elena Ioana Braicu, Lingeng Lu, Dionyssios Katsaros, Herbert Yu, Mark S Carey, Russell Broaddus, Karen H. Lu, Gordon B. Mills, Maria I Harrell, Kathy J Agnew,

Elizabeth M. Swisher, William Grogan, Britta Stordal, Bryan Hennessy. Clinical characteristics and survival outcomes in BRCA1-methylated epithelial ovarian cancer (Bmeth-OC): A pooled analysis of data for 1,278 patients across five studies. 2015 ASCO Annual Meeting Abstract No # 5526

Publikationen:

1. Pietzner K, Wopen H, Richter R, Joens T, Braicu EI, Dimitrova D, Mellstedt H, Darb-Esfahani S, Denkert C, Lindhofer H, Fotopoulou C, Sehouli J. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in paired tumor samples in patients with primary and recurrent serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23:797-802.
2. Ruscito I, Dimitrova D (geteilte Erstautherschaft), Vasconcelos I, Gellhaus K, Schwachula T, Bellati F, Zeillinger R, Benedetti-Panici P, Vergote I, Mahner S, Cacsire-Tong D, Concin N, Darb-Esfahani S, Lambrechts S, Sehouli J, Olek S, Braicu EI. BRCA1 gene promoter methylation status in high-grade serous ovarian cancer patients--a study of the tumour Bank ovarian cancer (TOC) and ovarian cancer diagnosis consortium (OVCAD). *Eur J Cancer*. 2014;50: 2090-8.
3. D. Dimitrova, I. Ruscito, S. Olek, R. Richter, A. Hellwag, I. Türbachova, H. Wopen, U. Baron, E.I. Braicu, J. Sehouli. Germline mutations of BRCA1 gene exon 11 are not associated with platinum response neither with survival advantage in patients with primary ovarian cancer: understanding the clinical importance of one of the biggest human exons. A study of the Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC) Consortium. *Tumour Biol*. 2016 Jun 14

Buchkapitel:

Kapitel 2: Äthiologie. Jalid Sehouli. Multimodales Management des Ovarialkarzinoms. Epidemiologie. 2 Auflage-Bremen: UNI-MED, 2012: 23-33

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei den Menschen bedanken, die mich bei der Fertigstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Mentor, Herr Prof. Dr. med. Jalid Schouli, der es mir ermöglicht hat diese wissenschaftliche Arbeit durchführen zu können und mir mit seinem exzellenten Fachwissen immer zur Seite stand. Durch seine freundliche und kompetente Unterstützung durfte ich mich an weiteren spannenden Forschungsprojekten beteiligen. Ich danke ihm sehr herzlich für seine Geduld und das Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten.

Ich möchte diese Gelegenheit auch nutzen, um mich bei Frau Dr. Elena Ioana Braicu für ihre freundliche Mitbetreuung meiner Doktorarbeit und Ihre Unterstützung bei der Veröffentlichung meiner Publikation zu bedanken.

Ein großer Dank geht an das Epiontis –Team und Dr. Sven Olek, die mir stets sehr gute Ansprechpartner waren und den experimentellen Teil meiner Arbeit begleitet haben. Durch ihre Ideen und die hilfsbereite und außerordentlich freundliche Arbeitsatmosphäre konnte ich die anspruchsvollen Untersuchungsmethoden erlernen.

Für die sehr hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Statistik danke ich Herrn Dr. rer. medic. Rolf Richter.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Ilary Ruscito für ihre großartige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei der Publikationsveröffentlichung.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Jessica Olschewski die mich bei der Einreichung meiner Promotion motiviert und unterstützt hat.

Nicht zuletzt danke ich dem ganzen TOC Team und Frau Monika Mentze für die nette und konstruktive Zusammenarbeit.

Vielen Dank an meine Familie und meine Freunde für die Unterstützung und Motivation während dieser Arbeit.