

Aus dem Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs  
der Universität zu Köln  
Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. Rita Schmutzler

**Die Mutationsprävalenz pathogener Keimbahnvarianten  
in Risikogenen  
sowie der Einfluss konstitutiver Methylierung der *BRCA1*-  
Promotorregion  
auf das Ovarialkarzinom bei früherkrankten Frauen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Johanna S. Schmolling  
aus Bonn

promoviert am 18. Oktober 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. nat. E. T. Hahnen
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. rer. nat. M. R. Schweiger

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Eric Hahnen, MBA  
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jan Hauke  
Mohamad Kayali  
Dr. rer. nat. Corinna Ernst  
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dimo Dietrich

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Das Kollektiv wurde basierend auf einem Auszug der zentralen Datenbank des Instituts für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Universität Leipzig ausgewählt. Dieser Datensatz wurde mir im Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs Uniklinik Köln von dem Leiter der Forschungsabteilung Priv.-Doz. Dr. Eric Hahnen zur Verfügung gestellt. Die Auswahl des Studienkollektivs erfolgte durch mich in Absprache mit Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Eric Hahnen und Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jan Hauke.

Vorangegangene molekulargenetische Untersuchungen erfolgten deutschlandweit in den Zentren des GC-HBOC und die Daten wurden über die zentrale Datenbank bereitgestellt.

Die 240 Proben für die molekulargenetische Untersuchung wurden in der zentralen Biobank des Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs in Köln bereitgestellt. Außerdem konnte ich 33 Proben in weiteren Zentren des GC-HBOC anfragen. Diese Proben wurde von den Zentren Berlin, Hamburg, Hannover, Leipzig, München, Tübingen, Ulm, Würzburg, Düsseldorf, Heidelberg und Kiel für die vorliegende Studie bereitgestellt. Die Vorbereitung der Proben (Zusammenstellung, Konzentrationsmessung und Verdünnung) vor der Next Generation Sequenzierung (NGS) erfolgte durch mich. Die NGS-Analyse wurde als Auftragssequenzierung im Cologne Center for Genomics (CCG) durchgeführt.

Die Ergebnisdateien der NGS-Analyse wurden über die Datenbank Varbank Version 2.26 des CCG bereitgestellt. Auffällige Sequenzen der NGS-Analyse wurden durch Dr. rer. nat. Jan Hauke beurteilt und durch Mohamad Kayali mit einer Sanger Sequenzierung bestätigt. Die zusätzliche Kopienzahlvariantionen (CNV) Detektion und Beurteilung der Ergebnisse erfolgte durch Dr. rer. nat. Corinna Ernst mit Hilfe der bioinformatischen Software ExomeDepth Version 1.1.15. Mögliche Sequenzen mit CNVs wurden durch eine MLPA bestätigt. Die MLPA-Analysen erfolgten durch mich mit Unterstützung von Mohamad Kayali. Die Variantenklassifizierung erfolgte durch mich auf

Grundlage der Regularien des ENIGMA Konsortiums. Die Überprüfung erfolgte durch Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jan Hauke und Mohamad Kayali.

Die Methylierungsanalyse der Proben des Studienkollektivs, welche die Bisulfitbehandlung mit anschließender quantitativer PCR sowie die Auswertung der Ergebnisse, umfasst sind nach entsprechender Anleitung durch den Laborleiter der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde am Universitätsklinikum Bonn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dimo Dietrich von mir selbst ausgeführt worden. Die Generierung, Zusammenstellung und Bereitstellung der Proben des Kontrollkollektivs erfolgte durch das Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs der Uniklinik Köln. Die Methylierungsanalyse der Proben und die entsprechende Auswertung der Daten des Kontrollkollektivs erfolgten durch Mohamad Kayali.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware SPSS Version 28.0.1.1. durch mich.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 30.11.2023

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Sealy'. The signature is written in a cursive style with a large, looped 'y' at the end.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während der Zeit der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Rita Schmutzler, die mir trotz großer Distanz die tolle Möglichkeit gegeben hat, an diesem Projekt arbeiten zu dürfen. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Eric Hahnen und Dr. Jan Hauke für die großartige Betreuung und Begleitung während der gesamten Zeit bedanken.

Außerdem gilt mein Dank meinen Eltern Ostara und Jan und besonders meinem Vater, der mir in fachlichen Fragen zur Seite stand und mich in schwierigen Phasen immer wieder ermutigt hat, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Ein großer Dank geht auch an meine beste Freundin Paulina, die mich mit ihrer Expertise besonders bei den Korrekturen sehr unterstützt hat.

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	9
2	Einleitung.....	10
2.1	Diagnostik bei Verdacht auf ein hereditäres Ovarialkarzinom.....	11
2.2	Therapie des Ovarialkarzinoms .....	12
2.3	Präventive Maßnahmen beim hereditären Ovarialkarzinom .....	13
2.4	FIGO- und TMN Klassifikation .....	14
2.5	Histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms .....	16
2.5.1	Assoziation mit Risikogenen.....	17
2.6	Genetischen Grundlagen des hereditären Ovarialkarzinoms.....	18
2.6.1	Knudson-Hypothese – hereditäre Krebserkrankungen.....	18
2.6.2	Risikogene für das Ovarialkarzinom.....	19
2.6.3	Studien zur Mutationsprävalenz Ovarialkarzinom-prädisponierender Gene .....	20
2.7	Epigenetische Modifikation.....	23
2.7.1	Methylierung in der Karzinogenese .....	26
2.7.2	Konstitutive Methylierung .....	27
2.8	Erkrankungsalter beim hereditären Ovarialkarzinom.....	29
2.9	Studien zu einem jungen Erkrankungsalter .....	30
2.10	Zielsetzung und Problemstellung .....	31
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Studienpopulation .....	32
3.2	Kontrollkohorte.....	33
3.3	DNA-Sequenzierung.....	34
3.3.1	Genauswahl .....	34
3.3.2	Proben.....	35
3.3.3	DNA-Konzentrationsmessung und Verdünnung.....	36
3.3.4	Next Generation Sequencing (NGS) .....	36
3.3.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	38
3.3.6	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	39
3.3.7	Sanger Sequenzierung .....	39
3.3.8	Detektion von Kopienzahlvariationen (CNVs) .....	41
3.3.9	Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA).....	42

3.3.10	Variantenklassifikation.....	45
3.4	Methylierungsanalyse.....	45
3.4.1	Vorbereitung der Probenlysate.....	46
3.4.2	Bisulfit-Behandlung.....	46
3.4.3	Aufreinigung.....	47
3.4.4	Quantitative Real-Time PCR.....	47
3.5	Statistik.....	50
4	Ergebnisse.....	51
4.1	<i>BRCA1/2</i> Mutationsprävalenz.....	51
4.1.1	<i>BRCA1/2</i> Mutationsprävalenz in der Gesamtkohorte aller OC Fälle des GC-HBOC 51	
4.1.2	<i>BRCA1/2</i> -Mutationsprävalenz in der Gruppe der Patientinnen mit einem Erkrankungsalter $\leq 40$ Jahren bei Erstdiagnose.....	53
4.2	Mutationsprävalenz der gesicherten OC-Gene und OC-Kandidatengene.....	53
4.3	Altersabhängigkeit der Mutationsprävalenz in nicht- <i>BRCA1/2</i> -Genen.....	55
4.4	Mutationsprävalenz in Bezug zur Familiengeschichte.....	55
4.5	Häufigkeiten histologischer Subtypen.....	56
4.6	Histologische Subtypen und detektierte Varianten.....	57
4.7	Konstitutive Methylierung der Promotorregion des <i>BRCA1</i> -Gens.....	58
4.7.1	Konstitutive Methylierung der Promotorregion des <i>BRCA1</i> -Gens in Bezug zur familiären Belastung.....	59
4.7.2	Konstitutive Methylierung der Promotorregion des <i>BRCA1</i> -Gens im Abhängigkeit vom Erkrankungsalter.....	60
4.7.3	Konstitutive Methylierung der Promotorregion des <i>BRCA1</i> -Gens in der Kohorte der jung-erkrankten Frauen im Vergleich zur Kontrollkohorte.....	60
5	Diskussion.....	62
5.1	<i>BRCA1/2</i> -Mutationsprävalenz.....	62
5.2	Mutationsprävalenz in der Kohorte der jung-erkrankten Frauen.....	62
5.3	Mutationsprävalenz in nicht- <i>BRCA1</i> gesicherten OC-Genen und OC-Kandidatengenen.....	63
5.4	Mutationsprävalenzen in Bezug zur familiären Belastung.....	64
5.5	Histologie der Tumoren.....	64

5.6	Konstitutive Methylierung der Promotorregion des <i>BRCA1</i> -Gens in der Kohorte der jung-erkrankten Frauen im Vergleich zu einer Kontrollkohorte .....	65
5.7	Limitationen.....	66
6	Literaturverzeichnis .....	68



## Abkürzungsverzeichnis

ABS	Acrylnitril-Butadin-Styrol
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
BC	Brustkrebs (engl. Breast Cancer)
BSO	Beidseitige Salpingo-Oophorektomie
CC	Klarzelliges Karzinom (engl. Clear Cell Carcinoma)
CCG	Cologne Center for Genomics
CNV	Kopienzahlvariation (engl. Copy Number Variant)
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
EC	Endometrioides Karzinom
ED	Erstdiagnose
ENIGMA	Evidenzbasiertes Netzwerk zur Interpretation von Keimbahnmutation (engl. Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles)
FIGO	Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe (franz. Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique)
GC-HBOC	Deutsches Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs (engl. German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer)
HBOC	Erblicher Brust- und Eierstockkrebs (engl. Hereditary Breast and Ovarian Cancer)
HGSC	High-grade seröses Karzinom
HR	Homologe Rekombination
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung (engl. International Agency for Research on Cancer)
IMISE	Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie
KI	Konfidenzintervall
LGSC	Low-grade seröses Karzinom
MC	Muzinöses Karzinom
MLPA	Multiplxe ligationsabhängige Sondenamplifikation (engl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)
MMR	Mismatch-Reparatur
NGS	Next Generation Sequenzierung
OC	Ovarialkarzinom (engl. Ovarian Cancer)
OR	Quotenverhältnis (engl. Odds Ratio)
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PV	Pathogene Variante
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. Revolutions per Minute)
SCCOHT	Kleinzelliges Ovarialkarzinom vom hyperkalzämischen Typ (engl. Small Cell Carcinoma of the Ovary, Hypercalcemic Type)
SCCOPT	Kleinzelliges Ovarialkarzinom vom pulmonalen Typ (engl. Small Cell Carcinoma of the Ovary, Pulmonary Type)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organisation)

## 1 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom (OC) gehört zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen bei Frauen. Durch die Abwesenheit spezifischer Symptome und das Fehlen geeigneter Früherkennungsmaßnahmen wird die Erkrankung häufig in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. In bis zu 18% der Fälle lässt sich die Erkrankung auf eine hereditäre Prädisposition zurückführen.<sup>1</sup> Neben den etablierten Brustkrebsgenen *BRCA1* und *BRCA2* konnten bereits weitere Risikogene für das Ovarialkarzinom identifiziert werden.

Die Prävalenz von Keimbahnmutationen in *BRCA1* und *BRCA2* bei früherkrankten OC-Patientinnen ist vergleichsweise gering. Von 4.975 erkrankten Patientinnen des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs (GC-HBOC) trugen 35/433 OC-Patientinnen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 35$  Jahren *BRCA1/2*-Mutationen (8,1 %); dieser Anteil stieg auf 20,0 % (146/729) bzw. 37,4 % (752/2012) bei einem Schwellenwert von  $\leq 40$  bzw.  $\leq 50$  Jahren bei Erstdiagnose (ED). Abgesehen von weiteren OC-Risikogenen, die mit einem frühen Erkrankungsalter assoziiert sein können, wurde kürzlich vermutet, dass konstitutive *BRCA1*-Promotor-Hypermethylierung, die in aus Blut stammender DNA messbar ist, einen weiteren Risikofaktor für OC darstellen könnte. In der vorliegenden Studie wurde ein Kollektiv von 455 *BRCA1/2*-Mutations-negativen OC-Patientinnen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren auf Keimbahnmutationen in weiteren etablierten OC-Risikogenen (*BRIP1*, *RAD51C/D*, *MSH2/6*, *PALB2*) und OC-Kandidatengenen (*ATM*, *MLH1*, *MRE11A*, *NBN*, *PMS2*, *RAD50*, *TP53*, *SMARCA4*) untersucht. Des Weiteren wurde die *BRCA1*-Promotor-Methylierung aus Blut stammender DNA bei 423 dieser Patientinnen und weiteren 476 weiblichen krebsfreien Kontrollpersonen quantifiziert.

Pathogene Keimbahnmutationen in zusätzlichen OC-Risikogenen wurden bei 24 der 455 Patienten identifiziert (5,27%). Die quantitative Methylierungsanalyse ergab bei 26 der 423 untersuchten OC-Patienten (6,1 %) eine *BRCA1*-Promotor-Hypermethylierung ( $\geq 5$  % Cut-off), die signifikant höher war als im Kontrollkollektiv (7/476, 1,5 %, OR: 4,39, 95 % KI : 1,79-11,22,  $p = ,000$ ). Die Ergebnisse bleiben signifikant mit einem Cut-off von  $\geq 2$  % (36/423 Fälle vs. 20/476 im Kontrollkollektiv; OR: 2,12,  $p = ,008$ ). Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Studie unterstützen die Hypothese, dass erworbene *BRCA1*-Hypermethylierung einen OC-Risikofaktor darstellt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die *BRCA1*-Promotor-Hypermethylierung auch in dem entsprechenden Tumorgewebe nachzuweisen und somit als ätiologisch für die Erkrankung zu identifizieren.

## 2 Einleitung

Im Jahr 2020 lag die geschätzte Anzahl neu diagnostizierter Ovarialkarzinome weltweit bei etwa 313.000 Fällen. Somit gehörte das Ovarialkarzinom 2020 weltweit zu den zehn häufigsten neu diagnostizierten Krebserkrankungen bei Frauen.<sup>2</sup> In Deutschland erkranktem im Jahr 2018 7.300 Frauen an einem Ovarialkarzinom.<sup>3</sup> Da die Erkrankung oft in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird, liegt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate bei 49,1%.<sup>4</sup>

Allgemein liegt das Lebenszeitrisiko der Erkrankung bei 1,2%.<sup>4</sup> Ein deutlich erhöhtes Risiko haben Frauen mit einer familiären Belastung von Brust- und Eierstockkrebs.<sup>5</sup>

In 13-18% aller Fälle von Eierstockkrebs handelt es sich um ein hereditäres Ovarialkarzinom als Bestandteil des Krankheitsbildes des erblichen Brust- und Eierstockkrebs (HBOC).<sup>1,6,7</sup> Ursächlich für dieses Tumorsyndrom sind Keimbahnmutationen in Genregionen, die zu einem Funktionsverlust des jeweiligen Genproduktes führen. Die meisten deletären Mutationen treten in den Hochrisikogenen *BRCA1* und *BRCA2* auf.<sup>8</sup>

*BRCA1* wurde erstmalig 1990 von Hall et al. als mögliche genetische Ursache für Brustkrebs beschrieben und auf dem langen Arm von Chromosom 17 Genlokus q21 lokalisiert.<sup>9</sup> *BRCA2* wurde 1995 von Wooster et al. als zweites Brustkrebsgen identifiziert und auf Chromosom 13 Genlokus q12-q13 verortet.<sup>10</sup> Nach heutigem Forschungsstand weiß man, dass pathogene Varianten in beiden Genen *BRCA1* und *BRCA2* stark mit Brust- und Eierstockkrebs assoziiert sind und das Risiko einer Erkrankung deutlich steigern.<sup>1,5-7,11-14</sup>

Außerdem konnten in der Vergangenheit auch weitere Risikogene für das hereditäre Ovarialkarzinom identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Trägerinnen von Mutationen in den sogenannten Mismatch-Reparatur (MMR) Genen neben einer Darmkrebsprädisposition auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Ovarialkarzinomen haben.<sup>15,16</sup> Ein erhöhtes Risiko lässt sich auch bei Mutationen in weiteren Genen, deren Produkte in dem gleichen DNA-Reparaturmechanismus wie die der *BRCA*-Gene partizipieren, beobachten.<sup>1,7,11</sup>

Die Diagnose eines hereditären Ovarialkarzinoms, dem ein autosomal-dominanter Erbgang mit unvollständiger Penetranz zugrunde liegt, ist besonders für die Angehörigen der erkrankten Frauen von enormer Relevanz. Durch eine molekulargenetische Testung haben nicht-erkrankte Angehörige die Möglichkeit, die Mutation entweder für sich ausschließen zu können oder bei dem Nachweis ihr Erkrankungsrisiko durch präventive Maßnahmen zu mindern.<sup>8</sup>

Neben deletären Mutationen, die mit einer Veränderung der Basenabfolge der DNA einhergehen, gibt es auch epigenetische Faktoren, die zu einer veränderten Expression eines bestimmten Genabschnittes führen können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Methylierung der Promotorregion des *BRCAl*-Gens zu einem Stummschalten des Gens und somit zu einem Verlust des Genprodukts führen kann.<sup>17,18</sup> Dieser Mechanismus hat also letztendlich ähnliche Auswirkungen wie deletäre Genmutationen.

Bei einigen Krebserkrankungen, wie dem Koloretalenkarzinom, dem Nierenkarzinom oder dem Mammakarzinom wurde in der Vergangenheit festgestellt, dass gerade ein frühes Erkrankungsalter auf eine genetische Prädisposition hinweist.<sup>9,19,20</sup> Da das mediane Erkrankungsalter bei Erstdiagnose eines Ovarialkarzinoms bei 63 Jahren liegt und nur 12% aller Patientinnen vor einem Alter von 45 Jahren erkranken<sup>4</sup>, gibt es bislang wenige Studien, die sich exklusiv den jungen Frauen mit Ovarialkarzinom widmen.

## **2.1 Diagnostik bei Verdacht auf ein hereditäres Ovarialkarzinom**

In der 2022 veröffentlichten Version des Leitlinienprogramms Onkologie der Deutschen Krebsgesellschaft, der Deutschen Krebshilfe und der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft e.V. (AWMF) werden Empfehlungen und Richtlinien für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumore gegeben.<sup>8</sup>

Da in etwa 13-18% der Fälle eine hereditäre Prädisposition der Erkrankung zugrunde liegt, ist die genetische Testung als Teil der Diagnostik von großer Bedeutung.<sup>6,12</sup>

Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) hat auf Grundlage verschiedener Studien bestimmte Einschlusskriterien formuliert, auf Basis derer eine genetische Testung empfohlen wird.<sup>21</sup> Bei Verdacht auf eine genetische Prädisposition wird immer ein erkranktes Familienmitglied getestet. Eine prädiktive Testung gesunder Familienangehöriger erfolgt nur nach vorherigem Nachweis einer pathogenen Variante innerhalb der Familie. Falls trotz familiärer Häufung keine erkrankte Person zur Indextestung zur Verfügung steht, kann eine Paneltestung gesunder Angehöriger erwogen werden.<sup>22</sup>

Bereits in der 2019 veröffentlichten Version der Leitlinien zum malignen Ovarialkarzinom wird auf Grundlage der AGO-TR1 Studie der Studiengruppe AGO empfohlen, dass alleine die Diagnose der Erkrankung am Ovarialkarzinom Anlass zu einem Beratungsgespräch und molekulargenetischer Testung gibt.<sup>22</sup>

Im Rahmen der AGO-TR1 Studie wurde untersucht, ob bestimmte Risikofaktoren definiert werden können, welche eine genetische Testung indizieren und welche Gene bei einer

Testung zu untersuchen sind. Die Ergebnisse der Studie führten dazu, dass die Kosten für eine genetische Testung für alle Versicherten der Mitglieder-Krankenkassen des Verbandes der Ersatzkassen und Mitglieder des Verbandes der Privaten Krankenversicherung e.V. bei einem Erkrankungsalter unter 80 Jahren übernommen werden. Außerdem wird empfohlen die genetische Testung über ein umfangreiches Genpanel durchzuführen, da die *BRCA1/2* Testung nicht ausreichend ist, da auch Mutationen in weiteren Genen zu einem erhöhten OC-Risiko führen.<sup>12</sup>

## 2.2 Therapie des Ovarialkarzinoms

Bei der Therapie des Ovarialkarzinoms ist das primäre Ziel die vollständige makroskopische Resektion des Tumors. In der Primärtherapie wird in allen Stadien, außer im frühesten Stadium IA Grad 1, eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Patientinnen mit einem frühen Ovarialkarzinom (FIGO I-IIA) wird eine Monotherapie mit dem platinhaltigen Zytostatikum Carboplatin empfohlen. Bei dem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO IIB-IV) soll eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel angeboten werden. Ab dem Stadium IIIB kann eine zusätzliche Therapie mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab erwogen werden. Bei Auftreten eines Rezidivs gibt es Unterschiede in der Behandlung. Tritt ein Rezidiv des Ovarialkarzinoms bereits innerhalb von sechs Monaten nach der systemischen Primärtherapie mit einem platinhaltigen Zytostatikum auf, wird das Ovarialkarzinom als platinresistent klassifiziert. Bei Auftreten zu einem späteren Zeitpunkt zwischen sechs und zwölf Monaten spricht man von dem Rezidiv eines platinsensitiven Ovarialkarzinoms. Patientinnen mit einem platinresistenten Ovarialkarzinom sollen in der Rezidivtherapie eine nicht-platinhaltige Monotherapie erhalten, wohingegen eine platinhaltige Kombinationstherapie für Patientinnen mit dem Rezidiv eines platinsensitiven Ovarialkarzinoms angeboten werden soll. Bei Ansprechen des Rezidivs auf die erneute platinhaltige Therapie kann eine Erhaltungstherapie mit einem Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP)-Inhibitor in Betracht gezogen werden.<sup>22</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass Frauen mit einer nachgewiesenen *BRCA1/2*-Mutation ein signifikant besseres Ansprechen auf die Erhaltungstherapie mit PARP-Inhibitoren zeigten.<sup>23,24</sup> Somit kann gesagt werden, dass nach heutigem Stand die Bestätigung einer *BRCA1/2* Mutation ein prognostischer Faktor für das Ansprechen des platinsensitiven Ovarialkarzinoms in der Erhaltungstherapie mit PARP-Inhibitoren nach Rezidivtherapie ist.

### 2.3 Präventive Maßnahmen beim hereditären Ovarialkarzinom

Die genetische Testung für Angehörige einer Patientin mit hereditärem Ovarialkarzinom bietet diesen die Chance, entweder eine genetische Prädisposition für sich ausschließen zu können oder sich bei einer Bestätigung für präventive Maßnahmen zu entscheiden.<sup>22</sup>

Bei Trägerinnen pathogener Varianten in den *BRCA*-Genen stehen den Betroffenen präventive Maßnahmen zur Senkung des Erkrankungsrisikos für Brust- und Eierstockkrebs zur Verfügung. Die Gene *BRCA1* und *BRCA2* wurden in den 90-er Jahren ursprünglich als Brustkrebs-prädisponierende Gene beschrieben. Auf Grundlage des aktuellen Forschungsstandes ist bekannt, dass pathogene Keimbahnvarianten in beiden Genen das Risiko einer Brust- und Eierstockkrebserkrankung deutlich steigern. So liegt das kumulierte Risiko einer Erkrankung bis zum 80. Lebensjahr bei *BRCA1*-Mutationsträgerinnen bei 72% für Brustkrebs und bei 44% für Eierstockkrebs. Bei Trägerinnen pathogener Varianten in *BRCA2* liegt das kumulierte Risiko einer Erkrankung bis zum 80. Lebensjahr bei 69% für Brustkrebs und 17% für Eierstockkrebs.<sup>25</sup>

Tabelle 1: Kumuliertes Erkrankungsrisiko

	Brustkrebs	Eierstockkrebs
<i>BRCA1</i> -Mutationsträgerinnen	72%	44%
<i>BRCA2</i> -Mutationsträgerinnen	69%	17%

*Kumuliertes Erkrankungsrisiko bis zu einem Alter von 80 Jahren zusammengefasst auf Grundlage der Studie von Kuchenbaecker et al. (2017)*<sup>25</sup>

Präventive Maßnahmen ermöglichen eine deutliche Minderung des Erkrankungsrisikos.

Die effektivste Methode zur Senkung des Brustkrebsrisikos stellt die beidseitige prophylaktische Mastektomie dar<sup>26</sup>, alternativ können sich Patientinnen jedoch auch zu der Teilnahme an einem speziellen Früherkennungsprogramm entscheiden<sup>27</sup>. Diese intensivierten Früherkennungsmaßnahmen richten sich nach dem individuellen Risiko und umfassen die Magnetresonanztomographie, Mammographie und die Mammasonographie.<sup>28</sup>

Im Gegensatz zum Mammakarzinom gibt es beim Ovarialkarzinom keine etablierten Screening-Methoden zur Früherkennung der Erkrankung. Studien zu geeigneten Früherkennungsmethoden, wie dem Transvaginalen Ultraschall oder dem Tumormarker CA-125, konnten sowohl bei familiären Fällen als auch in der Normalbevölkerung keinen signifikanten Effekt auf die Mortalität zeigen.<sup>29,30</sup>

Somit stellt die einzige präventive Maßnahme zur Senkung des Risikos einer Eierstockkreberkrankung bei hereditärer Prädisposition die bilaterale Salpingo-Oophorektomie (BSO) dar.<sup>31</sup>

Das Leitlinienprogramms Onkologie gibt vor, dass jede nicht-erkrankte Frau mit einer nachgewiesenen *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutation oder anderen Risikofaktoren eine Beratung über die Möglichkeit einer präventiven Operation erhalten sollte.<sup>8</sup> Eine im Jahr 2014 veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass eine präventive BSO bei Frauen mit nachgewiesener *BRCA1/2*-Mutation zu einer signifikanten Minderung (80%) des Risikos eines Ovarial-, Tuben- und Peritonealkarzinoms sowie signifikanten Verringerung (70%) der Mortalität führte.<sup>32</sup> In der 2022 veröffentlichten Version des Leitlinienprogramms Onkologie wird die präventive BSO erstmalig sowohl für *BRCA1/2*-Mutationsträgerinnen als auch für Trägerinnen deletärer Mutationen in weiteren mit dem Ovarialkarzinom assoziierten Risikogenen empfohlen.<sup>8,22</sup> Die präventive BSO wird *BRCA1*-Mutationsträgerinnen ab einem Alter von 35-40 Jahren und *BRCA2*-Mutationsträgerinnen ab einem Alter von 40-45 Jahren empfohlen. Zudem soll das jüngste Erkrankungsalter betroffener Angehöriger sowie die Familienplanung individuell berücksichtigt werden.<sup>8</sup>

## 2.4 FIGO- und TMN Klassifikation

Laut des Leitlinienprogramms Onkologie soll die Tumorklassifikation immer der TMN-Klassifikation folgend angegeben und kann durch die FIGO-Klassifikation ergänzt werden.<sup>8</sup>

Die TMN Klassifikation bezieht sich auf die Ausdehnung des Primärtumors (T), den Lymphknotenbefall (N) und das Vorhandensein von lokalen oder Fernmetastasen (M).<sup>33</sup>

Die FIGO-Klassifikation ist ein Klassifikationssystem der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) für gynäkologische Tumore und soll neben der TMN Klassifikation der World Health Organisation (WHO) eine standardisierte Terminologie für das Staging von Ovarialkarzinomen ermöglichen. Zuletzt hat das FIGO Oncology Committee eine überarbeitete Version des Klassifikationssystems im Jahr 2014 publiziert.<sup>34</sup> Dieses Klassifikationssystem wird in der folgenden Tabelle zusammengefasst und entsprechend der WHO-Klassifikation dargestellt.

Tabelle 2: FIGO Klassifikation mit entsprechender TMN Klassifikation

FIGO Klassifikation		TMN
Stage I	Tumor begrenzt auf die Ovarien und Tuben	T1-N0-M0
IA	Tumor ist auf ein Ovar oder Eileiter begrenzt Kapsel intakt kein Tumorwachstum bis auf die Organoberfläche keine malignen Zellen in der Spülzytologie	T1a-N0-M0
IB	Tumor ist auf beide Ovarien oder Tuben begrenzt Kapsel ist intakt kein Tumorgewebe bis auf die Organoberfläche keine malignen Zellen in der Spülzytologie	T1b-N0-M0
IC	Tumor ist auf ein oder beide Ovarien oder Tuben begrenzt mit Nachweis maligner Zellen in der Spülzytologie oder Ruptur der Kapsel oder Tumorwachstum bis auf die Organoberfläche	T1c-N0-M0
Stage II	Ausbreitung des Tumors auf ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Infiltration des kleinen Beckens oder primärer Peritonealkarzinose	T2-N0-M0
IIA	Ausbreitung des Tumors in die Gebärmutter und/oder Tuben und/oder Ovarien	T2a-N0-M0
IIB	Ausbreitung des Tumors auf extragenitale Organe im kleinen Becken	T2b-N0-M0
Stage III	Ausbreitung des Tumors auf ein oder beide Ovarien oder Tuben, oder primäre Peritonealkarzinose mit zytologischem oder histologischem Nachweis der Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder Befall der retroperitonealen Lymphknoten	T1/T2-N1-M0
IIIA	Befall der retroperitonealen Lymphknoten allein oder mikroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne Befall der retroperitonealen Lymphknoten	T3a2-N0/N1-M0
IIIB	Makroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens bis $\leq 2$ cm mit oder ohne Befall der retroperitonealen Lymphknoten	T3b-N0/N1-M0
IIIC	Makroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens bis $> 2$ cm mit oder ohne Befall der retroperitonealen Lymphknoten	T3c-N0/N1-M0
Stage IV	Fernmetastasen	T1-3-N0/N1-M1

In Anlehnung an die Publikation von Prat (2014)<sup>34</sup>



Die meisten Ovarialkarzinome werden in den fortgeschrittenen Stadien FIGO III-IV diagnostiziert.<sup>35</sup> Die 5-Jahres-Überlebensrate bei OC-Erkrankten liegt bei 49,1%.<sup>4</sup> Die Therapiemaßnahmen werden nach dem operativem Staging in Abhängigkeit vom jeweiligen Stadium angepasst.<sup>22</sup>

In Hinsicht auf Unterschiede hereditärer und sporadischer Ovarialkarzinome konnte bei einer Studie von Alsop et al. zur *BRCAl/2*-Mutationsprävalenz in einem Kollektiv von etwa 1.000 Patientinnen festgestellt werden, dass Frauen mit pathogenen *BRCA*-Mutationen gegenüber *BRCA*-negativen Patientinnen im Durchschnitt in einem weiter fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wurden.<sup>13</sup>

## 2.5 Histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms

Insgesamt sind 90% aller Ovarialtumore maligne Tumoren des Epithelgewebes<sup>36</sup> und werden somit als Karzinome bezeichnet.

Basierend auf den verschiedenen Zelltypen lassen sich fünf Subtypen des epithelialen Ovarialkarzinoms definieren. Die Häufigkeitsverteilung dieser Subtypen lässt sich wie folgt aufschlüsseln: Mit 70% aller Ovarialkarzinome sind high-grade seröse Karzinome (HGSC) mit Abstand am häufigsten vertreten. Endometrioides Karzinome (EC) und klarzellige Karzinome (CCC) treten jeweils mit einer Häufigkeit von 10% auf, muzinöse Karzinome (MC) finden sich in 3-4% der Fälle und low-grade seröse Karzinome (LGSC) machen einen Anteil von weniger als 5% aus.<sup>37</sup>

Das HGSC wird oft in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und hat eine schlechtere Prognose als das LGSC.<sup>37-40</sup>

Muzinöse, endometrioides und klarzellige Karzinome werden anders als seröse Karzinome häufiger in frühen Stadien (FIGO-I) diagnostiziert und haben dadurch im Schnitt eine höhere 5-Jahres-Überlebensrate von 66-82%.<sup>35</sup> Die Zellen der meisten muzinösen Tumore ähneln histologisch den Zellen des Gastrointestinaltrakts und sind nur selten bösartig<sup>36,37</sup>, wobei muzinöse Karzinome im selben Tumorstadium jedoch eine schlechtere Prognose im Vergleich zu serösen und endometrioiden Karzinomen haben<sup>41</sup>. Endometrioides Ovarialkarzinome sind dem Korpuskarzinom des Uterus histologisch sehr ähnlich und sind häufig mit einer Endometriose assoziiert.<sup>36,37</sup> Klarzellige Karzinome ähneln dem HGSC in der Zellmorphologie und werden oftmals in frühen Stadien diagnostiziert, wobei sie dann trotzdem eine schlechtere Prognose haben als andere Subtypen in frühen Stadien.<sup>37</sup>

Sehr viel seltener als epitheliale Tumore treten Keimzelltumore (Dysgerminom, embryonales Karzinom, Polyembryom, Teratom und Tumore extraembryonaler Differenzierung) mit 3%

aller Ovarialtumore auf und entstehen aus entarteten Keimzellen.<sup>42</sup> Zusätzlich wird in der Literatur noch das kleinzellige Ovarialkarzinom, welches weder den epithelialen, noch den Keimzelltumoren zugeordnet werden kann, beschrieben. Es handelt sich um eine seltene und aggressive Form des Ovarialkarzinoms und kann weiter in das kleinzellige Ovarialkarzinom vom hyperkalzämischen (SCCOHT) und pulmonalen Typ (SCCOPT) subklassifiziert werden.<sup>43</sup>

### **2.5.1 Assoziation mit Risikogenen**

Auf Basis vorangegangener Studien lässt sich feststellen, dass pathogene Keimbahnmutationen der Gene *BRCA1* und *BRCA2* vorrangig bei Patientinnen mit HGS Karzinomen zu finden sind.<sup>1,6,16</sup> Im Vergleich dazu werden bei endometrioiden und klarzelligen Karzinomen häufiger Keimbahnmutationen in den mit dem Lynch-Syndrom assoziierten MMR-Genen nachgewiesen.<sup>6,15</sup>

Neben Mutationen in den *BRCA*- und MMR-Genen gibt es weitere Risikogene, die ursächlich für eine Eierstockkrebserkrankung sind. In einer umfangreichen Studie zum Einfluss von *BRIP1*-Mutationen auf die Entstehung von Brust- und Eierstockkrebs konnte gezeigt werden, dass bei der Mehrzahl der Patientinnen mit nachgewiesener *BRIP1*-Mutation eine HGS Tumorhistologie zu finden war.<sup>44</sup> Auch in einer weiteren Studie zeigte sich, dass die Mehrheit der Trägerinnen pathogener Mutationen in *RAD51C* und *RAD51D* (77%) an einem HGS Karzinom erkrankt waren.<sup>45</sup> Es kann jedoch gesagt werden, dass pathogene Mutationen in *BRCA1*, *BRCA2* und weiteren Eierstockkrebs-prädisponierenden Genen in allen fünf Subtypen des epithelialen Ovarialkarzinoms nachgewiesen werden konnten und somit bei keinem Subtyp eine hereditäre Ursache ausgeschlossen werden kann.<sup>1,6,15,16</sup>

Die seltene Diagnose des Ovarialkarzinoms vom hyperkalzämischen Typ tritt vorrangig bei jungen Frauen auf und zeigt eine starke Assoziation mit pathogenen Varianten des *SMARCA4*-Gens.<sup>46-48</sup>

## 2.6 Genetischen Grundlagen des hereditären Ovarialkarzinoms

Durch vergangene Forschung ist bekannt, dass die Ursache einiger Tumorerkrankungen auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen ist. Alfred Knudsons „Two-Hit“-Theorie beschreibt die theoretische Grundlage zur Entstehung dieser hereditären Krebserkrankungen.

### 2.6.1 Knudson-Hypothese – hereditäre Krebserkrankungen

Die „Two-Hit“-Theorie zur Karzinogenese wurde 1971 von Alfred Knudson<sup>49</sup> formuliert und war wegweisend für das Verstehen der Entwicklung von hereditären onkologischen Erkrankungen und der Bedeutung von Tumorsuppressorgenen<sup>50</sup>. Auf Grundlage seiner Forschungen zum hereditären Retinoblastom stellte Knudson die Theorie auf, dass die Erkrankung durch zwei Mutationsereignisse entsteht. Im Fall einer hereditären Erkrankung wird die erste Mutation „First Hit“ bereits über die Keimbahn vererbt und die zweite Mutation „Second Hit“ geschieht immer als sporadisches Ereignis in somatischen Zellen. In der nicht-hereditären Form der Erkrankung finden beide Mutationsereignisse in somatischen Zellen statt.<sup>49,51</sup> Das zweite Mutationsereignis führt somit zu einem Verlust der Heterozygotie der beiden Allele des Tumorsuppressorgens, wodurch beide inaktiviert werden und nicht mehr funktionstüchtig sind.<sup>52</sup>

Die Produkte von Tumorsuppressorgenen verhindern die Proliferation entarteter Zellen. Im Fall von *BRCA1* und *BRCA2* und weiteren Eierstockkrebs-prädisponierenden Genen sind ihre Produkte an einem bestimmten DNA-Reparaturmechanismus des DNA-Doppelstrangbruchs beteiligt.<sup>53</sup> Kommt es bei Trägerinnen pathogener Varianten in einem der Eierstockkrebs-prädisponierenden Gene durch ein zweites Mutationsereignis zu dem Verlust der Heterozygotie, kann das Produkt des jeweiligen Gens nicht mehr gebildet werden und die Regulation der entarteten Zellen entfällt.

## 2.6.2 Risikogene für das Ovarialkarzinom

Die Datenlage zu der Mutationsprävalenz bekannter Risikogene bei Eierstockkrebs variiert und liegt je nach Studie bei etwa 13%-18%, wobei der größte Anteil der pathogenen Varianten in den Brustkrebsgenen *BRCA1* und *BRCA2* zu finden ist.<sup>1,6,7</sup> So ist generell bei 8%-15% der Fälle von Eierstockkrebs die Erkrankung auf pathogene Varianten in *BRCA1* und *BRCA2* zurückzuführen.<sup>1,6,13</sup> Je nach untersuchtem Studienkollektiv ergeben sich Unterschiede in der Mutationsprävalenz. Studien von Harter et al. und Alsop et al. zeigten eine *BRCA1/2* Mutationsprävalenz von 32-39% in einem Patientenkollektiv mit positiver Familiengeschichte.<sup>12,13</sup>

Tabelle 3: Anteil pathogener Varianten in *BRCA1/2*

	Anteil pathogener Varianten in <i>BRCA1/2</i>
Ovarialkarzinom – unselektiert*	8-15% <sup>1,6,13</sup>
Ovarialkarzinom – familiär	32-39% <sup>12,13</sup>

\* Unselektierte Kohorten im Hinblick auf familiäre Häufung von Brust- und Eierstockkrebs

Das *BRCA1*- und *BRCA2*-Protein ist Teil eines bestimmten DNA-Reparaturmechanismus, der Homologen Rekombination (HR). Der Mechanismus der HR greift im Fall eines DNA-Doppelstrangsbruchs, welcher in Folge von exogenen und endogenen Faktoren auftritt und die genomische Stabilität gefährdet. Die HR ermöglicht die Reparatur des beschädigten Abschnittes, wobei das Schwesterchromatid als eine Art Schablone dient.<sup>54</sup> Neben *BRCA1* und *BRCA2* zählen auch *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *MRE11A*, *RAD50*, *FAM175A* und *TP53* zu den HR-Genen und partizipieren in demselben Mechanismus.<sup>38</sup>

Nach aktuellem Stand der Forschung gehören auch *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1* und *PALB2* zu den etablierten Eierstockkrebsgenen.<sup>11,44,45,55</sup> Zudem konnten in der Vergangenheit positive Assoziationen zwischen Eierstockkrebs und pathogenen Varianten in den MMR-Genen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* gezeigt werden.<sup>15,16</sup> Mutationen in diesen Genen sind vor allem ursächlich für das Lynch-Syndrom, das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis.<sup>56</sup>

### **2.6.3 Studien zur Mutationsprävalenz Ovarialkarzinom-prädisponierender Gene**

Im Folgenden sollen ausgewählte Studien, welche sich mit der Assoziation bestimmter Krebsprädisponierender Gene und Eierstockkrebs beschäftigt haben, vorgestellt werden. Zwei dieser Studien von Norquist et al. und Lilyquist et al. untersuchten jeweils große Kollektive von Patientinnen mit Ovarialkarzinom mithilfe eines Multigenpanels molekulargenetisch.<sup>1,11</sup> In einer 2020 publizierten umfangreichen Studie von LaDuca et al. wurden insgesamt 165.000 Patienten auf Keimbahnmutationen in insgesamt 32 Krebs-Suszeptibilitätsgenen untersucht und mit einer Kontrollkohorte verglichen. Ein Großteil der Probanden (72,5%) hatte zum Zeitpunkt der Analysen eine persönliche Krebs-Historie. Von diesen Patienten waren insgesamt 12.602 Patientinnen entweder zur Zeitpunkt der Studie oder in der Vergangenheit an Eierstockkrebs erkrankt.<sup>7</sup> Diese drei Studien wurden als Fall-Kontroll-Studien so designt, dass die Häufigkeit detektierten pathogener Varianten in der Studienkohorte mit der Häufigkeit in mindestens einer Kontrollkohorte verglichen wurde. Eine vierte Studie von Carter et al. evaluierte bei einem Studienkollektiv von 4.439 an Eierstockkrebs erkrankten Patientinnen die relativen Häufigkeiten pathogener Varianten in bekannten Krebsgenen.<sup>6</sup> Die Studienkohorten waren in allen vier Studien unselektiert in Hinblick auf Alter, medizinische Familienhistorie der Probanden und histologischen Subtyp der Ovarialtumoren. Im Folgenden werden die Ergebnisse alle vier Studien tabellarisch dargestellt.

Tabelle 4: Studien zur Assoziation ausgewählter Risikogene mit dem Ovarialkarzinom

	Lilyquist et al. <sup>11</sup>	Norquist et al. <sup>1</sup>	LaDuca et al. <sup>7</sup>	Carter et al. <sup>6</sup>
Studienkohorte	n=7.768 OC Fälle	n=1.915 OC Fälle	n=12.602 OC Fälle	n=4.439 OC Fälle
Jahr der Veröffentlichung	2017	2016	2020	2018
Art der Studie	Fall-Kontroll	Fall-Kontroll	Fall-Kontroll	Kohortenstudie
				Pathogene Varianten wurden in 13,2% der OC Fälle gefunden
				<b>Von allen detektierten Varianten</b>
<b>BRCA1/2</b>				54% in BRCA1/2
<i>BRCA1</i>	Positiv	Positiv	Positiv	
<i>BRCA2</i>	Positiv	Positiv	Positiv	
<b>MMR-Gene</b>				8,5% MMR-Genen
<i>MLH1</i>	Keine	Positiv	*	
<i>MSH2</i>	Positiv	Positiv	Positiv	
<i>MSH6</i>	Positiv	Positiv	Positiv	
<i>PMS2</i>	Keine	Positiv	Positiv	
<b>Nicht-BRCA HR-Gene</b>				33,7% in nicht-BRCA1/2 HR Genen
<i>ATM</i>	Positiv	Fraglich	Positiv	5,6%
<i>BARD1</i>	Keine	Positiv	Keine	
<i>BRIP1</i>	Positiv	Positiv	Positiv	5,6%
<i>CHEK2</i>	Keine	Keine	Keine	10,5%
<i>NBN</i>	Positiv	Keine	Positiv	
<i>PALB2</i>	Positiv	Positiv	Keine	
<i>RAD51C</i>	Positiv	Positiv	Positiv	<i>RAD51C</i> 4,6%
<i>RAD51D</i>	Positiv	Positiv	Positiv	<i>RAD51D</i> 2,3%
<i>MRE11A</i>	Keine	Keine	Keine	
<i>RAD50</i>	Keine	Keine	Keine	
<i>FAM175A</i>	nicht evaluiert	Keine	nicht evaluiert	
<i>TP53</i>	nicht evaluiert	Fraglich	Positiv	

\*Beurteilung nicht möglich

Assoziation der Risikogene mit dem Ovarialkarzinom klassifiziert in Positiv; Keine; Fraglich

In allen drei Fall-Kontroll-Studien wurden starke positive Assoziationen zwischen *BRCA1* und *BRCA2* und Eierstockkrebs gefunden.<sup>1,7,11</sup> Dies konnte durch die Studie von Carter et al. bestätigt werden, in der 54% aller detektierten pathogenen Varianten in den beiden Brustkrebsgenen gefunden werden konnten.<sup>6</sup> In Hinblick auf die MMR-Gene konnten alle Studien positive Assoziationen feststellen. Auch wenn Assoziationen einzelner MMR-Gene, wie bei Lilyquist et al. aufgrund der geringen Anzahl pathogener Varianten in *MLH1* oder fehlender Abdeckung bestimmter Exone in *PMS2* der Kontrollgruppe, nicht evaluiert werden konnten<sup>11</sup>, kamen alle Studien zu dem Schluss dass die MMR-Gene als Kollektiv eine positive Assoziation mit Eierstockkrebs aufweisen<sup>1,6,7,11</sup>. Von allen detektierten pathogenen Varianten in der Studie von Carter et al. waren 8,5% in den MMR-Genen zu finden.<sup>6</sup> In weiteren HR-Genen kamen die Studien teils zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine positive Assoziation von *ATM* konnte in der Studie von Norquist et al. nicht hinreichend geklärt werden.<sup>1</sup> Die Rolle von *BARD1* ist nicht eindeutig, da Norquist et al. zwar eine signifikant erhöhte Mutationsprävalenz finden konnten<sup>1</sup>, Lilyquist et al. jedoch keine Assoziation aufzeigten und *BARD1* als Risikogen in den übrigen beiden Studien nicht evaluiert wurde<sup>11</sup>. Einigkeit über die positive Assoziation herrscht bei den bereits etablierten Eierstockkrebsgenen *BRIP1*, *RAD51C* und *RAD51D*.<sup>1,6,7,11</sup>

Eine positive Assoziation konnte bei *CHEK2* ausgeschlossen werden.<sup>1,7,11</sup> Die bei Carter et al. detektierte Mutationsprävalenz von 1,4% in *CHEK2* könnte auch auf eine zusätzliche familiäre Brustkrebsbelastung zurückzuführen sein und bedarf weiterer Untersuchungen.<sup>6</sup> Eine positive Assoziation von *NBN* konnte nur von Lilyquist et al. gezeigt werden.<sup>11</sup> Im Hinblick auf die Mutationsprävalenz von *PALB2* in Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigten Lilyquist et al. und Norquist et al. eine signifikant erhöhte Mutationsprävalenz, was nicht durch die Ergebnisse von LaDuca et al. bestätigt werden konnte.<sup>1,7,11</sup> Eine weitere im Jahr 2020 veröffentlichte Studie von Yang et al. konnte jedoch eine positive Assoziation zwischen pathogenen Varianten in *PALB2* und Eierstockkrebs feststellen.<sup>55</sup> Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass pathogene Varianten in *PALB2* zu einem geringen bis moderat erhöhten Eierstockkrebsrisiko führen und *PALB2* zu den etablierten Eierstockkrebsgenen gezählt werden kann.<sup>57</sup> Eine Assoziation zwischen Eierstockkrebs und den Genen *MRE11A* und *RAD50* konnte einstimmig ausgeschlossen werden. Die Rolle von *TP53* hingegen konnte durch die vorliegenden Studien noch nicht hinreichend geklärt werden. Es kann also gesagt werden, dass *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1* und *PALB2* als etablierte Eierstockkrebsgene bestätigt werden konnten. Zudem ist die prädisponierende

Rolle pathogener Varianten in den MMR-Genen gezeigt worden.<sup>1,6,7,11</sup> Die Rolle weiterer HR-Gene ist widersprüchlich und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Mutationsprävalenzen der evaluierten Gene werden folgend tabellarische dargestellt.

Tabelle 5: Mutationsprävalenzen (%) in den Studienkollektiven der vorgestellten Studien

	Lilyquist et al. <sup>11</sup>	Norquist et al. <sup>1</sup>	LaDuca et al. <sup>7</sup>	Carter et al. <sup>6</sup>
<b>BRCA1/2</b>				7,4
<i>BRCA1</i>	4,0	9,5	4,5	
<i>BRCA2</i>	3,4	5,1	3,3	
<b>MMR-Gene</b>				1,2
<i>MLH1</i>	0,1	0	0,1	
<i>MSH2</i>	0,4	0	0,2	
<i>MSH6</i>	0,7	0,2	0,4	
<i>PMS2</i>	0,4	0,2	0,4	
<b>Nicht-BRCA1/2</b>				
<b>HR-Gene</b>				
<i>ATM</i>	0,9	0,6	0,9	0,7
<i>BARD1</i>	0,1	0,2	0,1	0,2
<i>BRIP1</i>	1,0	1,4	0,9	0,7
<i>CHEK2</i>	0,4	0,6	0,7	1,4
<i>NBN</i>	0,4	0,5	0,3	*
<i>PALB2</i>	0,4	0,6	0,2	0,4
<i>RAD51C</i>	0,8	0,6	0,9	0,6
<i>RAD51D</i>	0,3	0,6	0,4	0,3

\*Beurteilung nicht möglich

## 2.7 Epigenetische Modifikation

Epigenetische Modifikation beschreibt einen natürlichen Prozess der Regulierung der Genexpression, welche unabhängig von einer Veränderung der Basenabfolge von einer Zell-Generation an Tochterzellen weitergegeben werden kann.<sup>58,59</sup> Eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen in der epigenetischen Modifikation ist bekannt und zu den Schlüsselprozessen zählen die DNA-Methylierung, die Histonmodifikation und die RNA-Interferenz. Diese epigenetischen Mechanismen können zu einer Änderung des Phänotypen führen, indem sie regulieren, ob Gene entweder transkribiert oder durch Silencing stummgeschaltet werden.<sup>58</sup> Gen-Silencing beschreibt die Hemmung der Transkription eines bestimmten DNA-Abschnittes. Dieser Mechanismus ist zum Beispiel bei der X-Inaktivierung oder der genomischen Prägung, dem Imprinting, von fundamentaler Bedeutung.<sup>60</sup>



Eine Störung dieser natürlichen epigenetischen Prozesse kann zu einer fälschlichen Expression oder Stummschaltung eines Gens führen und so die normale Genfunktion beeinträchtigen. Besonders die DNA-Methylierung in der Karzinogenese ist ein umfangreich erforschtes Phänomen.<sup>61</sup>

Beim Menschen ist die Verteilung der vier Nukleinbasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) im gesamten Genom nicht gleichmäßig. Im Großteil des Genoms ist die Verbindung von Cytosin und Guanin als CpG-Dinukleotid auf demselben DNA-Strang eher selten zu finden.<sup>60,62</sup> Die Abkürzung CpG verdeutlicht, dass es sich hier um eine Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleinbasen auf demselben DNA-Strang handelt und nicht um die Verbindung über Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Komplementärstränge.

Es gibt jedoch bestimmte Regionen, in denen es zu einer deutlichen Häufung von CpG-Dinukleotiden kommt. Diese Regionen werden als CpG-Inseln bezeichnet.<sup>61,63</sup> Als CpG-Insel gelten Regionen >500 Basenpaare, die einen Anteil an CpG-Dinukleotiden von mindestens 55% aufweisen. Diese Regionen sind in den Promotorregionen von etwa 40% der menschlichen Gene zu finden.<sup>58</sup> Promotorregionen sind nicht-kodierende DNA-Sequenzen, die auch als Cis-Elemente bezeichnet werden und die Expression benachbarter Gene regulieren. Obwohl die Mehrzahl der frei im Genom befindlichen CpG-Dinukleotide auf Grund ihrer erhöhten Mutagenität methyliert ist, ist die überwiegende Anzahl der in CpG-Inseln befindlichen CpG-Dinukleotide nicht methyliert.<sup>64-66</sup>

Physiologisch ist das Gen-Silencing durch Methylierung von CpG-Inseln in Hinsicht auf die Suppression der Transkription imprinteter Gene, auf dem inaktiven X-Chromosom liegender Gene und beweglicher DNA-Sequenzen, sogenannten Transposons, von besonderer Bedeutung.<sup>60</sup> Es kann angenommen werden, dass *de-novo*-Methylierung als normaler Prozess der menschlichen Entwicklung über bestimmte vorprogrammierte Prozesse abläuft.<sup>67</sup>

Die Methylierung selbst erfolgt durch die Übertragung einer Methylgruppe über das Donor-Molekül S-Adenosylmethionin durch das Enzym Methyltransferase an die 5-Position des Cytosin, welches dadurch zu 5-Methylcytosin wird.<sup>60,68</sup> Der Prozess ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

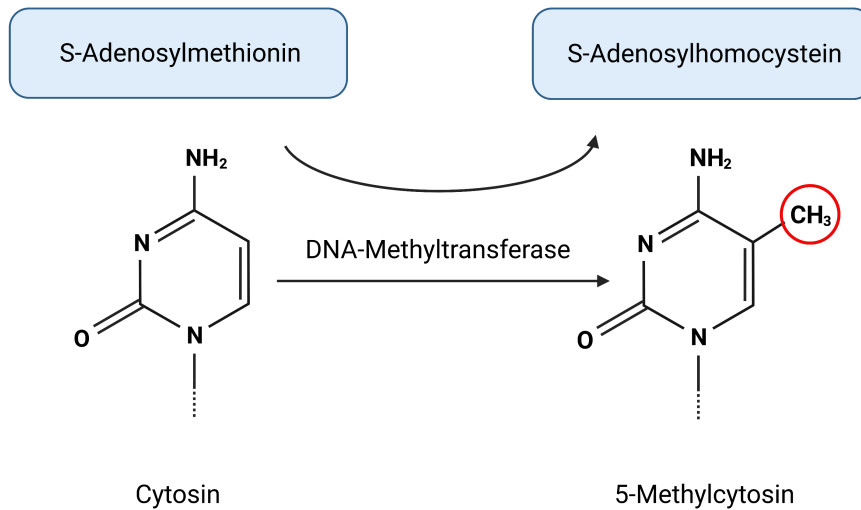


Abbildung 1: Bindung einer Methylgruppe an Cytosin

Schematische Darstellung der Kopplung einer Methylgruppe an die Nukleinbase Cytosin erstellt mit BioRender.com

Diese Änderung von Cytosin zu 5-Methylcytosin führt dazu, dass sich nun Methyl-CpG-Bindeproteine und Transkriptionsrepressoren an die methylierten CpG-Inseln anlagern und das Binden von Transkriptionsfaktoren und somit die Initiation der RNA-Polymerase verhindern.<sup>60</sup> Somit wird eine Transkription der benachbarten Gene der Promotorregion blockiert und diese Gene werden stummgeschaltet. Der Prozess wird in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

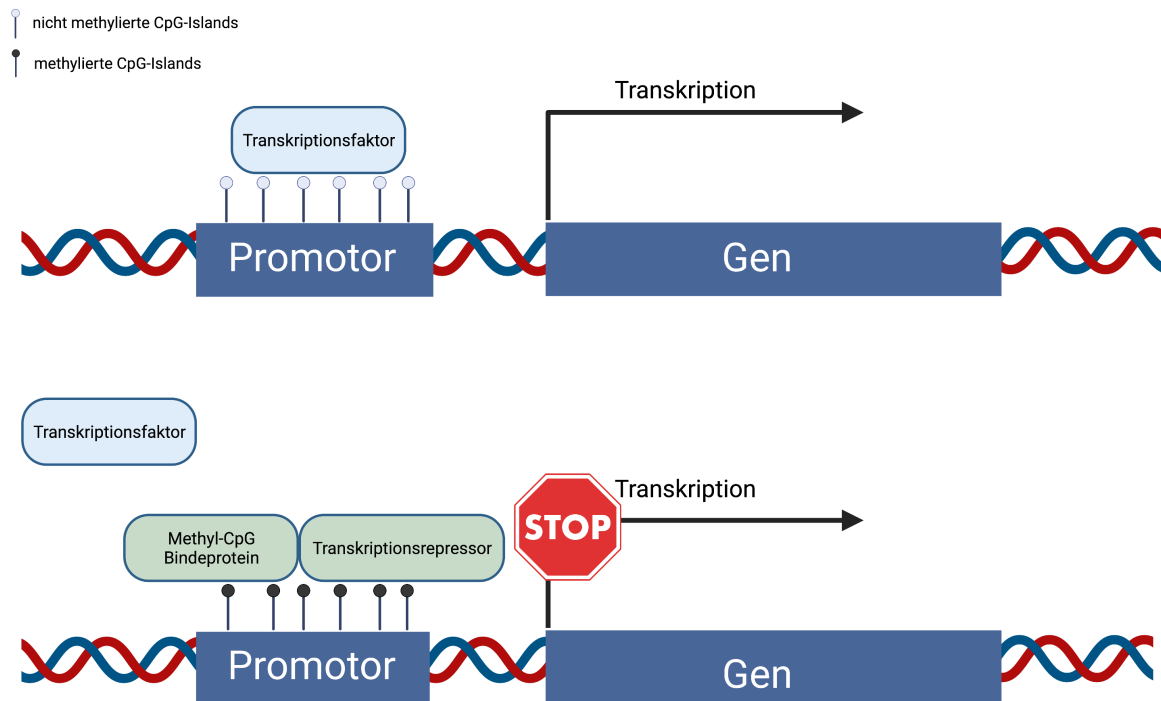


Abbildung 2: Transkription

Schematische Darstellung der Transkription bei nicht-methylierten und methylierten Promotorregionen erstellt mit BioRender.com

### 2.7.1 Methylierung in der Karzinogenese

In der Karzinogenese kann es durch zwei Mechanismen zu einer Störung der normalen Genfunktion kommen. Entweder geschieht dies durch direkte Änderungen der Basenabfolge im Fall von Genmutationen oder durch epigenetische Faktoren, welche zu einer Änderung der Genexpression führen.<sup>65</sup> Hypermethylierung der CpG-Inseln in Promoterregionen von Tumorsuppressorgenen kann zur Inaktivierung dieser Gene und somit zum Ausfall bestimmter DNA-Reparaturmechanismen führen.<sup>64</sup> In der Tumorgenese sind zwei Mechanismen der Methylierung während der neoplastischen Transformation somatischer Zellen zu beobachten. Zum einen kann es zu einer genomweiten Hypomethylierung, also Reaktivierung stummgeschalteter Gen-Sequenzen, kommen, wodurch es zur Genom-Instabilität kommt.<sup>68</sup> Und zum anderen kann es zu einer *de-novo*-Methylierung bestimmter CpG Inseln, insbesondere in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen, kommen.<sup>64,67</sup> Die exakte Rolle der DNA-Methylierung in der Tumorgenese konnte noch nicht hinreichend geklärt werden, aber es kann angenommen werden, dass sie sowohl vor der neoplastischen Zell-Transformation als auch als Resultat

dieser auftreten kann.<sup>67</sup> Da Methylierung als normaler Prozess des Alterns oder inflammatorischer Prozesse eintritt, kann sie eine prädisponierende Wirkung auf die Tumorgenese haben und somit in der Initiierung mitwirkend sein. Außerdem ist eine deutliche *de-novo*-Methylierung im Genom neoplastischer Zellen zu finden, was darauf schließen lässt, dass sie als Konsequenz dieser auftritt.<sup>67</sup>

Neben den Keimbahnmutationen des *BRCA1*-Gens konnte gezeigt werden, dass auch weitere Mechanismen, wie die Promotormethylierung, für die Inaktivierung des *BRCA1*-Gens ursächlich sein können.<sup>17,18</sup>

Eine Hypermethylierung der *BRCA1*-Promotorregion in sporadischen, also nicht familiären Brust- und Eierstockkrebskrankungen konnte in der Vergangenheit gezeigt werden.<sup>69</sup> Auf Grund der Tatsache, dass somatische *BRCA1* Mutationen beider Allele selten in sporadischem Brust- und Eierstockkrebs nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass epigenetische Faktoren in nicht-familiären Fällen von größerer Bedeutung in Hinsicht auf die Tumorgenese sind.<sup>69</sup> Dies zeigt auch eine Studie von Hauke et al., in der eine *BRCA1*-Promotor-Hypermethylierung in 12% der Eierstockkrebskrankungen ihres Kollektivs nachgewiesen werden konnte. Jedoch zeigt sich die Methylierung nur in sporadischen Erkrankungen und somit konnte die Rolle der *BRCA1*-Promotor-Hypermethylierung als zweites Ereignis der Tumorgenese in hereditären Erkrankungen, und somit der biallelischen Inaktivierung des *BRCA1*-Gens, nicht gezeigt werden.<sup>14</sup>

## 2.7.2 Konstitutive Methylierung

Längst wird die konstitutive Methylierung als Faktor in der Entstehung von hereditären Krebskrankungen untersucht. Es wird in diesem Zusammenhang nicht mehr von Epimutationen der Keimbahn, sondern konstitutiver Epimutation gesprochen.<sup>70</sup>

In der embryonalen Entwicklung befinden sich Stammzellen im Zustand einer unbeschriebenen Tafel ohne epigenetische Einflüsse, wodurch die direkte generationsübergreifende Weitergabe epigenetischer Merkmale nicht möglich ist.<sup>71</sup> Trotzdem konnte in einigen Studien bereits gezeigt werden, dass bestimmte epigenetische Merkmale generationsübergreifend als Mosaik in verschiedenen Geweben nachweisbar sind und sogar eine Rolle in der Entstehung hereditärer Erkrankungen spielen.<sup>18,72-74</sup> In drei Studien<sup>72-74</sup>, welche sich mit dem Lynch-Syndrom beschäftigen, konnte gezeigt werden, dass Mutationen in Cis-Elementen, also außerhalb der codierenden Sequenzen<sup>73,74</sup> oder in benachbarten Genregionen<sup>72</sup>, zu einer Hypermethylierung der *MLH1*- und *MSH2*-Promotorregionen und somit zum Stummschalten der jeweiligen Gene führte. Die detektierten Varianten und die

Hypermethylierung konnten auch zu gewissen Anteilen im Blut von nachfolgenden Generationen nachgewiesen werden.<sup>72-74</sup>

Auch Studien, welche die Rolle epigenetischer Faktoren in Brust- und Eierstockkrebsfällen untersuchen, konnten zeigen, dass Hypermethylierung der *BRCAl*-Promotorregion aus Blut gewonnener DNA zwar nicht häufig nachgewiesen werden kann, jedoch in der Pathogenese von *BRCAl*-phänotypischem Brustkrebs, eine Rolle zu spielen scheint<sup>75,76</sup>. Eine Studie von Evans et al. konnte am Beispiel zweier Frauen mit positiver Familiengeschichte für Brust- und Eierstockkrebs zeigen, dass eine Hypermethylierung der *BRCAl*-Promotorregion ursächlich für die familiäre Häufung war. In diesen beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass eine 5' UTR (untranslatierte Region) Variante ursächlich für die Hypermethylierung der *BRCAl*-Promotorregion war und generationsübergreifend gezeigt werden konnte.<sup>18</sup> In einer weiteren Studie von Hansmann et al. wurde ein Kollektiv von mehr als 600 Patientinnen ohne Nachweis einer *BRCAl/2*-Mutation untersucht, um zu ergründen, inwieweit konstitutive Epimutation, im Speziellen Methylierung, ursächlich für die Entstehung von Brust- und Eierstockkrebs ist. Es konnte gezeigt werden, dass konstitutive Methylierung in *BRCAl*- und *RAD51C*-Promotorregionen sowohl in sporadischen als auch familiären Fällen von Brust- und Eierstockkrebs zu finden ist.<sup>64</sup> Eine weitere Studie von Lønning et al. untersuchte die Hypermethylierung der *BRCAl*-Promotorregion in weißen Blutkörperchen von 934 OC Patientinnen und 1.698 gesunden Kontrollpersonen. Hier konnte eine Hypermethylierung in erkrankten Personen signifikant häufiger nachgewiesen werden als in gesunden. Dieses Phänomen beschränkt sich jedoch nur auf Patientinnen mit high-grade serösen Ovarialkarzinomen. Des Weiteren konnte eine positive Korrelation zwischen der *BRCAl*-Promotormethylierung in weißen Blutkörperchen und der entsprechenden Tumor-DNA nachgewiesen werden.<sup>17</sup>

Bei Patienten mit Brust- und Eierstockkrebs konnte bislang nur die Korrelation zwischen einer Hypermethylierung der *BRCAl*-Promotorregion in tumorfreier DNA und einer reduzierten *BRCAl*-mRNA Expression festgestellt werden.<sup>77</sup> Derselbe Zusammenhang konnte im *BRCAl2*-Gen bislang nicht beobachtet werden.<sup>77,78</sup>

## 2.8 Erkrankungsalter beim hereditären Ovarialkarzinom

Bei vielen onkologischen Erkrankungen lässt ein frühes Erkrankungsalter eine genetische Prädisposition vermuten.<sup>79</sup> Dies trifft besonders bei Brust-, Nieren- und Darmkrebserkrankungen zu.<sup>9,19,20</sup> Die Diagnose Eierstockkrebs wird generell selten in einem jungen Alter gestellt. Eine epidemiologische Studie von Torre et al. aus dem Jahr 2018 zeigt, dass von 2010-2014 in den USA die Häufigkeit einer Erkrankung bei unter 5 Fällen pro 100.000 bis zu einem Erkrankungsalter von 40 Jahren lag und die Häufigkeit ab einem Erkrankungsalter von 40 Jahren rapide zunimmt.<sup>35</sup> So gehörte Eierstockkrebs im Jahr 2016 erst in der Altersgruppe der 40-79 Jährigen zu den fünfthäufigsten todesursächlichen Krebserkrankungen in den USA.<sup>80</sup>

In den bereits beschriebenen Studien von Norquist et al., Lilyquist et al. und Carter et al. lag das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose bei 57-60 Jahren. Zudem konnte in allen drei Studien gezeigt werden, dass Mutationen in *BRCA1* und den MMR-Genen mit einem jüngeren Erkrankungsalter assoziiert sind.<sup>1,6,11</sup> In der Studie von Norquist et al. lag das durchschnittliche Erkrankungsalter von *BRCA1*-Mutationsträgerinnen bei 52 Jahren und bei Trägerinnen einer Mutation in den MMR-Genen bei 50 Jahren.<sup>1</sup> Diese Ergebnisse konnten auch durch die Studie von Lilyquist et al. bestätigt werden, hier waren Mutationen in den MMR-Genen und *BRCA1* häufiger mit einem Erkrankungsalter von <60 Jahren assoziiert, wohingegen Mutationen in *BRIP1* und *RAD51D* eher mit einem Erkrankungsalter >60 Jahren assoziiert waren.<sup>11</sup> In der Studie von Harter et al. lag das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 58 Jahren und pathogene Varianten in *BRCA1/2* und weiteren OC-Risikogenen konnten häufiger bei Patientinnen mit einem Alter bei ED von <60 Jahren festgestellt werden.<sup>12</sup> In der Studie von Carter et al. zeigte sich generell ein durchschnittlich früheres Erkrankungsalter mit 56 Jahren bei Trägerinnen pathogener Varianten im Vergleich zu Erkrankten ohne Nachweis einer Mutation (59 Jahre).<sup>6</sup> Übereinstimmend mit den Studien von Lilyquist et al.<sup>11</sup> und Norquist et al.<sup>1</sup> konnten auch Carter et al. zeigen, dass Mutationen in *BRCA1* (51 Jahre) und den MMR-Genen (49 Jahre) eher mit einem früheren Alter bei ED assoziiert sind, wohingegen Trägerinnen von Mutationen in den Genen *BRIP1* (64 Jahre), *RAD51D* (60 Jahre) und *BRCA2* (62 Jahre) eher später erkranken<sup>6</sup>. Auch Weber-Lassalle et al. zeigten in ihrer Studie eine höhere *BRIP1*-Mutationsprävalenz >60 Jahren bei ED im Vergleich zu früher erkrankten Patientinnen.<sup>44</sup> In einer 2021 veröffentlichten umfangreichen Studie von Cummings et al. zeigte sich ein medianes Erkrankungsalter von 53 Jahren für *BRCA1*, 59 Jahren für *BRCA2*, 65 Jahren für *BRIP1*, 62 Jahren für *RAD51C* und 57 Jahren für *RAD51D*.<sup>81</sup>

## 2.9 Studien zu einem jungen Erkrankungsalter

Anders als vielleicht anzunehmen scheint ein sehr junges Erkrankungsalter bei Ovarialkarzinomen jedoch nicht mit einer erhöhten Mutationsprävalenz assoziiert zu sein. Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich exklusiv mit der Gruppe der sehr jung-erkrankten Frauen mit einem Alter von  $\leq 40$  Jahren bei Erstdiagnose beschäftigt haben und die bisherigen Ergebnisse sind kontrovers.

In der bereits dargestellten Studie von Carter et al. konnte gezeigt werden, dass Frauen mit einem Erkrankungsalter unter 30 Jahren und über 70 Jahren eine deutlich geringere Mutationsprävalenz (8,2%), verglichen mit der Altersgruppe 30 bis einschließlich 69 Jahre (14,8%), zeigten.<sup>6</sup> Auch Song et al. fanden bei der Untersuchung einer Kohorte von 2.240 Frauen mit Ovarialtumoren heraus, dass nur 5% aller Mutationsträgerinnen jünger als 40 Jahre bei Erstdiagnose waren.<sup>16</sup> Eine 2019 veröffentlichte Studie von Lu et al. konnte ein größeres Kollektiv (n=445) von jung-erkrankten Patientinnen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 45$  Jahren beschrieben und molekulargenetisch untersucht werden. Hier zeigte sich, dass von den untersuchten nicht-*BRCA1/2*-Genen ausschließlich *MSH6* mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko bei jung-erkrankten Frauen  $\leq 45$  Jahren assoziiert ist.<sup>82</sup>

Nachfolgend werden drei Studien, die sich exklusiv mit der Gruppe der früherkrankten Frauen mit Ovarialkarzinom beschäftigen, diskutiert.

In einer Studie von Bernards et al. aus dem Jahr 2016, wurde ein Studienkollektiv von 47 Patientinnen mit einem Erkrankungsalter bis einschließlich 40 Jahre auf pathogene Varianten in den Eierstockkrebs-assoziierten Genen *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, den MMR-Genen und zusätzlichen Kandidatengenen *ATM*, *BAP1*, *CHEK2*, *MRE11A*, *NBN*, *PTEN* und *TP53* untersucht. Insgesamt konnten pathogene Varianten in 28% der Fälle nachgewiesen werden, von denen 77% in *BRCA1* und jeweils eine Mutation in *BRCA2*, *MSH2*, *RAD51*, *NBN* und *CHEK2* nachgewiesen werden. Auf Grundlage ihrer Ergebnisse kommen Bernards et al. zu dem Schluss, dass eine erhöhte *BRCA1*-Mutationsrate im Vergleich zu altersunspezifischen Kohorten vorliegt. Zudem konnte keine erhöhte Mutationsprävalenz bei Fällen mit familiärer Häufung gezeigt werden.<sup>83</sup>

In einer weiteren Publikation aus dem Jahr 2013, die sich mit einer Kohorte von 52 früherkrankten Frauen unter 41 Jahren mit OC beschäftigt, konnten Arts-De Jong et al. keine Unterschiede in der Mutationsprävalenz (19%) von *BRCA1* (n=8) und *BRCA2* (n=2) im Vergleich zu unselektierten Kohorten finden. Im Gegensatz zu Bernards et al. stellten sie jedoch eine signifikante Assoziation mit einer positiven Familiengeschichte fest.<sup>84</sup>

Konträr zu diesen beiden Studien kommen Stratton et al. in einer bereits 1999 publizierten Studie zu dem Schluss, dass bei 191 getesteten Frauen mit einem Erkrankungsalter bis einschließlich 30 Jahren keine erbliche Prädisposition in *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1* und *MSH2* der Erkrankung zugrunde liegt.<sup>79</sup>

Abgesehen von den beschriebenen Studien gibt es Publikationen, die sich im Speziellen mit dem Zusammenhang pathogener Varianten im Gen *SMARCA4* und dem kleinzelligen Ovarialkarzinom vom hyperkalzämischen Typ auseinandersetzen. Frauen mit einem Ovarialkarzinom dieses bestimmten histologischen Typs erkranken durchschnittlich mit 30 Jahren und sind häufig Trägerinnen pathogener Varianten in *SMARCA4*.<sup>46-48</sup>

## 2.10 Zielsetzung und Problemstellung

Durch die Tatsache, dass Eierstockkrebs selten bei jungen Frauen diagnostiziert wird, gibt es nur eine geringe Anzahl von Studien, die sich exklusiv mit den früherkrankten Frauen mit Ovarialkarzinom beschäftigen. Durch die sehr kleinen Studienkollektive sind die Ergebnisse dieser Studien zum Teil widersprüchlich und bedürfen weiterer Forschung. Abgesehen von der *BRCA*-Mutationsprävalenz gibt es bisher auch eine sehr limitierte Datenlage hinsichtlich der nicht-*BRCA1/2* HR-Gene.

Die vorliegende Arbeit ermöglicht es, ein großes Kollektiv jung-erkrankter Frauen mit einem Erkrankungsalter von  $\leq 40$  Jahren bei Erstdiagnose auf Genmutationen in etablierten Eierstockkrebs-prädisponierenden Genen und Kandidatengenen zu untersuchen. Außerdem kann durch ein zusätzliches Analyseverfahren erforscht werden, ob eine Methylierung der *BRCA1*-Promotorregion vorliegt und möglicherweise ätiologisch für die Entstehung der Krankheit ist.

## 3 Material und Methoden

Die Studienkohorte wurde über verschiedenen Zentren des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs (engl. German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer, GC-HBOC) generiert. Die Next-Generation Sequenzierung (NGS) wurde als Auftrags-Sequenzierung im Cologne Center for Genomics (CCG) durchgeführt. Alle weiteren Analysen der Sequenzierung erfolgten im Labor des Zentrums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs der Uniklinik Köln. Für die Methylierungsanalyse wurden Räumlichkeiten



und Geräte des Labors der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt.

### 3.1 Studienpopulation

Die Daten wurden in verschiedenen Zentren des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs im Rahmen des HerediCaRe Projekts deutschlandweit erhoben und in der zentralen Datenbank des Instituts für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) in Leipzig festgehalten. Ziel des HerediCaRe Projekts ist es, ein nationales Register zur Sammlung umfangreicher Daten über hereditäre Tumorerkrankungen aufzubauen.<sup>85</sup> Bis zum Zeitpunkt der Abfrage am 12.08.2019 wurden Daten von insgesamt 4.975 Patientinnen mit Eierstockkrebs ohne eine zusätzliche Brustkrebserkrankung im Alter von 10 bis 93 Jahren in der zentralen Datenbank des IMISE dokumentiert. Alle Patientinnen haben sich im Vorhinein für die Verwendung ihrer Daten zu Forschungszwecken bereiterklärt. Für die weiteren Untersuchungen liegt der Fokus auf den jungen Patientinnen mit einem Erkrankungsalter unter 41 Jahren.

Diese Population der jung-erkrankten Patientinnen umfasst 729 Frauen mit einem Erkrankungsalter von 10 bis 40 Jahren und einem durchschnittlichen Alter von 32 Jahren bei (ED) der Erkrankung.

Bei 307 Patientinnen handelt es sich um singuläre Fälle, bei 369 gibt es eine familiäre Belastung für Brust- und/oder Eierstockkrebs und in 53 Fällen gibt es weitere Eierstockkrebserkrankungen innerhalb der Familie. Die Histologie des Tumors ist in 201 Fällen bekannt.

Für die weitere Genanalyse wurden alle 133 *BRCA1* und 13 *BRCA2* positiven Fälle ausgeschlossen. Von den übrigen 583 *BRCA1/2* negativen Fällen wurden 215 Proben im Vorhinein über eine der drei Versionen des TruRisk<sup>®</sup> Multigenpanels analysiert (TruRisk<sup>®</sup> v1 n=137, TruRisk<sup>®</sup> v2 n=77, TruRisk<sup>®</sup> v3 n=1). Weitere 240 Proben, die bisher nur eine einfache *BRCA1/2* Testung hatten, erhielten mittels NGS eine Multigenpanel-Analyse über ein umfangreiches Forschungspanel, welches 251 Gene umfasst. Aufgrund von nicht verfügbarem DNA-Material mussten 128 Proben von weiteren Analysen ausgeschlossen werden.

Für die Methylierungsanalyse konnte Material von 425 Proben verwendet werden. Von den 425 Proben konnten 423 aus der quantitativen Methylierungsanalyse ausgewertet werden.

Die Arbeitsschritte der Studie und die Auswahl des Studienkollektivs werden in Abbildung 3 anhand eines Flussdiagramms schematisch dargestellt.

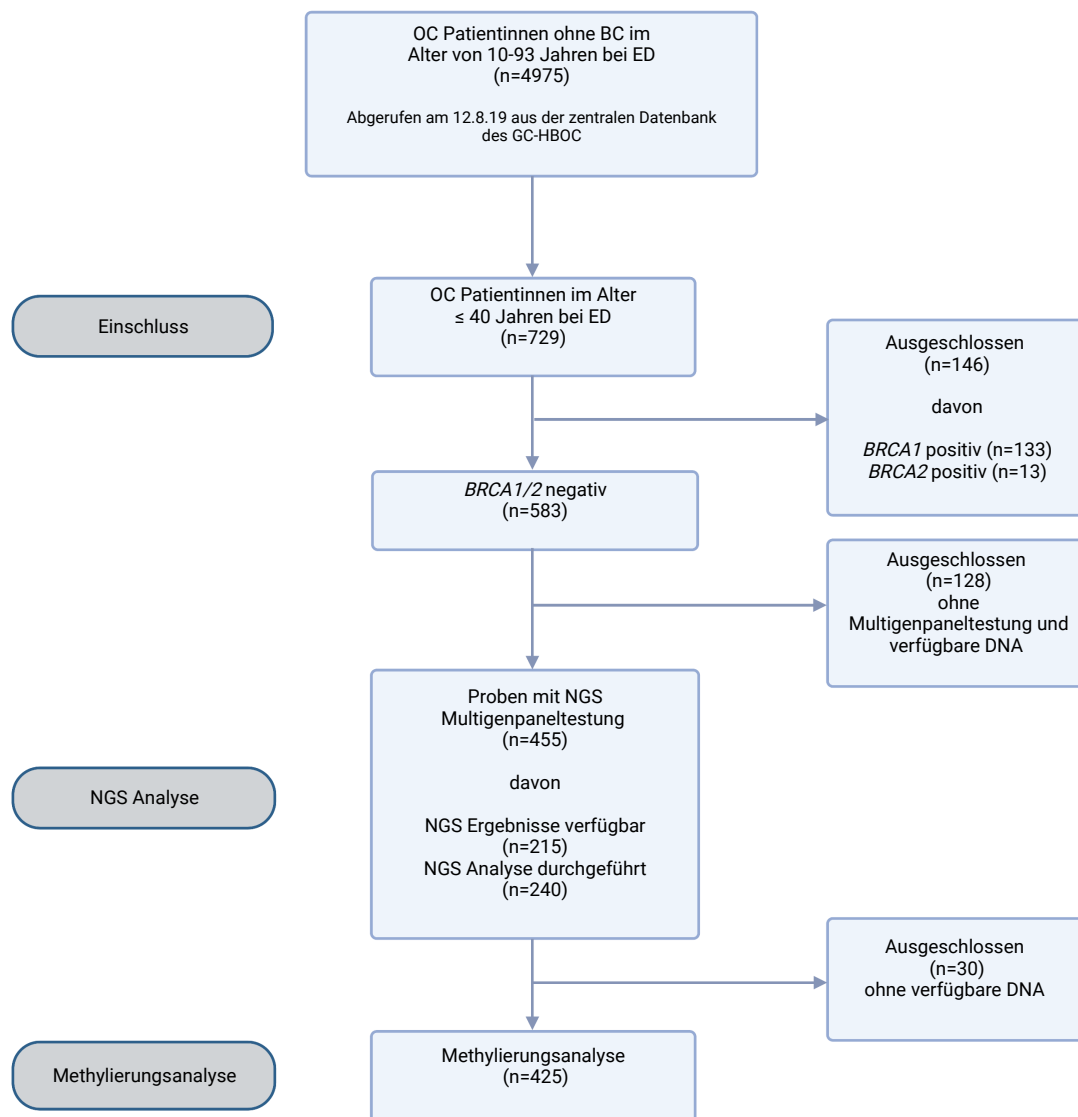


Abbildung 3: Flussdiagramm des Studienkollektivs

Erstellt mit BioRender.com

### 3.2 Kontrollkohorte

Zusätzlich zur Studienkohorte wurde eine Kontrollgruppe von 503 nicht-erkrankten Frauen auf eine konstitutive Methylierung der *BRCA1*-Promotorregion untersucht. Die gesunden Kontrollpersonen wurden im Rahmen einer Studie zu genetischen Faktoren bei Personen ohne Nachweis einer Krebserkrankung rekrutiert. Die Altersspanne der Frauen lag bei 59 bis 68 Jahren mit einem medianen Alter von 65 Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Alle Frauen waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme kreisfrei. Von den insgesamt 503 Proben

konnten die Ergebnisse von 476 Proben aus der quantitativen Methylierungsanalyse ausgewertet werden.

### **3.3 DNA-Sequenzierung**

Die Multigenpanel-Testung wurde mittels NGS Methoden als Auftragssequenzierung im CCG durchgeführt. Hierzu musste zunächst eine Auswahl der zu untersuchenden Gene getroffen werden und die Proben mussten für die NGS-Analyse vorbereitet werden. Die Methode der Next Generation Sequenzierung bietet die Möglichkeit parallel eine Vielzahl von Genen zu untersuchen und diese mit einem Referenz-Genom zu vergleichen. Durch diese Methode können Punktmutationen oder kleinere Insertionen und Deletionen in kodierenden Exons und Exon/Intron-Übergängen detektiert werden.

Die Ergebnisse der NGS Untersuchung konnten im Anschluss an die Analyse über die Datenbank des CCG ([varbank.ccg.uni-koeln.de](http://varbank.ccg.uni-koeln.de)) abgerufen werden, um sie in Hinblick auf ihre Pathogenität zu klassifizieren. Alle detektierten pathogenen Varianten wurden zusätzlich durch eine Sanger Sequenzierung bestätigt.

Eine weitere Analyse der NGS Rohdaten mittels einer bioinformatischen Software konnte Auskunft über mögliche Kopienzahlenvarianten (CNVs) in den untersuchten Genen geben. Um dies zu bestätigen wurden die auffälligen DNA-Sequenzen über die MLPA-Methode (Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation, engl. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) untersucht und mögliche Deletionen oder Duplikationen konnten identifiziert werden.

#### **3.3.1 Genauswahl**

Von den 455 Proben, welche über eine Multigentestung analysiert wurden, sind 215 Proben bereits im Vorhinein durch das TruRisk<sup>®</sup> Multigenpanel in verschiedenen Zentren des GC-HBOC sequenziert worden. Das TruRisk<sup>®</sup> Multigenpanel wurde für die Analyse von Brust- und Eierstockkrebs assoziierten Risikogenen vom GC-HBOC auf Grundlage umfassender Literaturrecherche entwickelt. Es umfasst gesicherte Kerngene und zusätzliche Forschungsgene und wird in der Routinediagnostik verwendet.<sup>86</sup> Die 240 Proben, welche im Vorhinein nur auf Mutationen in den beiden *BRCA*-Genen getestet wurden, erhielten zusätzlich eine Analyse durch das PERPECTIVE Panel. Dieses umfasst 251 Gene, bestehend aus etablierten Risikogenen für Brust- und Eierstockkrebs und zahlreichen Kandidatengenen.

Die Gene, welche in Hinblick auf ihre Assoziation mit Eierstockkrebs betrachtet werden, sind auf Grundlage vorangegangener Publikationen ausgewählt.

In der Studie von Lilyquist et al. konnten insgesamt sieben Gene als signifikant mit dem OC assoziiert identifiziert werden. Diese sind *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *MSH2*, *MSH6*, *RAD51C* und *RAD51D*.<sup>11</sup> Zudem konnten Yang et al. die positive Assoziation zwischen pathogenen Varianten in *PALB2* feststellen.<sup>55</sup> Im Folgenden werden diese Gene als gesicherte OC-Gene betrachtet.

Da in den weiteren sieben Genen *ATM*, *MLH1*, *MRE11A*, *NBN*, *PMS2*, *RAD50* und *TP53* in den bereits beschriebenen Studien<sup>1,6,7,11</sup> nur widersprüchliche oder unklare Assoziationen festgestellt werden konnten, werden diese Gene im Folgenden als Kandidatengene betrachtet. Auch das, mit dem kleinzelligen Ovarialkarzinom vom hyperkalzämischen Typ assoziierte, Gen *SMARCA4* soll als Kandidatengen untersucht werden, da die Erkrankung häufig bei Patientinnen mit einem sehr jungen Erkrankungsalter zu finden ist.<sup>46-48</sup>

Tabelle 6: Darstellung der Genauswahl für die molekulardiagnostische Untersuchung

Gesicherte OC-Gene	OC-Kandidatengene
<i>BRCA1</i>	<i>ATM</i>
<i>BRCA2</i>	<i>MLH1</i>
<i>BRIP1</i>	<i>MRE11A</i>
<i>MSH2</i>	<i>NBN</i>
<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>
<i>PALB2</i>	<i>RAD50</i>
<i>RAD51C</i>	<i>TP53</i>
<i>RAD51D</i>	<i>SMARCA4</i>

### 3.3.2 Proben

Bei den Proben des Studienkollektivs und der Kontrollkohorte handelte es sich um genomische DNA aus Vollblutproben. Bis auf n=33 Proben für die Sequenzierung und die Methylierungsanalyse des Studienkollektivs sind alle Proben in der zentralen Biobank des Zentrums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs in Köln verfügbar. Die weiteren n=33 Proben wurden von externen Zentren des GC-HBOC zur Verfügung gestellt.

Die Proben der Kontrollkohorte wurden vom Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs zur Verfügung gestellt.

### **3.3.3 DNA-Konzentrationsmessung und Verdünnung**

Für die Sequenzierung mittels NGS mussten normalisierte DNA-Proben auf 96-Well Mikrotiterplatten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gegeben werden. Um zunächst die genaue DNA-Konzentration der einzelnen Patientenproben zu ermitteln wurde das Quant-IT™ High Sensivity und Broad Range Kit sowie das Qubit dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die Quantifizierung der DNA-Lösungen erfolgte über das Tecansystem (Tecan Group Ltd, Männedorf, Kanton Zürich, Schweiz) sowie über das Qubit® Fluorometer und diente als Grundlage für darauffolgende DNA-Verdünnungsschritte. Die mittels NGS zu analysierenden Proben sollten eine Zielkonzentration von 10ng/μl auf ein Volumen von 10μl haben. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit einem TE-Puffer auf die vorgegebene Konzentration in den Wells der 96-Mikrotiterplatte verdünnt.

### **3.3.4 Next Generation Sequencing (NGS)**

NGS Systeme wurden Anfang der 2000er Jahre eingeführt und stellen eine deutlich schnellere und kostengünstigere Methode gegenüber der Sanger Sequenzierung dar. Heute werden NGS Systeme unter anderem in der molekulargenetischen Forschung und Diagnostik eingesetzt. Die Methode des NGS beruht auf dem Prinzip der massiven Parallel-Sequenzierung von DNA-Fragmenten und bietet somit die Möglichkeit, mehrere kodierende Exons ausgewählter Gene parallel zu sequenzieren.<sup>87</sup> Die Proben wurden mittels der Sequenzierungssysteme HiSeq4000 sowie NovaSeq 6000 von Illumina (Illumina, San Diego, Californien, USA) als Auftrags-Sequenzierungen im Cologne Center for Genomics (CCG) analysiert.

Die Illumina-Sequenzierung lässt sich grundsätzlich in vier Schritte unterteilen und wird auch als „Sequenzierung durch Synthese“ bezeichnet.

Der erste Schritt ist die Erstellung einer DNA-Bibliothek, hierbei wird die zu untersuchende Doppelstrang-DNA zunächst fragmentiert. Als nächstes werden Adapter mit Bindungsstellen, in Form von Oligonukleotiden und Sequenzierungs-Primern, an die beiden Enden der DNA-Fragmente angefügt. Anschließend beginnt die Clusterbildung, eine Amplifikation der DNA-Fragmente. Die DNA-Fragmente werden mittels der Oligonukleotide auf einer Fließzelle befestigt. Eine Fließzelle ist ein Glasobjektträger mit Kanälen, deren Boden mit komplementären Oligonukleotiden bedeckt ist und in denen sich Sequenzierungschemie befindet. Die Oligonukleotide der DNA-Fragmente binden an die komplementären Oligonukleotide und befestigen die DNA-Fragmente auf der Fließzelle, um diese während der Sequenzierung in Position zu halten. Die Fragmente werden nun gespalten und über Bridge-

Amplifikation wird jedes DNA-Fragment in tausende identische Kopien geklont, deren Anhäufung als Cluster bezeichnet wird. Das Prinzip beruht darauf, dass jede Nukleinbase durch ein Fluoreszenz-Signal bestimmt werden kann. Die Clusterbildung ist wichtig, um ein ausreichend intensives Lichtsignal zu generieren, um detektiert werden zu können. Für die Sequenzierung, dem dritten Schritt, werden Primer und fluoreszierend markierte Basen zu der DNA hinzugegeben. Die Primer binden an die, auf der Fließzelle befestigten, DNA-Einzelstränge und nacheinander fügt eine DNA-Polymerase die markierten Basen an den neuen Komplementärstrang. Pro Runde wird immer nur ein Nukleotid befestigt. Jede der vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin ist mit einer anderen Fluoreszenzfärbung markiert und nach jeder Anfügung wird das spezifische Signal des angefügten Nukleotids detektiert und die entsprechende Base kann identifiziert werden. Dies macht es möglich, die genaue Basenabfolge zu bestimmen. Dieser Vorgang wird für Millionen von Clustern parallel durchgeführt. Die Synthese eines Amplikons wird als „Read“ bezeichnet und mehrfach für beide Komplementärstränge durchgeführt. In dem letzten Schritt, der Datenanalyse, werden alle „Reads“ geclustert und mit einem Referenz-Genom verglichen, um Varianten in der getesteten DNA zu finden.<sup>88</sup>

Die folgende Abbildung stellt den beschriebenen Prozess der Sequenzierung durch Synthese schematisch dar.

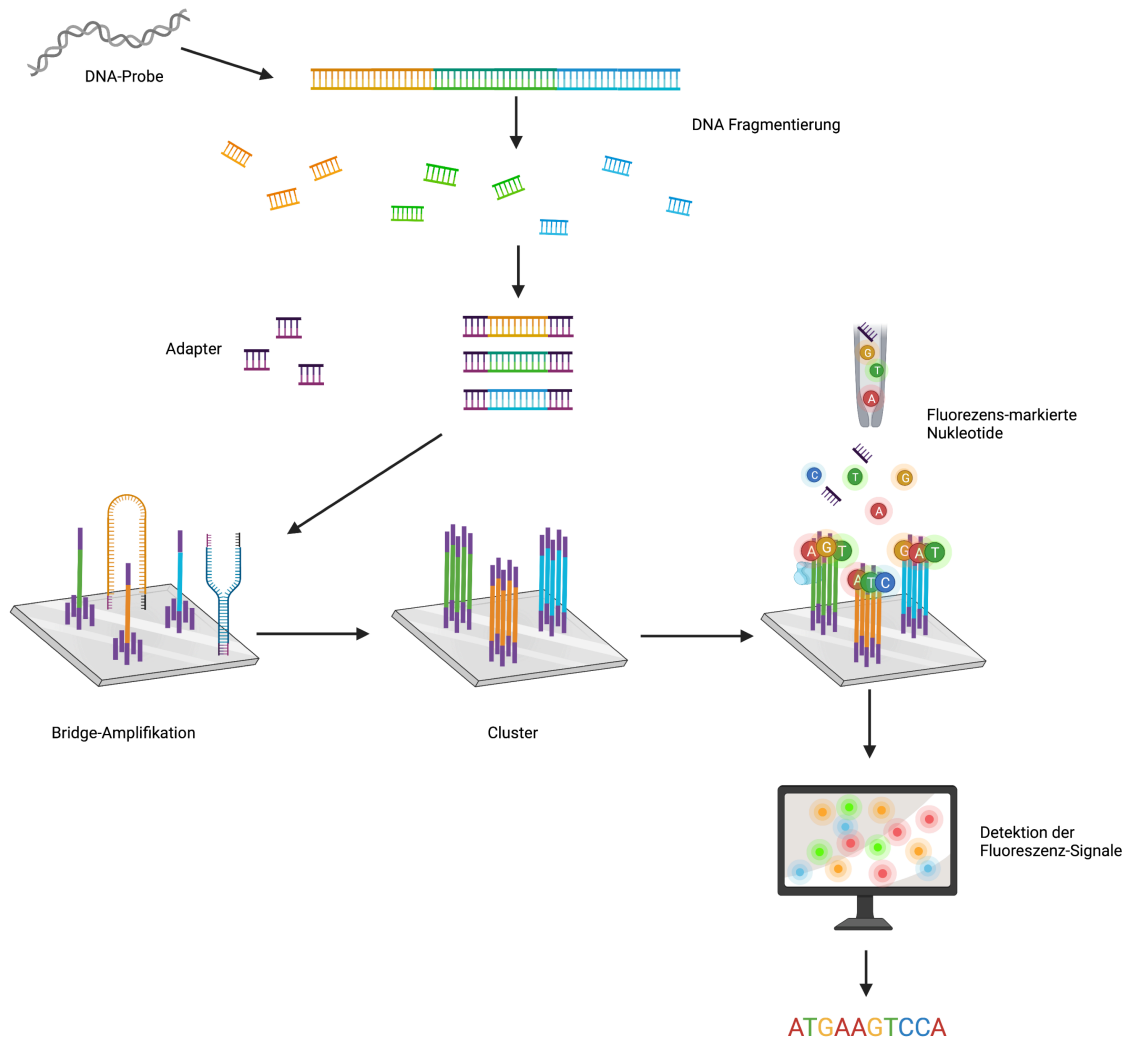


Abbildung 4: Sequenzierung durch Synthese

Schematische Darstellung der Sequenzierung durch Synthese erstellt mit BioRender.com

Die Rohdaten der NGS-Analyse wurden softwarebasiert in eine Nukleotidabfolge übersetzt und über die Online-Datenbank Varbank Version 2.26 ([varbank.ccg.uni-koeln.de](http://varbank.ccg.uni-koeln.de)) des Cologne Center for Genomics bereitgestellt.

### 3.3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die DNA-Sequenzen, in denen sich Auffälligkeiten in der NGS-Auswertung zeigten, mussten anschließend über eine Sanger Sequenzierung bestätigt werden. Dazu musste die DNA zunächst denaturiert und die zu untersuchende Sequenz mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Die gewünschten Sequenzabschnitte wurden mittels QIAGEN<sup>®</sup>-

Multiplex PCR-Kit (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland) für die Sanger Sequenzierung unter der Verwendung sequenzspezifischer Primer vervielfältigt.

Der erste Schritt ist das Ansetzen des PCR-Mastermixes. Dieser besteht pro Reaktion aus 5µl QIAGEN<sup>®</sup>-Multiplex PCR Mix, 2µl H<sub>2</sub>O und jeweils 1µl sequenzspezifischem Forward- und Reverse-Primer. Anschließend werden pro Probe 9µl des vorbereiteten PCR-Mastermixes in die PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt und 1µl (verdünnt auf 30ng/µl) der zu untersuchenden DNA und eine DNA-positive Kontrolle je Exon dazugegeben. Die PCR wurde im Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) durchgeführt.

Der Thermocycler-Ablauf wurde wie folgt programmiert:

- I. Denaturierung/Aktivierung bei 95°C für 10 Minuten
- II. 31 Zyklen bestehend aus:
  - i. Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden
  - ii. Primeranlagerung bei 54°C-60°C für 30 Sekunden
  - iii. Amplifikation bei 72°C für 60 Sekunden
- III. Finale Amplifikation bei 72°C für 7 Minuten
- IV. Inkubation/Pause bei 4°C

### **3.3.6 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels ExoSAP-IT<sup>™</sup> (Affymetrix, UK Ltd, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und dient dem Abbau überschüssiger Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) und Primer. Pro Probe wurden 1,5µl ExoSAP-IT<sup>™</sup> zu 3µl PCR Produkt gegeben und in den Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) gestellt.

Der Thermocycler-Ablauf wurde wie folgt programmiert:

- I. Inkubation bei 37°C für 15 Minuten
- II. Deaktivierung bei 80°C für 15 Minuten
- III. Pause bei 4°C

Anschließend waren die Proben bereit für die Sanger Sequenzierung.

### **3.3.7 Sanger Sequenzierung**

Die Sanger Sequenzierung oder auch Kettenabbruchmethode beruht auf dem Prinzip der Termination replizierter DNA-Sequenzen durch markierte Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs). Diese ddNTPs sind modifizierte Nukleotide, welche durch das Fehlen einer 3'OH



Gruppe zu einer vorzeitigen Termination des, von der DNA-Polymerase gebildeten, Komplementärstrangs führen. Durch die Einführung dieser Methode in den 1970er Jahren machten Sanger et al. es möglich, mit einem einzigen Primer die Abfolge von inzwischen 400-600 Nukleotiden zu bestimmen.<sup>89</sup> Bis heute gilt die Sanger Sequenzierung als Goldstandard in der DNA-Sequenzierung. Mittlerweile werden dazu jedoch voll-automatisierte Methoden verwendet.<sup>90</sup>

Die hier verwendete Methode beruht auf dem Prinzip der voll-automatisierten Sanger Sequenzierung mit Fluoreszenz basierter DNA-Analyse und Kapillarelektrophorese.

Vor der Sequenzier-PCR werden Standard-dNTPs und modifizierte Nukleotide, welche jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Färbungen markiert sind, zu der zu untersuchenden DNA gegeben. Während der Sequenzier-PCR fügt eine DNA-Polymerase nacheinander entsprechende Nukleotide an die entstehenden Amplikons. Die zufällige Eingliederung eines fluoreszierend markierten ddNTPs führt zu der vorzeitigen Termination der Sequenz. So entstehen DNA-Sequenzen unterschiedlicher Länge. Anschließend findet die Trennung der Sequenzen in dünnen Kapillarröhrchen, welche mit Elektrolytflüssigkeit gefüllt sind, statt. Kurze DNA-Fragmente mit geringerer molekularer Masse bewegen sich mit einer höheren Geschwindigkeit in Richtung der Anode am Ende der Kapillarröhrchen. Durch ein in dem Röhrchen befindliches Fenster fällt ein Anregungslaser auf die passierenden Amplikons. In dem Moment, wenn die Amplikons das Fenster passieren, emittieren die markierten ddNTPs ein charakteristisches Lichtsignal, das über einen Lichtsensor detektiert werden kann. Eine Software kann dann dieses Lichtsignal interpretieren und dem jeweiligen Nukleotid zuordnen. Am Ende gibt die Software ein Elektropherogramm und die genaue Basenabfolge der untersuchten DNA-Sequenz in Form einer Textdatei aus.<sup>91</sup>

Die automatisierte Sanger Sequenzierung der auffälligen DNA-Sequenzen aus der NGS-Analyse wurde mit dem ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) in dem Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Zunächst wurde der Mastermix für die Sequenzier-PCR angesetzt. Dazu wurden pro Probe 6,75µl HPLC-H<sub>2</sub>O, 0,75µl BigDye Terminator v. 1.1, welcher unter anderem die modifizierten Neukleotide enthält und 1µl 5x Sequencing Puffer zusammen gegeben. Anschließend wurde pro Probe 0,5µl sequenzspezifischer Primer (Forward oder Reverse) und 8,5µl des Mastermixes für die Sequenzier-PCR auf jeweils 1µl der aufgereinigten PCR Produkte pipettiert.

Der Thermocycler-Ablauf wurde wie folgt programmiert:

- I. Initiale Denaturierung bei 96°C für 30 Sekunden
- II. 15 Zyklen bestehend aus:
  - i. Denaturierung bei 96°C für 10 Sekunden
  - ii. Primeranlagerung bei 55°C für 5 Sekunden
  - iii. Amplifikation bei 60°C für 90 Sekunden
- III. Inkubation/Pause bei 4°C

Als nächster Schritt erfolgt die Aufreinigung der PCR-Produkte mittels des BigDye XTerminator Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Das Kit besteht aus zwei Reagenzien, der SAM™ Lösung und der XTerminator™ Lösung. Zu jeder Probe werden 45µl der SAM™ Lösung und 10µl der XTerminator™ Lösung gegeben und für 30 Minuten gut vermischt. Im Anschluss werden die aufgereinigten PCR-Produkte für 2 Minuten herunter zentrifugiert.

Im letzten Schritt können die PCR-Produkte in den Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) zur vollautomatisierten Sanger Sequenzierung mit Fluoreszenz basierter DNA-Analyse und Kapillarelektrophorese überführt werden. Als Gelmatrix dient das Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer Sephadex.

### **3.3.8 Detektion von Kopienzahlvariationen (CNVs)**

Ergänzend zu der Sanger Sequenzierung, die besonders Punktmutationen oder kleine Deletionen nachweisen kann, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um größere Deletionen oder Duplikationen bestimmter DNA-Abschnitte zu identifizieren.

Die Ergebnisdateien der NGS-Analyse wurden mit Hilfe der bioinformatischen Software ExomeDepth Version 1.1.15 auf Kopienzahlvariationen (CNVs), also Deletionen oder Duplikationen von DNA-Abschnitten, überprüft. ExomeDepth ist ein bioinformatisches Tool, das entwickelt wurde, um anhand eines Referenzsatzes CNVs aus Sequenzierdaten zu detektieren.<sup>92</sup> Findet die Software auffällige Sequenzen in bestimmten Genom-Regionen, wird eine MLPA zugeführt, um diese Auffälligkeiten zu bestätigen.

### 3.3.9 Multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (MLPA)

Die MLPA bietet die Möglichkeit, Deletionen und Duplikationen sowohl ganzer Chromosomen als auch einzelner Exons und kleinerer DNA-Sequenzen zu bestimmen. Das Prinzip der MLPA beruht darauf, dass nicht die „Target“-Sequenz der zu untersuchenden DNA selbst, sondern sequenzspezifische Sonden amplifiziert werden. Die Sonden, die zu der DNA hinzugegeben werden bestehen aus zwei Oligonukleotiden, die jeweils an benachbarte Regionen der „Target“-DNA binden. Um die beiden Teile der Sonden amplifizierbar zu machen, müssen diese durch ein Enzym zusammengefügt werden. Jede Sonde enthält eine kurze synthetische Sequenz, die etwa 21-30 Nukleotide umfasst, und eine längere Sequenz, die zum einen 25-43 Nukleotide komplementär zur „Target“-DNA und zum anderen eine sogenannte Stuffer-Sequenz, umfasst. Die Stuffer-Sequenz jeder Sonde hat eine spezifische Anzahl an Nukleotiden, die sie während der Kapillarelektrophorese identifizierbar macht. Alle Sonden enthalten die gleichen Primer-Regionen, was die simultane Amplifikation mit nur einem Primer-Paar ermöglicht.<sup>93</sup>

Die MLPA wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt und umfasst sechs Schritte: Denaturierung, Hybridisierung, Ligation, Amplifikation, Fragment-Separation und die anschließende Datenanalyse. Bei der Analyse wurden alle zur MLPA benötigten Reagenzien und die Analyse-Software der Firma MRC Holland (MRC Holland, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Für die durchgeführten Analysen wurden folgende Kits verwendet: SALSA MLPA Probemix P003 MLH1/MSH2; SALSA MLPA Probemix MLH1-MSH2 Confirmation; SALSA MLPA Probemix P190 CHEK2; SALSA MLPA Probemix P190 CHEK2; SALSA MLPA Probemix P045 BRCA2/CHEK2; SALSA MLPA Probemix P077 BRCA2 Confirmation; SALSA MLPA Probemix P260 PALB2-RAD50-RAD51C-RAD51D.

#### **Erster Tag** - Denaturierung der DNA-Proben und die anschließende Hybridisierung der MLPA-Sonden

Für die Denaturierung wurden pro Probe 5µl DNA-Probe verdünnt auf eine Konzentration von 15ng/µl im Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) bei 98°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf eine Temperatur von 25°C heruntergekühlt. Während der Denaturierung wurde der Mastermix für die Hybridisierung pro Probe bestehend aus 0,75µl Probe-Mix und 0,75µl SALSA MLPA Puffer hergestellt. Im SALSA Probemix befinden sich bis zu 60 verschiedene fluoreszierend markierte MLPA-Sonden. Im Anschluss wurden pro Probe 1,5µl Mastermix zu jeder denaturierten DNA-Probe pipettiert. Die PCR-Gefäße wurden

während der Zugabe des Mastermixes nicht aus dem Thermocycler genommen, um die Temperatur von 25°C zu halten.

Der Thermocycler-Ablauf wurde wie folgt programmiert:

- I. Eine Minute bei 95°C
- II. 16-20 Stunden bei 60°C

Während dieser Zeit lagern sich die MLPA-Sonden an die Einzelstrang-DNA an.

### **Zweiter Tag - Ligation und PCR sowie die Fragmentanalyse**

Zunächst wurde der Ligase-Mix hergestellt. Dazu wurden pro Probe 1,5µl Ligase-65 Puffer A, 1,5µl Ligase-65 Puffer B, 0,5µl Ligase-65 und 12,5µl H<sub>2</sub>O zusammengegeben und gut vermischt. Bevor der Ligase-Mix zu den Proben pipettiert wurde, wurde der Thermocycler-Ablauf wie folgt programmiert:

- I. 15 Minuten bei 54°C
- II. 5 Minuten bei 98°C
- III. Pause bei 20°C

Das Thermocycler-Programm wurde gestartet und sobald das Gerät die Temperatur von 54°C erreichte, wurde das Programm pausiert und pro Probe 16µl Ligase-Mix mit einer 8-Kanal-Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in die PCR-Gefäße gegeben und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Anschließend wurde das Thermocycler-Programm fortgesetzt. Das Enzym Ligase-65 katalysiert eine kovalente Bindung zwischen den beiden Abschnitten der MLPA-Sonden und macht sie damit amplifizierbar.

Anschließend folgte die Amplifikation, bei der die Ligationsprodukte inklusive der Fluoreszenzmarkierung durch Zugabe von PCR Primern, dNTPs und Polymerase vervielfältigt wurden. Dazu wurde 5µl PCR-Mastermix pro Probe, bestehend aus 1µl Salsa PCR Primer FAM, 0,25µl SALSA Polymerase und 3,75µl H<sub>2</sub>O, mit einer 8-Kanal-Pipette in die PCR-Gefäße zu den Proben gegeben und mit der Pipette vermischt. Die Zugabe des PCR-Mastermixes erfolgte während die PCR-Gefäße bei 20°C im Thermocycler standen.

Der PCR Ablauf wurde wie folgt programmiert:

- I. 35 Zyklen von je:
  - i. 30 Sekunden bei 95°C
  - ii. 30 Sekunden bei 60°C
  - iii. 60 Sekunden bei 72°C
- II. 20 Minuten bei 72°C
- III. Pause bei 20°C

Für die finale Fragmentanalyse wurde jeweils 1µl PCR-Produkt mit 0,3µl GS 500 Rox Standard und 9µl HiDi Formamid in eine MicroAmp® Fast optical 96-well Reaktions-Platte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pipettiert und bei 90°C für 2 Minuten im Thermocycler denaturiert.

Im Anschluss wurden die MLPA-Amplikons in den Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) gegeben und mittels Kapillarelektrophorese separiert. Durch die einzigartige Länge der Stuffersequenzen der Sonden, können diese in der Kapillarelektrophorese identifiziert werden. Ein Anregungslaser fällt auf die passierenden MLPA-Amplikons, die daraufhin ein Lichtsignal emittieren. Parallel laufen Größenstandards mit bekannter Länge und dienen als Größenreferenz. Somit kann die genaue Länge jedes Amplikons bestimmt und der jeweiligen „Target“-DNA-Sequenz zugeordnet werden. Die Datenanalyse erfolgte über die Coffalyser DB v. 13010 Software (MRC Holland, Amsterdam, Niederlande). Die Software vergleicht die Testdaten mit Referenz-Sonden im „housekeeping“-Genom, die in der Regel in zwei Kopien vorliegen. Liegt das Amplifikationsprodukt einer bestimmten „Target“-Sequenz in gesteigerter oder verringerter Menge vor, kann darauf geschlossen werden, dass entsprechend eine Duplikation oder Deletion der DNA-Sequenz in der untersuchten Probe vorliegt (MRCHolland.com).

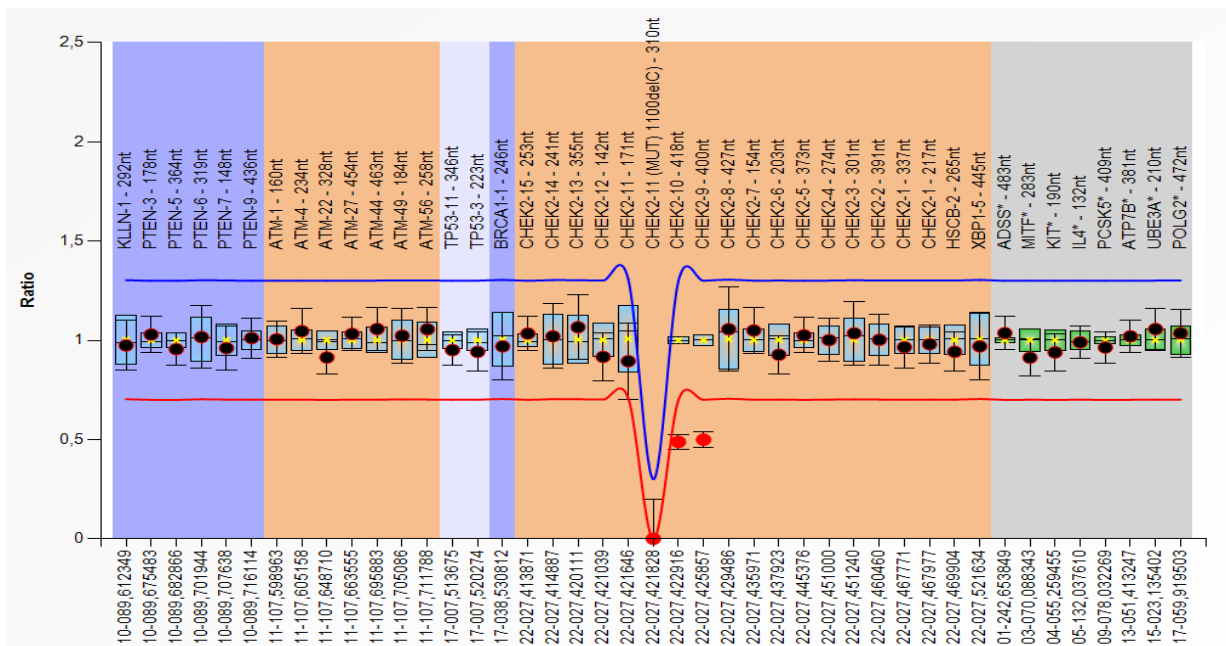


Abbildung 5: MLPA

Auswertung einer MLPA-Analyse mit Detektion einer Deletion in Exon 9-10 des *CHEK2*-Gens (MRC Holland, Amsterdam, Niederlande)

### 3.3.10 Variantenklassifikation

Die Variantenklassifizierung erfolgte auf Grundlage der Regularien des ENIGMA (engl. Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles) Konsortiums. Alle detektierten genetischen Varianten werden anhand einer fünfstufigen Skala der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) basierend auf der Funktionalität der Sequenz klassifiziert. Die Einteilung ist wie folgt: class 1 = neutral, class 2 = wahrscheinlich neutral, class 3 = unklare Datenlage, class 4 = wahrscheinlicher relevanter Funktionsverlust und class 5 = relevanter Funktionsverlust.

Bei den etablierten OC-Risikogenen konnte die Pathogenität bestimmter Varianten (nicht nur Protein-trunkierende, sondern auch Missense-Varianten) bereits bestätigt werden. Für die detektierten Varianten in OC-Kandidatengenen kann man bis jetzt die Pathogenität Protein-trunkierender Varianten nur vermuten.<sup>94</sup>

### 3.4 Methylierungsanalyse

Eine weitere Untersuchung der DNA-Proben stellt die Methylierungsanalyse dar. Es sollte untersucht werden, ob eine konstitutive Methylierung der Promotorregion des *BRCA1*-Gens im Blut nachgewiesen werden kann. Im Anschluss sollte die detektierte Methylierung quantifiziert werden. Das Prinzip der Bisulfit-Sequenzierung beruht auf der Identifikation methylierter DNA-Sequenzen durch die Unterscheidung von nicht-methyliertem Cytosin und 5-Methylcytosin. Das ursprüngliche Protokoll der Bisulfit-Behandlung wurde 1992 von Frommer et al. entwickelt.<sup>95</sup> Um die Differenzierung möglich zu machen, wurde die zu untersuchende DNA mit Bisulfit behandelt. Bisulfit reagiert mit Cytosin, wohingegen in Verbindung mit 5-Methylcytosin keine Reaktion stattfindet. Bei der Reaktion konvertiert Bisulfit die Cytosin-Nukleotide durch hydrolytische Desaminierung zu Uracil. Bei der anschließenden PCR Amplifikation wird Uracil wie Thymin erkannt und es wird Adenin anstelle von Guanin im neugebildeten Komplementärstrang gepaart<sup>95</sup>. Die folgende Abbildung zeigt den Unterschied zwischen Cytosin und 5-Methylcytosin im neugebildeten Komplementärstrang.

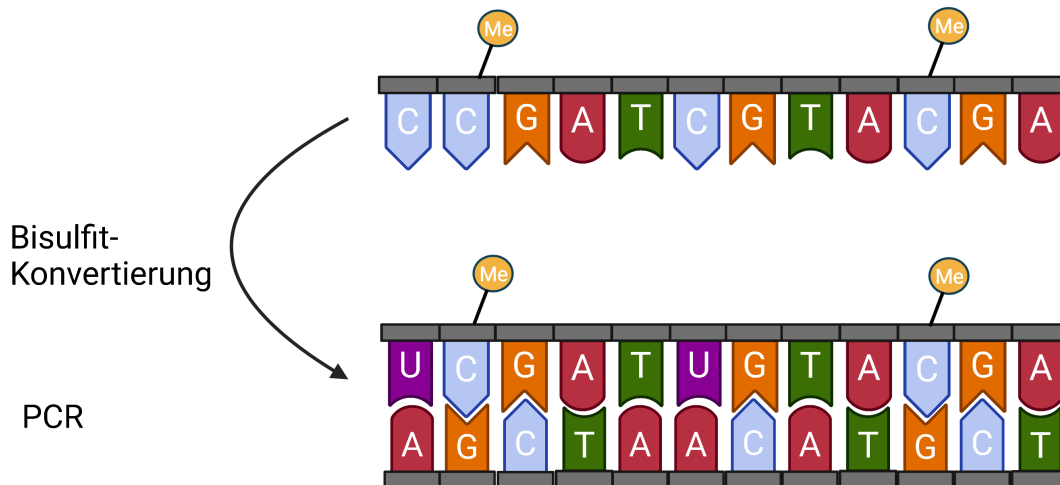


Abbildung 6: Bisulfit-Konvertierung

Schematische Darstellung der Bisulfit-Konvertierung erstellt mit BioRender.com

In diesem Falle wurde einem weiterentwickelten Protokoll basierend auf Jung et al.<sup>96</sup> gefolgt. Alle verwendeten Reagenzien sind Teil des innuCONVERT Bisulfite Basic Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland).

### 3.4.1 Vorbereitung der Probenlysate

Hierzu wurde die DNA-Konzentration ein weiteres Mal mittels Qubit beziehungsweise Nanodrop ermittelt. Daraufhin wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O verdünnt, sodass sich ein Probenlysat mit einer Konzentration von 5ng/μl ergab.

### 3.4.2 Bisulfit-Behandlung

Für die Bisulfitumwandlung wurde zunächst das Bisulfit-Reaktionsgemisch vorbereitet. Hierzu wurde 100μl der DNA-Proben mit 100μl Acrylnitril-Butadin-Styrol (ABS) 70% und 50μl Denaturierungspuffer (100 mg/ml Hydroquinone in 1m2p (1Methoxy-2Propanol)) in einem 2ml Safe-Lock-Zentrifugationsröhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verdünnt und anschließend mit dem VWR Mini Star Silverline Vortexer (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gut vermischt und für wenige Sekunden in der Rotilabo<sup>®</sup> Mini Zentrifuge (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) herunterzentrifugiert. Daraufhin wurde das Bisulfit-Reaktionsgemisch für 45 Minuten bei 85°C im Wasserbad inkubiert.

### 3.4.3 Aufreinigung

Um die Bisulfidumwandlung zu unterbrechen, wurde 500µl Bindepuffer (50% [v/v] GTC, 50% [v/v] Ethanol) zu dem Reaktionsgemisch gegeben und gut vermischt. Der gesamte Mix wurde dann mit einer Pipette in eine Spin-Säule (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) überführt. Die Spin-Säule wurde anschließend bei 14.000 x g in der Zentrifuge Hettich Rotanta (Hettich GmbH, Kirchlegern, Deutschland) für drei Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde 700µl Waschpuffer (10% [v/v] Trizma<sup>®</sup> HCl, 90% [v/v] Ethanol) auf die Säulen gegeben und erneut bei 14.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss wieder verworfen wurde, wurde nun 700µl Desulphonierungspuffer (25% [v/v] NaOH, 1M, 75% [v/v] Ethanol) auf die Säulen gegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Säulen wieder bei 14.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurde wieder 700µl Waschpuffer auf die Säulen gegeben und diese wurden bei 14.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500µl Waschpuffer und einer Zentrifugationszeit von drei Minuten wiederholt. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen und die Säulen in frische 1,5ml Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) gestellt. Die Säulen wurden dann für zehn Minuten bei 60°C im Thermomixer inkubiert und im Anschluss wurde für die Elution 50µl Elutionspuffer (1% [v/v] 1M Tris, pH 8,0, 99% [v/v] Wasser) auf die Säulen pipettiert und die Säulen wurden abermals für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 14.000 x g zentrifugiert. Die Elution wurde anschließend noch einmal wiederholt.

### 3.4.4 Quantitative Real-Time PCR

Für die Evaluation der Methylierung in der Promotorregion des *BRCA1*-Gens wurde eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt. Methylierungsspezifisch bedeutet, dass eine Amplifikation der Target-Region des *BRCA1*-Gens nur stattfindet, wenn eine Methylierung vorliegt. Das Prinzip der Real-Time PCR basiert darauf, dass durch die Detektion von Fluoreszenzsignalen des neu-synthetisierten DNA-Komplementärstrangs in Echtzeit die Menge des Amplifikationsproduktes nach jedem PCR-Zyklus quantifiziert werden kann. Für die Analyse wurde die eluierte DNA in eine MicroAmp<sup>®</sup> Fast optical 96-well Reaktionsplatte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gegeben. Die Analyse wurde über das Applied Biosystem<sup>®</sup> 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. In jede PCR-Platte konnten 31 Proben und eine künstlich-methylierte und Bisulfid-behandelte Standard-DNA mit jeweils drei



Replikaten eingesetzt werden. Von der Standard-DNA (Calibrator) wurde 3ng pro Replikat eingesetzt und repräsentiert zur Kalibrierung 100%-prozentige Methylierung. In die übrigen Wells wurden 10µl der Bisulfit-behandelten DNA und 5µl qPCR-Mastermix (70mM Tris-HCl, pH 8,4, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 8% Glycerol, 0,006µl ROX-Lösung<sup>97</sup>), 2,5µl Oligomix (enthalten in Tabelle 7 aufgeführten Primer), 1,6 µl H<sub>2</sub>O, 0,5µl dNTP/dUTP-Mix und 0,4µl HotStart Taq Polymerase pipettiert und vorsichtig vermischt.

Der PCR-Ablauf wurde wie folgt programmiert:

- I. Denaturierung bei 95°C für 20 min
- II. Gefolgt von 50 Zyklen von jeweils:
  - i. Primeranlagerung bei 62°C für 2 Sekunden
  - ii. Elongation bei 56°C für 45 Sekunden
  - iii. 15 Sekunden bei 95°C

Die Messung des Fluoreszenz Signals fand am Ende der Elongation jedes Zyklus statt.<sup>96</sup>

Tabelle 7: Verwendete Primer

	<i>ACTB</i>	<i>BRCA1</i>
<b>Forward Primer</b>	cccttaaaaattacaaaaaccacaa	gaagttttagcgagtttacgtc
<b>Reverse Primer</b>	ggaggaggttttagtaagtttttg	ctaaaaactactacttaacgataac
<b>TaqMan-Sonde</b>	Atto 647N- accaccaccaacacacaataacaacaca-BHQ-2	6-FAM-ttcgcgttttttcggttacgga-BBQ-650
<b>Zielregion</b>	Chr7:5532118-5532223	Chr17:43125354-43125465

Die prozentuale Methylierung wurde über die  $\Delta\Delta CT$ - Methode kalkuliert.<sup>96</sup> Prozentuale Methylierung  $\geq 5\%$  wurde als positiv betrachtet.<sup>14</sup> Zur Quantifizierung der DNA-Menge der Proben wurde die Amplifikation des „Housekeepinggens“ *ACTB* als Referenz über eine methylierungsunspezifische PCR evaluiert. Dies ermöglicht die Normalisierung des CT-Wertes für das untersuchte *BRCA1*-Gen.<sup>96</sup> Der CT-Wert korrespondiert mit der Anzahl der jeweiligen PCR-Zyklen, die benötigt werden, um den vorher definierten Schwellenwert eines Fluoreszenz-Signals zu erreichen. Bei Erreichen dieses Schwellenwertes weist jede Probe dieselbe Menge an neu-synthetisierter DNA auf. Anschließend mussten die CT-Werte für das zu untersuchende Gen sowohl in der Probe als auch in der Standard-DNA normalisiert werden. Um schließlich die Methylierung im *BRCA1*-Gen zu kalkulieren, muss zunächst die

Differenz der CT-Werte der methylierten Standard-DNA und der jeweiligen Probe über folgende Formel ermittelt werden:

$$\Delta\Delta CT_{Sample} = \Delta CT_{Sample} - \Delta CT_{Calibrator}$$

Anschließend konnte die prozentuale Methylierung der untersuchten Region des *BRCA1*-Gens anhand der folgenden Formel berechnet werden.<sup>96</sup>

$$Methylation\ Sample = 100\% \times 2^{\Delta\Delta CT_{Sample}}$$

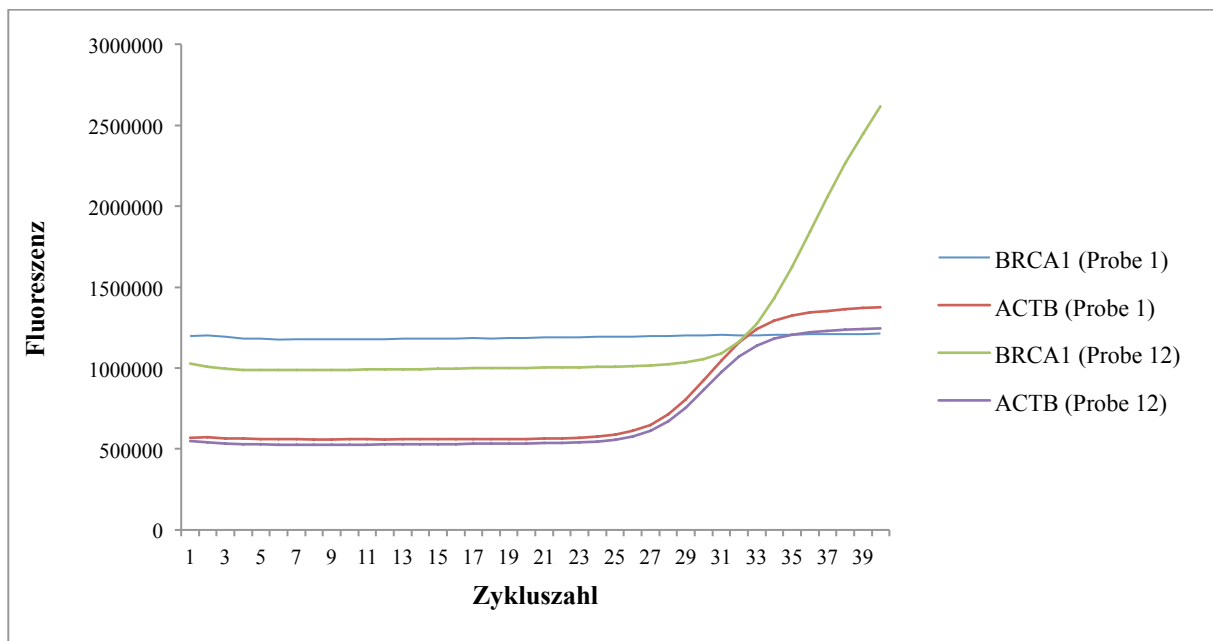


Abbildung 7: Auswertung der quantitativen Real-Time PCR

Das Diagramm stellt das emittierte Fluoreszenzsignal, welches proportional zu der Menge der neugebildeten PCR-Produkte zunimmt, in Relation zu den PCR-Zyklen dar. Bei beiden Proben (1;12) ist die Amplifikation des Referenzgens *ACTB* zu sehen. Bei Probe 12 ist die Amplifikation der Target-Region von *BRCA1* zu erkennen, wohingegen in Probe 1 keine Amplifikation stattfindet.

### 3.5 Statistik

Die Auswertung erfolgte über Microsoft Excel und das Statistikprogramm SPSS Version 28.0.1.1. Unterschiede der Mutationsprävalenz in *BRCA1* und *BRCA2* sowie weiteren OC-Genen in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter und Unterschiede in den Häufigkeiten der Methylierung der *BRCA1*-Promotorregion der Studienkohorte und der Vergleichskohorte wurden durch den Exakten Test nach Fisher ermittelt. Ein t-Test bei unabhängigen Stichproben wurde durchgeführt, um Unterschiede im Erkrankungsalter bei Frauen mit und ohne nachgewiesene Hypermethylierung der Promotorregion des *BRCA1*-Gens zu ermitteln.

## 4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden alle relevanten Ergebnisse dargestellt.

### 4.1 *BRCA1/2* Mutationsprävalenz

Im Folgenden wird die Mutationsprävalenz der *BRCA*-Gene in verschiedenen Subkohorten aller an Eierstockkrebs erkrankten Patientinnen dargestellt.

#### 4.1.1 *BRCA1/2* Mutationsprävalenz in der Gesamtkohorte aller OC Fälle des GC-HBOC

Insgesamt wurden molekulargenetische Testdaten von 4.975 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom ohne Brustkrebserkrankung mit einem Alter von 10-93 Jahren bei ED in der zentralen Datenbank des IMISE in Leipzig erfasst. Bei 1.635 Frauen (32,9%) wurden pathogene Varianten (PV) in *BRCA1* (n=1.162) oder *BRCA2* (n=474) nachgewiesen, wobei eine Frau sowohl Trägerin einer pathogene Variante in *BRCA1* als auch in *BRCA2* ist.

Tabelle 8: Mutationsprävalenz (%) in *BRCA1* und *BRCA2*

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA1/2</i>
Insgesamt (n=4.975)	23,4	9,5	32,9
<b>Altersgruppenspezifisch</b>			
10-20 Jahre (n=41)	0	0	0
21-30 Jahre (n=216)	3,7	1,9	5,6
31-35 Jahre (n=176)	11,9	1,1	13,0
36-40 Jahre (n=296)	35,1	2,4	37,5
41-50 Jahre (n=1.283)	39,4	7,9	47,3
51-60 Jahren (n=1.478)	25,6	13,3	38,9
61-70 Jahre (n=987)	11,4	12,7	24,1
71-80 Jahre (n=462)	7,1	7,6	14,7
80-93 Jahre (n=36)	0	11,1	11,1

Im Kollektiv der 4.975 Patientinnen mit Ovarialkarzinom des GC-HBOC insgesamt und gruppiert nach Erkrankungsalter bei ED

In der Altersgruppe der 10-20-jährigen (n=41) konnte keine *BRCA1/2*-Mutation nachgewiesen werden. In der Gruppe der Patientinnen mit einem Erkrankungsalter bei Erstdiagnose von 21-30 Jahren (n=216) konnte in acht Fällen eine *BRCA1* und in vier Fällen eine *BRCA2* Mutation bestätigt werden. Somit liegt die *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz in dieser Altersgruppe bei 5,6%. In der Gruppe der 31-35-jährigen (n=176) wurden 23 pathogene Varianten in *BRCA1* und *BRCA2* nachgewiesen (*BRCA1*: n=21; *BRCA2*: n=2),

wodurch sich eine Mutationsprävalenz von 13,1% ergibt. Frauen mit einem Erkrankungsalter von 36-40 Jahren bei ED (n=296) weisen eine *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz von 37,5% auf (insgesamt: n=111; *BRCA1*: n=104; *BRCA2*: n=7). Die höchsten Mutationsprävalenzen zeigen sich in den Altersgruppen der 41-50-jährigen (n=1.283) und 51-60-jährigen (n=1.478) mit 47,2% (insgesamt: n=606; *BRCA1*: n=505; *BRCA2*: n=101) beziehungsweise 38,8% (insgesamt: 573; *BRCA1*: n=378, *BRCA2*: n=196) der untersuchten Fälle. In der Altergruppe 51-60 Jahre findet sich eine Patientin mit Nachweis einer *BRCA1* und *BRCA2* Mutation. Ab einem Erkrankungsalter >50 Jahren ist eine Abnahme der *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz insgesamt zu beobachten. Bei den Patientinnen mit einem Erkrankungsalter bei ED von 61-70 Jahren (n=987) liegt die *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz bei 24,1% (n=238) und die Mehrheit der detektierten pathogenen Varianten ist mit 52,5% (n=125) in *BRCA2* zu finden. Ein ähnlicher Trend ist auch bei den 71-80-jährigen (n=462) mit einer *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz von 14,7% (insgesamt: n=68; *BRCA1*: n=33, *BRCA2*: n=35) und den 80-93-jährigen (n=36), bei denen nur 4 pathogene Varianten in *BRCA2* und keine in *BRCA1* nachgewiesen wurde, zu beobachten. Das mediane Erkrankungsalter in der Gruppe der Patientinnen ohne Nachweis einer pathogenen Variante in *BRCA1* oder *BRCA2* liegt bei 55 Jahren, wohingegen das Erkrankungsalter bei den Patientinnen mit Nachweis einer pathogenen Variante in *BRCA1* oder *BRCA2* bei 52 Jahren liegt.

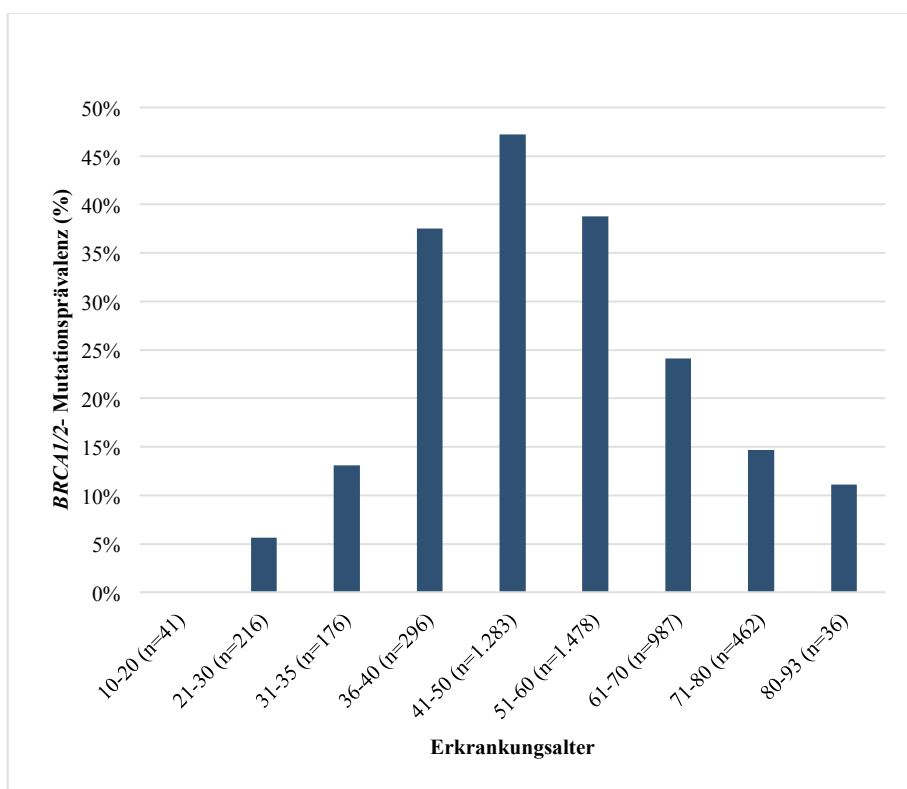


Abbildung 8: *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz

In der Gesamtkohorte der 4.975 Patientinnen mit Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter

#### 4.1.2 *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz in der Gruppe der Patientinnen mit einem Erkrankungsalter $\leq 40$ Jahren bei Erstdiagnose

Die *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz in der Gruppe der jung-erkrankten Frauen  $\leq 40$  Jahren bei Erstdiagnose liegt bei 20%. Die differenzierten *BRCA1* und *BRCA2* Mutationsprävalenzen liegen bei 18,24% beziehungsweise 1,78%.

Tabelle 9: *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz

	Anzahl pathogene Varianten	Mutationsprävalenz %
<i>BRCA1/2</i>	146	20,03
<i>BRCA1</i>	133	18,24
<i>BRCA2</i>	13	1,78

In der Gruppe der Frauen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren

Vergleicht man die *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz der jung-erkrankten Patientinnen mit der *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz der Patientinnen mit einem Erkrankungsalter  $> 40$  Jahren (35,1%), zeigt sich eine signifikant ( $p < ,001$ ) geringere *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz in der Gruppe der jungen Frauen.

Tabelle 10: *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter

Erkrankungsalter	<i>BRCA1/2</i> -Mutationsprävalenz %
$\leq 40$ Jahren	20,0
$> 40$ Jahren	35,1

#### 4.2 Mutationsprävalenz der gesicherten OC-Gene und OC-Kandidatengene

Von den insgesamt 729 Frauen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren bei Erstdiagnose konnten 455 *BRCA1/2*-negative Proben durch eine Multigenpaneltestung molekulargenetisch auf Keimbahnvarianten untersucht werden. Die verwendeten Genpanel umfassen eine unterschiedlich Auswahl von zu testenden Genen. So konnten einige Patientinnen nicht auf Varianten in allen im Vorhinein definierten OC-Gene und OC-Kandidatengene untersucht werden. Bei 31 untersuchten Proben liegen keine Ergebnisse für die Gene *RAD50* und *MRE11A* vor, bei 25 Proben keine Ergebnisse für die Mismatch-Repair-Gene *MLH1*, *MSH2*,

*MSH6* und *PMS2* und in 8 Fällen gibt eine keine verfügbare Auswertung der Sequenzierung von *NBN*. Nur für 202 waren Sequenzierdaten für *SMARCA4* verfügbar.

In insgesamt 24 Proben konnten Mutationen in den untersuchten nicht-*BRCAl/2* gesicherten OC-Genen und OC-Kandidatengenen gefunden werden.

Tabelle 11: Mutationsprävalenz in *BRCAl/2* und weiteren OC-Genen

	Anzahl untersuchte Proben	Anzahl detektierter Varianten	Mutationsprävalenz %
<b>Gesicherte OC-Gene</b>			
<i>BRCA1</i>	729	133	18,24
<i>BRCA2</i>	729	13	1,78
<i>BRIP1</i>	455	1	0,22
<i>MSH2</i>	430	1	0,23
<i>MSH6</i>	430	1	0,23
<i>PALB2</i>	455	3	0,66
<i>RAD51C</i>	455	2	0,44
<i>RAD51D</i>	455	0	0
<b>OC-Kandidatengene</b>			
<i>ATM</i>	455	5	1,11
<i>MLH1</i>	430	1	0,23
<i>MRE11A</i>	424	1	0,24
<i>NBN</i>	447	1	0,22
<i>PMS2</i>	430	2	0,47
<i>RAD50</i>	424	3	0,71
<i>TP53</i>	455	1	0,22
<i>SMARCA4</i>	202	2	0,99

In der Gruppe der Frauen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren

Die höchste Mutationsprävalenz der nicht-*BRCAl/2*-Gene kann in *ATM* (1,1%) mit fünf detektierten pathogene Varianten festgestellt werden. Von den untersuchten Genen konnte in jedem Gen, bis auf *RAD51D*, mindestens eine Variante gefunden werden. In der Gruppe der gesicherten OC-Gene wurde jeweils eine pathogene Variante in *BRIP1* (0,22%), *MSH2* (0,23%) und *MSH6* (0,23%) gefunden. Zudem konnten zwei pathogene Varianten in *RAD51C* (0,44%) nachgewiesen werden. Drei pathogene Varianten konnten in *PALB2* (0,66%) identifiziert werden. In den Genen *MLH1* (0,23%), *MRE11A* (0,24%), *NBN* (0,22%) und *TP53* (0,22%) konnte jeweils eine pathogene Variante gefunden werden, in *PMS2* (0,47%) und *SMARCA4* (1,0%) jeweils zwei Varianten und in *RAD50* (0,71%) drei Varianten. Insgesamt kann gesagt werden, dass die Anzahl der detektierten Varianten und somit die

Mutationsprävalenz weiterer nicht-*BRCA1/2* OC-prädisponierender Gene in der Studienkohorte sehr gering ist.

### 4.3 Altersabhängigkeit der Mutationsprävalenz in nicht-*BRCA1/2*-Genen

Von den 24 detektierten Keimbahnvarianten in OC-Genen der 455 *BRCA1/2* negativ-getesteten Patientinnen wurden acht Varianten in der Gruppe der Frauen mit einem Erkrankungsalter von  $\leq 30$  Jahren und 16 Varianten in der Altersgruppe von 31-40 Jahren nachgewiesen.

Tabelle 12: Mutationsprävalenz in OC-Genen in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter

	Anzahl detektierter Varianten	Mutationsprävalenz %
Insgesamt (n=455)	24	5,27
$\leq 30$ Jahren (n=202)	8	3,96
31-40 Jahre (n=253)	16	6,32

*In 455 BRCA1/2-negativen Frauen aus der Gruppe der Frauen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren*

In der Gruppe der *BRCA1/2*-negativen Frauen  $\leq 30$  Jahren liegt die Mutationsprävalenz bei 3,96% und in der Gruppe der Patientinnen von 31-40 Jahren bei 6,32%. Hier zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Mutationsprävalenz ( $p=,297$ ).

### 4.4 Mutationsprävalenz in Bezug zur Familiengeschichte

Von den 729 Patientinnen mit einer Erkrankung vor Vollendung des 41. Lebensjahres handelt es sich bei 247 Patientinnen um singuläre Fälle, bei denen es keine weiteren Brust- oder Eierstockkrebserkrankungen in der Familie gibt. Bei 420 Frauen trat mindestens eine weitere Brustkrebserkrankung innerhalb der Familie auf und bei 62 Patientinnen gibt es mindestens ein weiteres Ovarialkarzinom in der Familie, jedoch keine Brustkrebserkrankung.



Tabelle 13: Familiengeschichte in Bezug zur Mutationsprävalenz

	Anzahl	Mutationsprävalenz %
<b>Singuläre Fälle</b>	<b>247</b>	
Varianten in <i>BRCA1/2</i>	30	12,15
Varianten in nicht- <i>BRCA1/2</i> OC-Genen	12	4,96
<b>Familiengeschichte mit BC</b>	<b>420</b>	
Varianten in <i>BRCA1/2</i>	103	24,52
Varianten in nicht- <i>BRCA1/2</i> OC-Genen	10	2,38
<b>Familiengeschichte mit nur OC</b>	<b>62</b>	
Varianten in <i>BRCA1/2</i>	13	20,97
Varianten in nicht- <i>BRCA1/2</i> OC-Genen	2	3,23

*In der Gruppe der Frauen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren*

Die nicht-*BRCA1/2* gesicherten OC-Gene und OC-Kandidatengene werden zusammengefasst als OC-Gene. Innerhalb der Gruppe der singulären Fälle konnten 30 pathogene Varianten (12,15%) in *BRCA1/2* nachgewiesen werden und zwölf Varianten (4,96%) in weiteren OC-Genen. Deutlich höher fällt die *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz in der Gruppe der Frauen mit familiärer Häufung von Brust- und Eierstockkreberkrankungen mit 24,52% aus. In dieser Gruppe konnten außerdem in 2,38% der Frauen Mutationen in weiteren OC-Genen gefunden werden. Bei Patientinnen mit mindestens einer weiteren Eierstockkreberkrankungen aber keinen Fällen von Brustkrebs innerhalb der Familie liegt die *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz bei 20,97% und zwei (3,23%) Varianten in OC-Genen konnten bestätigt werden.

#### 4.5 Häufigkeiten histologischer Subtypen

Von insgesamt 729 jung-erkrankten Patientinnen  $\leq 40$  Jahren waren von 201 Tumoren die histologischen Befunde verfügbar. Von diesen 201 Tumoren waren 181 Tumore der Gruppe der malignen epithelialen Tumoren zugehörig, acht weitere Tumore waren entweder der Kategorie der Keimzelltumore oder kleinzelligen Tumoren zuzuordnen und zwölf Tumoren waren nicht weiter klassifiziert.

Tabelle 14: Histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms

Histologischer Subtyp	Anzahl (%)
<b>Maligne epitheliale Tumore</b>	
Serös (LGSC und HGSC)	107 (53,2)
CC	6 (3)
EC	12(6)
MC	30 (14,9)
MC+EC	1 (0,5)
Nicht weiter klassifizierte maligne epitheliale Tumore	25 (12,4)
<b>Weitere Subtypen</b>	
Keimzelltumore	3 (1,5)
SCCOHT	3 (1,5)
SCCOPT	1 (0,5)
Kleinzellig nicht weiter klassifiziert	1 (0,5)
Nicht weiter klassifiziert	12 (6)

*In der Gruppe der Frauen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren*

Mit Abstand am häufigsten handelt es sich um seröse Karzinome mit 107 Fällen (53,2%). Low-grade seröse und high-grade seröse Karzinome werden als Kategorie „serös“ zusammengefasst, da die Unterteilung nicht immer eindeutig im histologischen Befund nachzuvollziehen war. Mit 30 Fällen (14,9%) wurde am zweithäufigsten eine muzinöse Histologie festgestellt und bei einem der Tumore konnten sowohl muzinöse als auch endometrioide Gewebestrukturen nachgewiesen werden. Endometrioide und klarzellige Histologien finden sich in zwölf (6%) beziehungsweise sechs Fällen (3%). Bei 25 (12,4%) der malignen epithelialen Tumore wurde der histologische Subtyp nicht näher klassifiziert.

Bei den drei Keimzelltumoren handelt es sich jeweils um Dysgerminome (1,5%). Bei den fünf kleinzelligen Ovarialkarzinomen sind drei kleinzellige Ovarialkarzinome vom hyperkalzämischen Typ (1,5%), eins ein kleinzelliges Ovarialkarzinom vom pulmonalen Typ (0,5%) und ein kleinzelliges Ovarialkarzinom ist nicht weiter klassifiziert.

In zwölf Fällen (6%) konnten die Tumore anhand des histologischen Befundes keinem histologischen Subtypen zugeordnet werden.

#### 4.6 Histologische Subtypen und detektierte Varianten

Insgesamt konnten bei 42 der 201 Patientinnen mit Tumoren mit verfügbaren histologischen Befunden Keimbahnmutationen in den untersuchten Genen nachgewiesen werden. In 23 der 107 serösen Tumoren konnten Mutationen nachgewiesen werden, davon waren 19 Varianten

in *BRCA1*, eine in *BRCA2*, zwei in *ATM* und eine in *RAD51C*. Nur in einem der 30 muzinösen Tumoren konnte eine Variante in *MSH6* nachgewiesen werden. In den endometrioiden Karzinomen wurden insgesamt vier Mutationen gefunden, drei in *BRCA1* und eine in *MLH1*. Zwei der sechs klarzelligen Tumore wiesen Varianten auf, eine in *BRCA1* und eine *PMS2*. In den nicht weiter klassifizierten malignen epithelialen Tumoren fanden sich sechs Mutationen, davon vier in *BRCA1*, eine in *BRCA2* und eine in *BRIP1*. Zwei der Patientinnen mit kleinzelligem Ovarialkarzinom vom hyperkalzämischen Typ sind Trägerinnen pathogener Varianten in *SMARCA4*. Bei der dritten Patientin mit SCCOHT konnte in anschließenden Untersuchungen eine somatische *SMARCA4*-Mutation im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Bei dem kleinzelligen Ovarialkarzinom vom pulmonalen Typ konnte eine Keimbahnmutation in *TP53* gefunden werden. Und in den nicht weiter klassifizierten Tumoren wurden zwei Keimbahnvarianten in *BRCA1* und eine *ATM* gefunden.

Tabelle 15: Histologischer Subtyp in Bezug zu detektierten Varianten

Histologischer Subtyp	PVs in <i>BRCA1/2</i> (%)	Varianten in weiteren gesicherten OC- und OC Kandidatengen (%)
Serös	20 (47,6)	3 (7,1)
CC	1 (2,4)	1 (2,4)
MC	0	1 (2,4)
EC	3 (7,1)	1 (2,4)
Nicht weiter klassifizierte maligne epitheliale Tumore	5 (11,9)	1 (2,4)
Keimzelltumore	0	0
SCCOHT	0	2 (4,8)
SCCOPT	0	1 (2,4)
Nicht weiter klassifizierte Tumore	2 (4,8)	1 (2,4)

Detektierte Varianten in *BRCA1/2* und weiteren OC-Genen in der Gruppe der Frauen mit Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren

#### 4.7 Konstitutive Methylierung der Promotorregion des *BRCA1*-Gens

Die Methylierungsanalyse der Promotorregion des *BRCA1*-Gens konnte für 425 Proben durchgeführt werden. Bis auf zwei Proben konnte die Analyse erfolgreich ausgeführt werden. Somit sind Ergebnisse über die prozentuale Methylierung der *BRCA1*-Promotorregion von 423 Proben verfügbar. In 26 Fällen konnte eine Methylierung  $\geq 5\%$  nachgewiesen werden. Bei drei dieser 26 Patientinnen mit nachgewiesener Hypermethylierung der *BRCA1*-Promotorregion wurden pathogene Varianten in *SMARCA4*, *MUTYH* und *NBN* gefunden.

Tabelle 16: Häufigkeit der Fälle mit Hypermethylierung ( $\geq 5\%$ ;  $\geq 2\%$ ;  $\geq 1\%$ ) der *BRCA1*-Promotorregion

	Anteil Fälle mit Methylierung der <i>BRCA1</i> -Promotorregion $\geq 5\%$ (%)	Anteil Fälle mit Methylierung der <i>BRCA1</i> -Promotorregion $\geq 2\%$ (%)	Anzahl Fälle mit Methylierung der <i>BRCA1</i> -Promotorregion $\geq 1\%$ (%)
n=423	26 (6,1)	36 (8,5)	48 (11,3)

Betrachtet man die Fälle mit einer Methylierung  $\geq 2\%$  und  $\geq 1\%$  der *BRCA1*-Promotorregion liegt diese in 8,5% beziehungsweise 11,3% aller 423 Fälle vor.

#### 4.7.1 Konstitutive Methylierung der Promotorregion des *BRCA1*-Gens in Bezug zur familiären Belastung

Bei den 154 singulären Fällen weisen 7,8% eine Methylierung der *BRCA1*-Promotorregion  $\geq 5\%$  auf. Außerdem konnte bei 5,7% der Patientinnen mit einer familiären Belastung von Brust- und Eierstockkrebs eine Hypermethylierung nachgewiesen werden. Bei nur einer Frau mit familiärer Häufung von Ovarialkarzinomen aber keinen Brustkrebserkrankungen zeigte die Methylierungsanalyse ein positives Ergebnis.

Tabelle 17: Hypermethylierung  $\geq 5\%$  der *BRCA1*-Promotorregion in Abhängigkeit von der Familiengeschichte

	Anzahl Methylierte (%)
Singuläre Fälle (n=154)	12 (7,8)
Familiengeschichte mit BC (n=229)	13 (5,7)
Familiengeschichte mit nur OC (n=40)	1 (2,5)

Somit weisen 7,8% der singulären Fälle und 5,2% der Fälle mit positiver Familiengeschichte eine Hypermethylierung  $\geq 5\%$  der *BRCA1*-Promotorregion auf.

Hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede der Hypermethylierung der *BRCA1*-Promotorregion in Bezug zur Familiengeschichte feststellen ( $p=,299$ ).

#### 4.7.2 Konstitutive Methylierung der Promotorregion des *BRCA1*-Gens im Abhängigkeit vom Erkrankungsalter

Wird nun das durchschnittliche Erkrankungsalter der Frauen mit einer nachgewiesenen Hypermethylierung der Promotorregion des *BRCA1*-Gens mit dem durchschnittlichen Erkrankungsalter der Frauen ohne einen solchen Nachweis verglichen, lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Tabelle 18: Vergleich des durchschnittlichen Erkrankungsalters in Bezug zum Methylierungsstatus

	Methylierung der <i>BRCA1</i> - Promotorregion $\geq 5\%$	Methylierung der <i>BRCA1</i> - Promotorregion $< 5\%$
Absolute Häufigkeit (%)	26 (6,1)	397 (93,9)
Durchschnittliches Erkrankungsalter (Jahre)	30,5	31,1
t-Test für die Mittelwertgleichheit		
Signifikanzniveau 2-seitig		p=,641

Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patientinnen mit nachgewiesener Hypermethylierung der *BRCA1*-Promotorregion liegt bei 30,5 Jahren und bei Patientinnen ohne Nachweis einer Hypermethylierung bei 31,1 Jahren.

#### 4.7.3 Konstitutive Methylierung der Promotorregion des *BRCA1*-Gens in der Kohorte der jung-erkrankten Frauen im Vergleich zur Kontrollkohorte

Im nächsten Schritt wurde eine Kontrollgruppe 503 nicht-erkrankter Frauen auf eine Keimbahn-Methylierung in der *BRCA1*-Promotorregion untersucht, um die Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der Methylierungsanalyse des Studienkollektivs zu vergleichen.

Das mediane Alter der Frauen der Kontrollgruppe liegt bei 65 Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme. In 476 Fällen konnten die Ergebnisse der quantitativen Methylierungsanalyse ausgewertet werden.

Tabelle 19: Vergleich der Häufigkeiten detektierter Fälle mit einer Methylierung der *BRCAl*-Promotorregion ( $\geq 5\%$ ;  $\geq 2\%$ ;  $\geq 1\%$ ); Signifikanzniveau und Odds Ratio

	Studienkohorte OC n=423	Kontrollgruppe n=476
<b>Methylierung der <i>BRCAl</i>-Promotorregion <math>\geq 5\%</math></b>		
Absolute Häufigkeit (%)	26 (6,1)	7 (1,5)
Exakter Test nach Fisher		p=,000
Signifikanzniveau 2-seitig		
Odds Ratio		4,39
<b>Methylierung der <i>BRCAl</i>-Promotorregion <math>\geq 2\%</math></b>		
Absolute Häufigkeit (%)	36 (8,5)	20 (4,2)
Exakter Test nach Fisher		p=,008
Signifikanzniveau 2-seitig		
Odds Ratio		2,12
<b>Methylierung der <i>BRCAl</i>-Promotorregion <math>\geq 1\%</math></b>		
Absolute Häufigkeit (%)	48 (11,3)	26 (5,5)
Exakter Test nach Fisher		p=,001
Signifikanzniveau 2-seitig		
Odds Ratio		2,22

In der Studiengruppe der jung-erkrankten Patientinnen mit Ovarialkarzinom konnte in 6,1% eine Methylierung der *BRCAl*-Promotorregion über 5% nachgewiesen. Damit liegt der Anteil der Frauen mit nachgewiesener Methylierung signifikant über dem Anteil der Frauen aus der Kontrollgruppe mit nachgewiesener Methylierung. Das höchste Signifikanzniveau ist bei einer prozentualen Methylierung  $\geq 5\%$  zu beobachten, jedoch zeigen sich bei einem Methylierungslevel von  $\geq 2\%$  beziehungsweise  $\geq 1\%$  auch signifikante Unterschiede zwischen der Studienkohorte und der Kontrollgruppe. Auch die Odds Ratio ist am höchsten bei einer prozentualen Methylierung von  $\geq 5\%$  und zeigt, dass eine positive Assoziation zwischen der *BRCAl*-Promotor-Hypermethylierung und jung-erkrankten Frauen mit Ovarialkarzinom besteht.

## 5 Diskussion

Im folgenden Kapitel sollen nun die dargestellten Ergebnisse diskutiert und mit bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur in Bezug gesetzt werden.

### 5.1 *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz

Im Kollektiv aller 4.975 Frauen mit Ovarialkarzinom ohne zusätzliche Brustkrebserkrankung, die sich im Rahmen einer molekulargenetischen Untersuchung in den verschiedenen Zentren des Deutschen Konsortiums Familiärer- Brust und Eierstockkrebs vorgestellt haben, konnten 1.635 Trägerinnen pathogener Varianten den Genen *BRCA1* und *BRCA2* identifiziert werden. Somit ergibt sich eine *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz von 32,9%. Dieser Wert ist übereinstimmend mit der *BRCA1/2*-Mutationsrate in Kollektiven mit positiver Familiengeschichte (32-39%)<sup>12,13</sup>, was sich dadurch erklären lässt, dass sich besonders Frauen mit einer familiären Häufung von Brust- und Eierstockkrebs ratsuchend an die Zentren des GC-HBOC wenden. Das mediane Erkrankungsalter bei Erstdiagnose des Ovarialkarzinoms liegt bei 63 Jahren<sup>4</sup>, wobei festgestellt werden konnte, dass Frauen mit pathogenen Varianten in *BRCA1* im Durchschnitt deutlich früher erkranken. In der Studie von Norquist et al. hatten Frauen mit pathogenen *BRCA1*-Varianten ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 52 Jahren<sup>1</sup> und auch bei Carter et al. erkrankten *BRCA1*-Mutationsträgerinnen mit 51 Jahren deutlich früher als Frauen ohne Nachweis pathogener Varianten, bei denen das mediane Erkrankungsalter bei 59 Jahren lag<sup>6</sup>. Aufgrund der hohen *BRCA1/2*-Mutationsrate (32,9%) innerhalb des Studienkollektivs verglichen mit unselektierten Kohorten<sup>1,6,13</sup> erkrankten die meisten Patientinnen bereits vor einem Alter von 60 Jahren, das mediane Erkrankungsalter der 4.975 an OC erkrankten Patientinnen liegt bei 54 Jahren. Übereinstimmend damit zeigt sich im untersuchten Kollektiv des GC-HBOC die größte *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz mit 47,2% in der Gruppe derer, die in einem Alter von 41-50 Jahre mit Eierstockkrebs diagnostiziert wurden und das mediane Erkrankungsalter bei Patientinnen mit Nachweis einer *BRCA1/2*-Mutation liegt bei 52 Jahren.

### 5.2 Mutationsprävalenz in der Kohorte der jung-erkrankten Frauen

Das Ovarialkarzinom wird selten bei jungen Frauen diagnostiziert und aus diesem Grund ist auch die Datenlage zur Mutationsprävalenz Eierstockkrebs-prädisponierender Gene in dieser speziellen Gruppe noch unklar. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte ein Kollektiv von

729 Frauen mit einem Erkrankungsalter von  $\leq 40$  Jahren molekulargenetisch untersucht werden, um diese Forschungsfrage weiter zu ergründen.

Die *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz der Gruppe der 729 Frauen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren ist mit 20% im Vergleich zu der Mutationsprävalenz der Gesamtkohorte mit 32,9% deutlich geringer. Diese Ergebnisse sind inkonsistent mit den bisherigen Publikationen zur speziellen Gruppe der früherkrankten Frauen mit Ovarialkarzinom. Arts-De Jong et al. beschreiben in ihrer Kohorte eine vergleichbare *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz gegenüber altersunspezifischen Kollektiven<sup>84</sup> und Bernards et al. fanden sogar eine erhöhte *BRCA1*-Mutationsprävalenz bei jung-erkrankten Frauen  $\leq 40$  Jahren<sup>83</sup>. Konträr zu den Folgerungen von Stratton et al., dass dem Ovarialkarzinom  $\leq 30$  Jahren keine genetische Prädisposition zugrunde liegt<sup>79</sup>, konnten sowohl zwölf *BRCA1/2*-Mutationen als auch acht weitere Varianten in gesicherten OC- und OC-Kandidatengenegen gezeigt werden. Dies könnte durch das kleinere Studienkollektiv von Stratton et al. bedingt sein. Wie schon beschrieben sind die Studien von Arts-Jong et al.<sup>84</sup>, Bernards et al.<sup>83</sup> und Stratton et al.<sup>79</sup> aufgrund ihrer sehr kleinen Studienkohorten nur eingeschränkt aussagekräftig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich im Kollektiv der 729 Frauen mit einem Erkrankungsalter  $\leq 40$  Jahren eine deutlich geringere *BRCA1/2*-Mutationsprävalenz im Vergleich zu altersunselektierten Kohorten finden lässt.

### **5.3 Mutationsprävalenz in nicht-*BRCA1* gesicherten OC-Genen und OC-Kandidatengenegen**

In den MMR-Genen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS* konnten in den bereits publizierten Studien nicht einstimmig valide Aussagen über die Assoziation mit Eierstockkrebs getroffen werden. Nur in der Studie von LaDuca et al. konnten positive Assoziationen zwischen allen MMR-Genen und Eierstockkrebs festgestellt werden.<sup>7</sup> In dem untersuchten Kollektiv der 455 *BRCA1/2*-negativen Frauen konnten insgesamt fünf pathogene Varianten in den MMR-Genen gefunden werden, woraus sich eine Mutationsprävalenz von 1,1% ergibt. In der Studie von Carter et al. ergibt sich eine sehr ähnliche Frequenz von 1,2%<sup>6</sup> und bei Norquist et al. ist die Mutationsprävalenz mit 0,4% etwas geringer<sup>1</sup>. Alle dargestellten Studien konnten positive Assoziationen mit den gesicherten OC-Genen *RAD51C* und *RAD51D* feststellen.<sup>1,6,7,11</sup> Im Studienkollektiv der jung-erkrankten Frauen gab es jedoch keine einzige Trägerin einer pathogenen Variante in *RAD51D*. Es konnten zwei pathogene Varianten im *RAD51C*-Gen aufgezeigt werden, welche einen Anteil von 0,44% ausmachen und vergleichbar zu den Mutationsprävalenzen der Literatur (0,6-0,9%) sind.<sup>1,6,7,11</sup> Bei dem OC-Kandidatengenegen *ATM*



konnten Lilyquist et al. und Carter et al. eine positive Assoziation mit einer Mutationsprävalenz von 0,9% beziehungsweise 0,7% aufzeigen.<sup>6,11</sup> Die *ATM*-Mutationsprävalenz der früherkrankten Patientinnen ist mit 1,1% vergleichbar zur Literatur. In allen Studien, bis auf die Studie von LaDuca et al., konnte eine positive Assoziation zwischen *PALB2* und Eierstockkrebs festgestellt werden und die Mutationsprävalenz lag bei 0,36-0,6%.<sup>1,6,11</sup> Übereinstimmend konnte eine *PALB2*-Mutationsprävalenz von 0,66% in der Gruppe der früherkrankten Frauen festgestellt werden. Die Mutationsprävalenz von *BRIP1* ist mit 0,22% in der Kohorte der Frauen mit einem frühen Erkrankungsalter etwas geringer als in der Literatur (0,9-1,4%).<sup>1,6,11</sup>

Es kann geschlussfolgert werden, dass die Mutationsprävalenz in nicht-*BRCAl/2* gesicherten OC-Genen und OC-Kandidatengen bei Frauen mit einem Erkrankungsalter von  $\leq 40$  Jahren vergleichbar zu der Mutationsprävalenz derselben Gene in alterunselektierten Kollektiven ist. Bernards et al. stellten in ihrer Studie fest, dass zwar die *BRCAl*-Mutationsprävalenz in der Gruppe der jung-erkrankten Patientinnen höher als in unselektierten Kollektiven ist, jedoch pathogene Varianten in weiteren OC-Genen generell selten bei Frauen mit jungem Erkrankungsalter zu finden sind.<sup>83</sup>

#### **5.4 Mutationsprävalenzen in Bezug zur familiären Belastung**

Die *BRCAl/2*-Mutationsprävalenz in der Gruppe der jung-erkrankten Frauen mit einer familiären Häufung von Brust- und Eierstockkrebs ist deutlich höher als bei den Frauen ohne familiäre Belastung. Dies lässt sich durch die bekannte starke Assoziation von *BRCAl* und *BRCAl2* mit beiden Erkrankungen erklären und ist auch in anderen Studienkollektiven zu beobachten<sup>12,13,84</sup>. Im Gegensatz dazu beschreiben Bernards et al. bei jung-erkrankten Frauen mit Ovarialkarzinom keine erhöhte Mutationsprävalenz in Eierstockkrebs-prädisponierenden Genen bei familiärer Häufung von Brust- und Eierstockkrebs.<sup>83</sup> Interessanterweise ist die höchste Mutationsprävalenz in nicht-*BRCAl/2* Genen im Kollektiv der früherkrankten Patientinnen mit 4,96% bei singulären Fällen ohne familiäre Belastung zu finden.

#### **5.5 Histologie der Tumoren**

Bei einem Großteil der diagnostizierten Ovarialtumore handelt es sich um maligne epitheliale Tumore.<sup>36</sup> Das zeigt sich auch im Kollektiv der früherkrankten Patientinnen. In 94% der verfügbaren histologischen Befunde wurde die Diagnose des Karzinoms gestellt. Die Häufigkeiten der verschiedenen Subtypen der malignen epithelialen Tumore, die im

untersuchten Kollektiv beschrieben wurden, entsprechen überwiegend den Angaben aus der Literatur.<sup>36,37</sup> Auffallend ist, dass in 30 Fällen (16%) die Diagnose eines muzinösen Karzinoms gestellt wurde. Diese Diagnose stellt einen deutlich größeren Anteil der Ovarialkarzinome, im Vergleich zur beschriebenen Häufigkeit in der Literatur (3-4%), dar.<sup>37</sup> In etwa der Hälfte der Patientinnen mit einem serösen Karzinom konnte eine pathogene Keimbahnvariante in *BRCA1/2* nachgewiesen werden. Dieser große Anteil erklärt sich die starke Assoziation von pathogenen Varianten in den *BRCA*-Genen mit dem high-grade serösen Karzinom.<sup>1,6,16</sup> Pathogene Varianten in *BRCA1/2* und weiteren OC-Genen konnten in jedem histologischen Subtyp, bis auf Keimzelltumore, nachgewiesen werden. Dies bestätigt die bereits publizierte Annahme, dass bei keinem histologischen Subtyp des Ovarialkarzinoms eine hereditäre Erkrankung ausgeschlossen werden kann.<sup>1,6,15,16</sup> Zusätzlich konnte in drei der seltenen Fälle des Ovarialkarzinoms vom hyperkalzämischen Typ somatische *SMARCA4* Mutationen detektiert werden. Über die starke Assoziation von *SMARCA4* mit diesem Typ gibt es bereits einige publizierte Studien.<sup>46-48</sup>

## **5.6 Konstitutive Methylierung der Promotorregion des *BRCA1*-Gens in der Kohorte der jung-erkrankten Frauen im Vergleich zu einer Kontrollkohorte**

In der vorliegenden Studie konnte bei dem Vergleich der Häufigkeit des Auftretens einer Hypermethylierung der *BRCA1*-Promotorregion bei früherkrankten Patientinnen mit Ovarialkarzinom und einer nicht-erkrankten Kontrollkohorte gezeigt werden, dass die Hypermethylierung signifikant häufiger im Kollektiv der jung-erkrankten Patientinnen im Vergleich zu nicht-erkrankten Frauen zu finden ist. Bei einer Odds Ratio von 4,39 bei einer Methylierung von  $\leq 5\%$  kann so eine positive Assoziation gezeigt werden. Azzollini et al. und Snell et al. konnten in der Vergangenheit bereits zeigen, dass die Hypermethylierung der *BRCA1*-Promotorregion eine Rolle in der Entstehung von *BRCA1*-phänotypischem Brustkrebs spielt.<sup>75,76</sup> Auch der Zusammenhang zwischen einer *BRCA1*-Promotor-Hypermethylierung und Eierstockkrebs konnte gezeigt werden.<sup>14,17,18</sup> Die vorliegende Studie kann nun diesen Zusammenhang bestätigen.

Dass epigenetische Merkmale generationsübergreifend auftreten können, konnte bereits gezeigt werden.<sup>18,72-74</sup> Als ursächlich für die Hypermethylierung der Promotorregionen verschiedener Gene (*MLH1*, *MSH2* und *BRCA1*) konnten Mutationen in Cis-Elementen<sup>18,73,74</sup> und angrenzenden kodierenden Genregionen<sup>72</sup> identifiziert werden. Gegenstand künftiger

Forschung könnte die Identifikation weiterer Ursachen für die aus der Hypermethylierung der Promotorregion resultierende Stummschaltung bestimmter Genabschnitte darstellen.

Da gezeigt werden konnte, dass Hypermethylierung als epigenetische Modifikation neben pathogenen Mutationen eine Rolle in der Pathogenese hereditärer und sporadischer Krebserkrankungen spielt, könnte dies künftig auch in der Prävention und Früherkennung berücksichtigt werden. Erkenntnisse aus künftigen umfassenderen Untersuchungen könnten zu einer umfangreicheren molekulargenetischen Diagnostik unter Einbeziehung epigenetischer Faktoren bei Verdacht auf hereditäre Brust- und Eierstockkrebserkrankungen führen und Frauen ohne Nachweis pathogener Genvarianten den Zugang zu präventiven Maßnahmen ermöglichen.

## 5.7 Limitationen

Im Gesamtkollektiv der 4.975 erkrankten Patientinnen kann davon ausgegangen werden, dass die Mutationsprävalenz vergleichbar mit derer in Kohorten mit familiärer Häufung ist. Zwar finden sich im Gesamtkollektiv auch singuläre Fälle, jedoch wenden sich vorrangig Frauen mit familiärer Häufung ratsuchend an das GC-HBOC. Im Gesamtkollektiv aller 4.975 Frauen mit Ovarialkarzinom können genaue Aussagen über den Anteil der Patientinnen mit positiver Familiengeschichte aufgrund von fehlenden Daten nicht getroffen werden.

Die Anzahl der detektierten pathogenen Varianten nicht-*BRCA1/2* gesicherten OC-Genen und OC-Kandidatengen ist so gering, dass größere Stichproben jung-erkrankter Frauen mit Ovarialkarzinom nötig sind, um valide Aussagen über die Mutationsprävalenz dieser Gene treffen zu können.

Die Mutationsprävalenz der nicht-*BRCA1/2* Gene ist nur eingeschränkt mit der Mutationsprävalenz aus den bereits publizierten Studien zu vergleichen, da nur die *BRCA1/2*-negativen Fälle eine Multigenpaneltestung erhalten haben, so eine Vorselektion stattgefunden hat und die Mutationsprävalenz vermutlich in unselektierten Kohorten geringer ausfallen würde.

Bei dem Vergleich der Häufigkeit einer Hypermethylierung der *BRCA1*-Promotorregion in der Studienkohorte mit der Vergleichskohorte ist die Altersspanne nicht übereinstimmend, wodurch es zu einer möglichen Verzerrung der Ergebnisse kommen kann.

In der vorliegenden Studie konnte die Hypermethylierung der *BRCA1*-Promotorregion bislang nur in tumorfreiem Gewebe gezeigt werden, um zu beweisen, dass die Hypermethylierung auch ätiologisch für die Erkrankung ist, müsste die Hypermethylierung im nächsten Schritt auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Diese Korrelation zwischen dem Nachweis

einer Hypermethylierung in Blut und Tumorgewebe konnte in der Studie von Hauke et al. bereits demonstriert werden.<sup>14</sup>

Eine Altersassoziation der Hypermethylierung konnte in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden, hierzu sollten umfangreichere Studien mit Kohorten, die unselektiert in Bezug zum Erkrankungsalter sind, durchgeführt werden. In der Studie von Lønning et al. konnte gezeigt werden, dass eine Hypermethylierung der *BRCAl*-Promotorregion mit zunehmendem Alter abnimmt.<sup>17</sup>

Abschließend kann gesagt werden, dass Hypermethylierung neben der reinen Änderung der Basenabfolge der DNA eine Rolle in der Karzinogenese spielt. Eine positive Assoziation konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Gegenstand künftiger Forschung sollte nun die Identifikation weiterer möglicher Varianten in Cis-Elementen oder anliegenden Genregionen sein, die ursächlich für eine Hypermethylierung der *BRCAl*-Promotorregion sind. Zudem braucht es umfangreichere Studien, um festzustellen, ob die Testung auf Hypermethylierung in der Routinediagnostik angeboten werden sollte.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, *et al.* Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncol* 2016; **2**: 482–90.
- 2 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; **71**: 209–49.
- 3 Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13, 13. Ausgab. Berlin, 2021.
- 4 SEER Cancer Statistics Factsheets: Ovarian Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html> (zuletzt abgerufen am 18.08.2021).
- 5 Mavaddat N, Peock S, Frost D, *et al.* Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst* 2013; **105**: 812–22.
- 6 Carter NJ, Marshall ML, Susswein LR, *et al.* Germline pathogenic variants identified in women with ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2018; **151**: 481–8.
- 7 LaDuca H, Polley EC, Yussuf A, *et al.* A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genet Med* 2020; **22**: 407–15.
- 8 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 5.1, 2022, AWMF-Registernummer: 032/035OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/> (zuletzt abgerufen am 21.07.2022).
- 9 Hall JM, Lee MK, Newman B, *et al.* Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science (80- )* 1990; **250**: 1684–9.
- 10 Wooster R, Bignell G, Lancaster J, *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; **378**: 789–92.
- 11 Lilyquist J, LaDuca H, Polley E, *et al.* Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls. *Gynecol Oncol* 2017; **147**: 375–80.
- 12 Harter P, Hauke J, Heitz F, *et al.* Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). *PLoS*

- One* 2017; **12**: 1–12.
- 13 Alsop K, Fereday S, Meldrum C, *et al.* BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: A report from the Australian ovarian cancer study group. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 2654–63.
  - 14 Hauke J, Hahnen E, Schneider S, *et al.* Deleterious somatic variants in 473 consecutive individuals with ovarian cancer: Results of the observational AGO-TR1 study (NCT02222883). *J Med Genet* 2019; **56**: 574–80.
  - 15 Pal T, Akbari MR, Sun P, *et al.* Frequency of mutations in mismatch repair genes in a population-based study of women with ovarian cancer. *Br J Cancer* 2012; **107**: 1783–90.
  - 16 Song H, Cicek MS, Dicks E, *et al.* The contribution of deleterious germline mutations in BRCA1, BRCA2 and the mismatch repair genes to ovarian cancer in the population. *Hum Mol Genet* 2014; **23**: 4703–9.
  - 17 Lønning P, Berge E, Bjørnslett M, *et al.* White Blood Cell BRCA1 Promoter Methylation Status and Ovarian Cancer Risk. *Ann Intern Med* 2018; **168**: 326–34.
  - 18 Evans DGR, van Veen EM, Byers HJ, *et al.* A Dominantly Inherited 5' UTR Variant Causing Methylation-Associated Silencing of BRCA1 as a Cause of Breast and Ovarian Cancer. *Am J Hum Genet* 2018; **103**: 213–20.
  - 19 Vasen HFA. Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. *Fam Cancer* 2005; **4**: 219–25.
  - 20 Shuch B, Vourganti S, Ricketts CJ, *et al.* Defining early-onset kidney cancer: Implications for germline and somatic mutation testing and clinical management. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 431–7.
  - 21 Ditsch N, Untch M, Kolberg-Liedtke C, *et al.* AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer: Update 2020. *Breast Care* 2020; **15**: 294–309.
  - 22 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 3.0, 2019, AWMF-Registernummer: 032/035OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/> (zuletzt abgerufen am 02.08.2021).
  - 23 Ledermann JA, Harter P, Gourley C, *et al.* Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial.

- Lancet Oncol* 2016; **17**: 1579–89.
- 24 Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, *et al.* Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2016; **375**: 2154–64.
- 25 Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, *et al.* Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA - J Am Med Assoc* 2017; **317**: 2402–16.
- 26 Meijers-Heijober H, van Geel B, van Putten WLJ, *et al.* Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2001; **345**: 159–64.
- 27 Rhiem K, Pfeifer K, Schmutzler R, Kiechle M. Risk-reducing Surgery in Women at Risk for Familial Breast or Ovarian Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2012; **72**: 833–9.
- 28 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020, AWMF Registernummer: 032-045OL. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (zuletzt abgerufen am 16.08.2021).
- 29 Jacobs IJ, Menon U, Gentry-Maharaj A, *et al.* Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK collaborative trial of ovarian cancer screening (UKCTOCS): A randomised controlled trial. *Lancet* 2016; **387**: 945–56.
- 30 Van der Velde NM, Mourits MJE, Arts HJG, *et al.* Time to stop ovarian cancer screening in BECA1/2 mutation carriers? *Int J Cancer* 2009; **124**: 919–23.
- 31 Rhiem K. Preventive surgery options for women with hereditary breast and ovarian cancer. *Med Genet* 2015; **27**: 231–7.
- 32 Finch APM, Lubinski J, Møller P, *et al.* Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 1547–53.
- 33 American Cancer Society. Ovarian Cancer Staging. <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/> (zuletzt abgerufen am 21.07.2022).
- 34 Prat J for the FC on GO. International Journal of Gynecology and Obstetrics Staging classification for cancer of the ovary , fallopian tube , and peritoneum. *Int J Gynecol Obstet* 2014; **124**: 1–5.
- 35 Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, *et al.* Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; **68**: 284–96.

- 36 Prat J. Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* 2012; **460**: 237–49.
- 37 Gilks CB, Prat J. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum Pathol* 2009; **40**: 1213–23.
- 38 Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, *et al.* Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2014; **20**: 764–75.
- 39 Sugino K, Tamura R, Nakaoka H, *et al.* Germline and somatic mutations of homologous recombination-associated genes in Japanese ovarian cancer patients. *Sci Rep* 2019; **9**: 1–9.
- 40 Schrader KA, Hurlburt J, Kalloger SE, *et al.* Germline *brca1* and *brca2* mutations in ovarian cancer: Utility of a histology-based referral strategy. *Obstet Gynecol* 2012; **120**: 235–40.
- 41 Bois A Du, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. 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 studien-gruppe ovarialkarzin. *Cancer* 2009; **115**: 1234–44.
- 42 Prat J. Ovarian carcinomas, including secondary tumors: Diagnostically challenging areas. *Mod Pathol* 2005; **18**: 99–111.
- 43 Reed N, Pautier P, Åvall-Lundqvist E, *et al.* Gynecologic Cancer InterGroup (GCIIG) Consensus Review for Ovarian Small Cell Cancers. *Int J Gynecol Cancer* 2014; **24**: 30–4.
- 44 Weber-Lassalle N, Hauke J, Ramser J, *et al.* BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res* 2018; **20**: 1–6.
- 45 Song H, Dicks E, Ramus SJ, *et al.* Contribution of germline mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D genes to ovarian cancer in the population. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 2901–7.
- 46 Callegaro-Filho D, Gershenson D, Nick A, *et al.* Small Cell Carcinoma of the Ovary – Hypercalcemic Type (SCCOHT): A Review of 47 Cases. *Gynecol Oncol* 2016; **140**: 53–7.
- 47 Witkowski L, Carrot-Zhang J, Albrecht S, *et al.* Germline and somatic SMARCA4 mutations characterize small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. *Nat*



- Genet* 2014; **46**: 438–43.
- 48 Ramos P, Karnezis AN, Craig DW, *et al.* Small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type, displays frequent inactivating germline and somatic mutations in SMARCA4. *Nat Genet* 2014; **46**: 427–9.
- 49 Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; **68**: 820–3.
- 50 Hino O, Kobayashi T. Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci* 2017; **108**: 5–11.
- 51 Knudson AG, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; **72**: 5116–20.
- 52 Stoppa-Lyonnet D. The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: Where do we go from here? *Eur J Hum Genet* 2016; **24**: S3–9.
- 53 Knijnenburg T, Wang L, Zimmermann M, *et al.* Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell Rep* 2018; **1**: 239–254.
- 54 LI X, Heyer W-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 2008; **18**: 99–113.
- 55 Yang X, Leslie G, Doroszuk A, Schneider S, Allen J, Decker B. Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants : An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol* 2020; **38**: 674–85.
- 56 Lynch PM. Current approaches in familial colorectal cancer: A clinical perspective. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw* 2006; **4**: 421–30.
- 57 Tischkowitz M, Balmaña J, Foulkes W, *et al.* Management of individuals with germline variants in PALB2: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2021; **23**: 1416–23.
- 58 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; **429**: 457–63.
- 59 Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 2012; **13**: 97–109.
- 60 Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science (80- )* 2001; **293**: 1068–70.
- 61 Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2009; **31**: 27–36.

- 62 Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev* 1991; **55**: 451–8.
- 63 Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; **196**: 261–82.
- 64 Hansmann T, Pliushch G, Leubner M, *et al.* Constitutive promoter methylation of BRCA1 and RAD51C in patients with familial ovarian cancer and early-onset sporadic breast cancer. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 4669–79.
- 65 Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Abberant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 687–92.
- 66 Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: A booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; **21**: 5427–40.
- 67 Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Res* 2016; **76**: 3446–50.
- 68 Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2042–54.
- 69 Bianco T, Chenevix-Trench G, Walsh DCA, Cooper JE, Dobrovic A. Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 147–51.
- 70 Hitchins MP, Ward RL. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2009; **46**: 793–802.
- 71 Chong S, Youngson NA, Whitelaw E. Heritable germline epimutation is not the same as transgenerational epigenetic inheritance [5]. *Nat Genet* 2007; **39**: 574–5.
- 72 Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, *et al.* Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; **41**: 112–7.
- 73 Morak M, Ibisler A, Keller G, *et al.* Comprehensive analysis of the MLH1 promoter region in 480 patients with colorectal cancer and 1150 controls reveals new variants including one with a heritable constitutional MLH1 epimutation. *J Med Genet* 2018; **55**: 240–8.
- 74 Hitchins MP, Rapkins RW, Kwok CT, *et al.* Dominantly Inherited Constitutional Epigenetic Silencing of MLH1 in a Cancer-Affected Family Is Linked to a Single Nucleotide Variant within the 5'UTR. *Cancer Cell* 2011; **20**: 200–13.

- 75 Azzollini J, Pesenti C, Pizzamiglio S, *et al.* Constitutive BRCA1 promoter hypermethylation can be a predisposing event in isolated early-onset breast cancer. *Cancers (Basel)* 2019; **11**: 1–15.
- 76 Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2008; **10**: 1–8.
- 77 Chan KYK, Ozçelik H, Cheung ANY, Ngan HYS, Khoo US. Epigenetic factors controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* 2002; **62**: 4151–6.
- 78 Kontorovich T, Cohen Y, Nir U, Friedman E. Promoter methylation patterns of ATM, ATR, BRCA1, BRCA2 and P53 as putative cancer risk modifiers in Jewish BRCA1/BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 2009; **116**: 195–200.
- 79 Stratton JF, Thompson D, Bobrow L, *et al.* The genetic epidemiology of early-onset epithelial ovarian cancer: A population-based study. *Am J Hum Genet* 1999; **65**: 1725–32.
- 80 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; **69**: 7–34.
- 81 Cummings S, Roman SS, Saam J, *et al.* Age of ovarian cancer diagnosis among BRIP1, RAD51C, and RAD51D mutation carriers identified through multi-gene panel testing. *J Ovarian Res* 2021;1–7.
- 82 Lu HM, Li S, Black MH, *et al.* Association of Breast and Ovarian Cancers with Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA Oncol* 2019; **5**: 51–7.
- 83 Bernardis SS, Norquist BM, Harrell MI, *et al.* Genetic characterization of early onset ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2016; **140**: 221–5.
- 84 Arts-De Jong M, Manders CM, Hoogerbrugge N, *et al.* Added value of family history in counseling about risk of BRCA1/2 mutation in early-onset epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013; **23**: 1406–10.
- 85 Bundesministerium für Bildung und Forschung: HerediCaRe - Aufbau eines nationalen Registers zur Evaluierung und Verbesserung risiko-adaptierter Prävention für erblichen Brust- und Eierstockkrebs. <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/heredi>. 2023 (zuletzt abgerufen am 27.02.2023).
- 86 Schmutzler RK. Konsensusempfehlung des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs zum Umgang mit Ergebnissen der Multigenanalyse. *Geburtshilfe*

- und Frauenheilkd 2017* 2017; **77**: 733–9.
- 87 van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014; **30**: 418–26.
- 88 Illumina, Inc. Online Training. [https://support.illumina.com/training.html?filters=web%253Aasset\\_type%252Ftraining%252Fonline\\_training](https://support.illumina.com/training.html?filters=web%253Aasset_type%252Ftraining%252Fonline_training) (zuletzt abgerufen am 10.01.2023).
- 89 Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 5463–7.
- 90 Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 2016; **107**: 1–8.
- 91 ThermoFisher, Learning Center. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center.html> (zuletzt abgerufen am 10.01.2023).
- 92 Plagnol V, Curtis J, Epstein M, *et al.* A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* 2012; **28**: 2747–54.
- 93 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: e57.
- 94 Plon SE, Eccles DM, Easton D, *et al.* Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results Sharon. *Hum Mutat* 2008; **29**: 1282–91.
- 95 Frommer M, McDonald LE, Millar DS, *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5- methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 1827–31.
- 96 Jung M, Kristiansen G, Dietrich D. DNA methylation analysis of Free-Circulating DNA in body fluids. *Methods Mol Biol* 2018; **1708**: 621–41.
- 97 Dietrich D, Jung M, Puetzer S, *et al.* Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. *PLoS One* 2013; **8**.

## **Anhang**

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Bindung einer Methylgruppe an Cytosin.....	25
Abbildung 2: Transkription.....	26
Abbildung 3: Flussdiagramm des Studienkollektivs .....	33
Abbildung 4: Sequenzierung durch Synthese .....	38
Abbildung 5: MLPA .....	44
Abbildung 6: Bisulfit-Konvertierung.....	46
Abbildung 7: Auswertung der quantitativen Real-Time PCR .....	49
Abbildung 8: BRCA1/2-Mutationsprävalenz .....	52

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Kumuliertes Erkrankungsrisiko .....	13
Tabelle 2: FIGO Klassifikation mit entsprechender TMN Klassifikation.....	15
Tabelle 3: Anteil pathogener Varianten in BRCA1/2.....	19
Tabelle 4: Studien zur Assoziation ausgewählter Risikogene mit dem Ovarialkarzinom.....	21
Tabelle 5: Mutationsprävalenzen (%) in den Studienkollektiven der vorgestellten Studien...	23
Tabelle 6: Darstellung der Genauswahl für die molekulardiagnostische Untersuchung.....	35
Tabelle 7: Verwendete Primer .....	48
Tabelle 8: Mutationsprävalenz (%) in BRCA1 und BRCA2.....	51
Tabelle 9: BRCA1/2-Mutationsprävalenz .....	53
Tabelle 10: BRCA1/2-Mutationsprävalenz in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter.....	53
Tabelle 11: Mutationsprävalenz in BRCA1/2 und weiteren OC-Genen .....	54
Tabelle 12: Mutationsprävalenz in OC-Genen in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter.....	55
Tabelle 13: Familiengeschichte in Bezug zur Mutationsprävalenz .....	56
Tabelle 14: Histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms .....	57
Tabelle 15: Histologischer Subtyp in Bezug zu detektierten Varianten.....	58
Tabelle 16: Häufigkeit der Fälle mit Hypermethylierung ( $\geq 5\%$ ; $\geq 2\%$ ; $\geq 1\%$ ) der BRCA1-Promotorregion .....	59
Tabelle 18: Hypermethylierung $\geq 5\%$ der BRCA1-Promotorregion in Abhängigkeit von der Familiengeschichte .....	59
Tabelle 19: Vergleich des durchschnittlichen Erkrankungsalters in Bezug zum Methylierungsstatus .....	60
Tabelle 20: Vergleich der Häufigkeiten detektierter Fälle mit einer Methylierung der BRCA1-Promotorregion ( $\geq 5\%$ ; $\geq 2\%$ ; $\geq 1\%$ ); Signifikanzniveau und Odds Ratio .....	61

Die vorliegende Arbeit wurde als Postervortrag auf dem 35. Deutschen Krebskongress, welcher vom 13.-16. November 2022 in Berlin stattfand vorgestellt.

Der Abstract „Constitutive *BRCA1* promoter methylation in early-onset ovarian cancer“ ist unter: 35. Deutscher Krebskongress, Krebsmedizin: Schnittstelle zwischen Innovation & Versorgung, 13.-16. November 2022, Berlin. *Oncol Res Treat* 2022; **45** : S.120

Der Artikel zu dem Projekt ist aktuell in Bearbeitung.