

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Evaluation prognostischer und prädiktiver Biomarker im
Ovarialkarzinom mittels kinetischer RT-PCR aus
Paraffingewebe**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bruno Valentin Sinn
aus Kassel

Gewidmet meinen Eltern

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Denkert
 2. Prof. Dr. med. I. Petersen
 3. Priv.-Doz. Dr. med. S. Loibl

Datum der Promotion: 08. April 2011

Inhalt

Zusammenfassung	4
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung und Fragestellung	6
1.1 Das Ovarialkarzinom – diagnostische und therapeutische Herausforderungen	6
1.2 Prognosefaktoren bei Ovarialkarzinomen	6
1.3 Ansätze zur Untersuchung von Biomarkern in Paraffingewebe – Immunhistologie und RT-PCR	6
1.4 Fragestellung	7
2 Methoden	8
2.1 Patientinnenkollektiv	8
2.2 RNA-Extraktion aus Paraffingewebe	8
2.3 Kinetische RT-PCR	9
2.4 Immunhistologie	9
2.5 Statistische Auswertung	10
3 Ergebnisse	11
3.1 Vascular endothelial growth factor C mRNA- Expression als prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom	11
3.2 Östrogenrezeptor 1 mRNA ist ein unabhängiger prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom	12
3.3 Der Chemoresistenzmarker Multidrug resistance protein 1 als Marker für kürzeres Überleben beim Ovarialkarzinom	13
3.4 Topoisomerase II-alpha mRNA Expression ist mit schlechterem Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom verbunden	14
3.5 IMP3 als positiver prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom	15
3.6 DICER ist ein prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom und korreliert mit der Expression von Östrogenrezeptor 1	16
4 Diskussion	17
Literatur	19
Danksagung	21
Lebenslauf	22
Publikationsverzeichnis und Anteilserklärung	23
Weitere Beteiligungen	25
Eidesstattliche Erklärung	26

Zusammenfassung

Die Archive pathologischer Institute beherbergen eine große Menge an formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material der diagnostischen Routine. Dieses Gewebe stellt wegen seiner einfachen Handhabung und Verfügbarkeit eine attraktive Quelle für die translationale Tumorforschung dar. Auch erschließt es durch seine Eigenschaft als Routinematerial die Möglichkeit, so gewonnene Erkenntnisse für einen klinisch-diagnostischen oder prädiktiven Einsatz nutzbar zu machen. Bis in jüngere Zeit galt die Gewinnung von RNA für den Einsatz in molekularbiologischen Studien aus diesem Material als limitiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine neue, auf magnetischen Partikeln beruhende Methode der RNA-Extraktion aus Paraffingewebe zu evaluieren. Dazu wurde eine Reihe von Biomarkern an einer Gruppe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom untersucht. Das Ovarialkarzinom ist der Tumor des weiblichen Genitaltrakts mit der höchsten Mortalität und mit einer ungünstigen Prognose behaftet. Neue Biomarker zur individuellen Risikoeinschätzung und Therapieplanung sind daher erforderlich. Vor diesem Hintergrund wurde die Expression von Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), Östrogenrezeptor 1 (ESR1), Topoisomerase II alpha (TOP-II α), Multidrug resistance protein 1 (MRP1), DICER und Insulin-like growth factor receptor binding protein 3 (IMP3) untersucht.

Die Arbeit konnte zeigen, dass die aus Paraffingewebe extrahierte RNA für den Einsatz in molekularbiologischen Studien geeignet ist. Damit eröffnet sich eine Möglichkeit, den wachsenden Anforderungen an eine quantitative, reproduzierbare Biomarkerevaluation durch die Pathologie gerecht zu werden. Es fand sich dabei jedoch nicht immer eine Korrelation zwischen RNA- und Proteinexpression, was auf posttranskriptionale Regulationsmechanismen hinweist. Dies bleibt bei der Interpretation so gewonnener Daten zu berücksichtigen. Das wichtigste Ergebnis der Biomarkerevaluation ist die erstmalige Beobachtung, dass die Bestimmung der Expression von Östrogenrezeptor 1 mittels der kinetischen RT-PCR im Gegensatz zur Immunhistologie geeignet ist, biologisch relevante Expressionsunterschiede zu ermitteln.

Abkürzungsverzeichnis

H&E Hämatoxylin-Eosin-Färbung

TMA tissue micro array

FFPE in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet

kRT-PCR kinetische Reverse-Transkriptase PCR

CT cycle at threshold

Δ CT $CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$

VEGF-C Vascular endothelial growth factor C

ESR1 Estrogen receptor 1

MRP1 Multidrug resistance protein 1

TOP-II α Topoisomerase II alpha

IMP3 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3

HR hazard ratio

KI Konfidenzintervall

FIGO Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Das Ovarialkarzinom – diagnostische und therapeutische Herausforderungen

Das Ovarialkarzinom steht an fünfter Stelle der durch Krebs bedingten Todesfälle von Frauen und ist der Tumor des weiblichen Genitaltrakts mit der höchsten Mortalität (1). Aufgrund der späten, unspezifischen Symptome und des Fehlens effektiver Screeningmethoden werden die meisten Erkrankungen erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert. Das Management besteht in einer radikalen operativen Tumorsektion mit adjuvanter Chemotherapie mit einer Platin/Taxol-Kombination. Trotz eines guten Therapieansprechens erleiden die meisten Patientinnen ein Tumorrezidiv mit ungünstiger Prognose. Die Evaluation prognostischer Marker zur individuellen Risikoeinschätzung sowie neue therapeutische Optionen sind erforderlich.

1.2 Prognosefaktoren bei Ovarialkarzinomen

Die radikale Operation bildet die Therapiegrundlage des Ovarialkarzinoms. Die vollständige Entfernung aller Tumormanifestationen stellt einen der wichtigsten Prognosefaktoren dar, wobei die Größe des verbliebenen Residualtumors negativ mit dem Überleben korreliert. Weitere prognostische Faktoren sind das klinische Stadium sowie der histologische Differenzierungsgrad. Höheres Patientinnenalter ist mit einem schlechteren Überleben verbunden, was zumindest teilweise durch die höhere Inzidenz niedrig differenzierter Tumoren in höherem Lebensalter erklärt ist. Einen weiteren klinischen Parameter stellt das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie dar (2-3). Bisher konnte sich kein molekularer Biomarker zur Prognoseabschätzung oder Therapieplanung im klinischen Alltag etablieren.

1.3 Ansätze zur Untersuchung von Biomarkern in Paraffingewebe – Immunhistologie und RT-PCR

Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe liegt in pathologischen Instituten in großen Mengen vor und stellt eine wertvolle Ressource für die translationale Tumorforschung dar. Die Immunhistologie erlaubt eine visuelle Zuordnung von Proteinexpression zur exprimierenden Zellpopulation, bringt jedoch einige Limitationen mit sich. Ergebnisse dieser bestenfalls semi-quantitiven Methode unterliegen mitunter Schwankungen zwischen unterschiedlichen Auswertern und Zeitpunkten und sind somit einer gewissen Variabilität und eingeschränkter Reproduzierbarkeit unterworfen. Hingegen

liefert die Biomarkerbestimmung mittels kinetischer RT-PCR reproduzierbare, quantitative Ergebnisse. Aufgrund von Fragmentation der RNA während des Fixierungs- und Einbettungsprozesses sowie von Interaktionen zwischen RNA und Proteinen galt der Einsatz von RNA aus diesem Gewebe für molekularbiologische Studien bis in jüngere Zeit als limitiert. Trotzdem konnten einige Studien zeigen, dass Paraffingewebe für Genexpressionsstudien geeignet ist, besonders in Kombination mit der kinetischen RT-PCR (4-6). In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue, auf magnetischen Partikeln beruhende Methode der RNA-Extraktion aus Paraffingewebe verwendet.

1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand eines Kollektivs von Ovarialkarzinomen neue, therapeutisch relevante Biomarker im Ovarialkarzinom zu untersuchen. Aufgrund der Limitierungen der Immunhistologie wurde eine neue Methode der RNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe verwendet. Auch sollte bewertet werden, ob diese Methode der Evaluation von Biomarkern geeignet ist, prognostische und prädiktive Aussagen zu treffen. Hierfür wurde eine Reihe von molekularen Markern gewählt, die in Hinblick auf Prognoseabschätzung und Therapieplanung als besonders relevant eingestuft wurden.

2 Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

Die Patientinnengruppe bestand aus 140 Patientinnen, die aufgrund eines primären Ovarialkarzinoms zwischen 1991 bis 2005 an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Charité Berlin operiert wurden. Die Operationspräparate aller Patientinnen wurden am Institut für Pathologie der Charité Berlin untersucht und befundet. Die Tumorphistologie und das Tumorgrading wurden von einem erfahrenen Gynäkopathologen re-evaluiert. Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbte Tumorschnitte wurden zur histopathologischen Untersuchung verwendet, das Tumorgrading wurde mittels des Silverberg Grading-Systems vorgenommen. Alle Patientinnen wurden mit einer radikalen zytoreduktiven Operation in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt. Das Kollektiv stellt eine repräsentative Abbildung der Population von Ovarialkarzinomen dar unter Berücksichtigung von Verteilung des Tumorstadiums, Tumorgradings, histologischen Typs, Residualtumors nach Operation und des Patientinnenalters.

2.2 RNA-Extraktion aus Paraffingewebe

Für die Extraktion der RNA aus Paraffingewebe wurde eine neue, auf magnetischen Partikeln beruhende Methode angewandt. Die Methode wurde von Siemens Healthcare Diagnostics Products (Köln, Deutschland) entwickelt und zur Verfügung gestellt. Von jedem Tumorblock wurde ein 10 µm dicker Schnitt angefertigt und in ein Reaktionsröhrchen überführt. Alle verwendeten Tumorblöcke enthielten mindestens 50 % Tumorgewebe. Der Paraffinschnitt wurde dann zunächst in Xylol deparaffiniert und anschließend mit steigenden Ethanol-Konzentrationen dehydriert. Das Gewebe wurde dann 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend für 5 min bei 95 °C in Lysepuffer und SDS lysiert. Es folgte ein zweistündiger Verdau mit Proteinase K bei 56 °C. Nach Zugabe eines Bindungspuffers und der magnetischen Partikel wurde bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert, um den Nukleinsäuren eine Bindung an die magnetischen Partikel zu ermöglichen. Mittels eines magnetischen Röhrchenhalters wurden der Überstand entfernt und die Partikel anschließend mit verschiedenen Waschpuffern behandelt. Nach Zugabe des Elutionspuffers und Inkubation für 10 min bei 70 °C wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Es folgte ein DNase-Verdau mittels des TURBO DNA-free Kits (Ambion, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers. Bis zum Einsatz in der kinetischen RT-PCR wurde die RNA bei – 80 °C gelagert.

2.3 Kinetische RT-PCR

Für das Housekeeping-Gen RPL37A (ribosomal protein L37A) und für die Markergene wurden intronüberspannende Primer und Fluoreszenzsonden verwendet (Siemens Healthcare Diagnostics Products, Köln, Deutschland). Für die kinetische Bestimmung der Expression von ESR1 und VEGF-C kam ein ABI Prism 7900 Instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zum Einsatz, für die Bestimmung von MRP1, TOP-II α und IMP3 ein Light cycler Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit dem Super Script III One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die Bedingungen waren: 30 min bei 60 °C für die reverse Transkription, 2 min bei 95 °C für die Aktivierung der Taq-Polymerase gefolgt von 40 Zyklen 95 °C für 30 s und 60 °C für 60 s.

Im Folgenden ist die Erhebung der mRNA-Daten dargestellt: zunächst erfolgte eine Triplikatmessung des Housekeeping-Gens RPL37A für jede Probe und ein Mittelwert der CT-Werte wurde bestimmt. Mit Hilfe der Formel $F = 2^{(26 - CT)}$ wurde der Verdünnungsfaktor F berechnet, um den CT-Wert auf einen Wert von 26 einzustellen (F = Faktor zu Verdünnung und CT = Initialer CT-Wert der Probe). Danach erfolgte die erneute Triplikatmessung der Proben für RPL37A und die Zielgene. Folgende vorher definierte Qualitätsanforderungen mussten von allen Proben erfüllt sein: Der Mittelwert des CT des Housekeeping-Gens lag in einem Bereich zwischen 22 und 28 bei einem Zielwert von 26. Wenigstens 2 Messwerte waren für jede Probe und jedes Gen vorhanden, die einzelnen Messwerte differierten um nicht mehr als einen CT und CT-Werte > 40 wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für jede Probe wurde die Expression des Zielgens relativ zu RPL37A mit Hilfe der Formel $\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{RPL37A}}$ berechnet. Anschließend wurden im Falle von ESR1 und VEGF-C $\Delta\Delta CT$ -Werte mit Hilfe der Formel $\Delta\Delta CT = 40 - \Delta CT$ berechnet, die sich proportional zur Expression des Zielgens verhalten. Für MRP1, TOPII- α und IMP3 wurden virtuelle Kopienanzahlen mit Hilfe der Formel $2^{(40 - \Delta CT)}$ berechnet.

2.4 Immunhistologie

Die immunhistologischen Färbungen wurden auf *tissue microarrays* (TMAs) durchgeführt. Hierzu wurden repräsentative Tumorareale auf den H&E gefärbten Schnittpräparaten markiert, für jeden Tumor 4 Gewebezylinder (1,5 mm Durchmesser) mittels eines Tissue-microarrayers (Beecher Instruments, Woodland, CA, USA) ausgestanzt und in einen neuen Paraffinblock eingebettet. Die Färbungen wurden für ESR1 mit einem Ventana Discovery XT Instrument (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) bzw. nach einem manuellen Färbeprotokoll (übrige Marker) durchgeführt. Folgende Antikörper wurden

benutzt: Für ESR1 ein polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von ESR1 (Labvision, Fremont, CA, USA), für TOP-II α ein polyklonaler Antikörper (Biotrend Chemicals, Köln, Deutschland), für MRP1 ein monoklonaler Antikörper (Monosan, Uden, Niederlande), für IMP3 ein monoklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des Proteins (Nielsen et al) und für DICER ein monoklonaler Antikörper (Clonogene, Hartford, CT, USA). Die Expression der Marker wurde ohne Kenntnisnahme von Überleben und Tumorcharakteristika ausgewertet. Der Prozentsatz positiver Zellen wurde wie folgt bewertet: 0 (0 %), 1 (1-10 %), 2 (11-50 %), 3 (51-80 %), 4 (> 80 %). Für die Färbeintensität galt: 0 (negativ), 1 (schwach), 2 (moderat), 3 (stark). Die Werte für den Prozentsatz positiver Zellen und die Färbeintensität wurden für die Berechnung eines „Immunoreactivity score“ (IRS) multipliziert, resultierend in einem Wert zwischen 0 bis 12.

2.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 15 (SPSS, Chicago, IL, USA), Graph Pad Prism 4 und JMP 5 (SAS, Cary, NC, USA). Der Mann-Whitney-Test und der Kruskal-Wallis-Test wurden für die Korrelation der Daten mit klinischen und pathologischen Tumoreigenschaften verwendet. Für gruppierte Daten fand der exakte Fisher-Test Anwendung. Das Patientenüberleben in Abhängigkeit der Markerexpression wurde mit dem Cox -Regressionsmodell und der Kaplan-Meier Methode in Kombination mit dem Log-Rank-Test analysiert. Generell wurden p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant betrachtet und zweiseitig berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Vascular endothelial growth factor C mRNA-Expression als prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom

Sinn BV*, Darb-Esfahani S*, Wirtz RM, Faggad A, Weichert W, Buckendahl A, Noske A, Müller BM, Budczies J, Sehouli J, Braicu EI, Dietel M, Denkert C. Vascular endothelial growth factor C mRNA expression is a prognostic factor in epithelial ovarian cancer as detected by kinetic RT-PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Virchows Arch.* 2009;455(6):461-467 *geteilte Erstautorenschaft

VEGF-C ist ein gut beschriebener chemotaktischer Faktor und Wachstumsfaktor für lymphatische Endothelzellen. Die Inhibition von VEGF-C in Mausmodellen führt zur Suppression von Lymphknoten- und Fernmetastasen (7-9). Im Ovarialkarzinom wurde die Beziehung zwischen der VEGF-C-Expression und dem Tumorverhalten noch nicht durch eine quantitative Methode *in vivo* bestimmt. Deshalb wurde die mRNA-Expression von VEGF-C in einem Ovarialkarzinomkollektiv mittels kinetischer RT-PCR aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe untersucht. Die Expressionslevel wurden mit klinischen und pathologischen Tumoreigenschaften und Patientinnenüberleben korreliert. Eine hohe VEGF-C mRNA-Expression war mit einem schlechteren Gesamt- und progressionsfreien Überleben verbunden ($p = 0,0393$ bzw. $p = 0,0155$). In den Subgruppen der serösen Tumoren und Tumoren mit schlechter histopathologischer Differenzierung behielt die VEGF-C-Expression ihren prognostischen Wert ($p = 0,019$ bzw. $p = 0,0311$). Ein Trend konnte für Patientinnen in fortgeschrittenem klinischen Stadium beobachtet werden ($p = 0,0634$). In einer multivariaten Überlebensanalyse bestätigte sich der Einfluss auf das progressionsfreie Überleben als unabhängig gegenüber Lymphknotenstatus, Tumorgrading und Größe des Residualtumors nach Operation ($p = 0,006$, HR 0,319, KI 0,126 - 0,846). Weiterhin korrelierte eine höhere VEGF-C-Expression mit der Größe des postoperativen Residualtumors. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen VEGF-C-Expression und Tumorgrading, FIGO-Stadium oder Lymphknotenstatus gefunden werden. Die Studie zeigt, dass eine hohe VEGF-C-Expression mit einem aggressiveren Tumorverhalten verbunden ist, wobei die vorliegende Arbeit bei fehlender Korrelation mit dem Lymphknotenstatus auf andere Mechanismen als vermehrte Lymphangiogenese hinweisen könnte, die zu einem aggressiveren Phänotyp führen. mRNA aus FFPE-Gewebe ist einsetzbar für VEGF-C Genexpressionsstudien.

3.2 Östrogenrezeptor 1 mRNA ist ein unabhängiger prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom

Darb-Esfahani S*, Wirtz RM*, **Sinn BV***, Budczies J, Noske A, Weichert W, Faggad A, Scharff S, Sehouli J, Oskay-Ozcelik G, Zamagni C, De Iaco P, Martoni A, Dietel M, Denkert C. Estrogen receptor 1 mRNA is a prognostic factor in ovarian carcinoma: determination by kinetic PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Endocr. Relat. Cancer.* 2009 Dez ;16(4):1229-1239
*geteilte Erstautorenschaft

Epidemiologische Beobachtungen und Zellkulturstudien deuten auf ein östrogenabhängiges Wachstum von Ovarialkarzinomen hin (10-14). Studien mit antiöstrogenen Behandlungsstrategien führten allerdings bislang zu inkonsistenten Ergebnissen, auch wurde kein Zusammenhang zwischen ESR1-Expression und Therapieansprechen beschrieben (15-22). Dies liegt möglicherweise am Fehlen eines verlässlichen Biomarkers, der es ermöglicht, Patientinnen entsprechend biologisch relevanter Expressionsunterschiede von ESR1 zu selektieren. Deshalb wurde untersucht, ob die Analyse der ESR1-Expression durch eine quantitative Methode der immunhistochemischen Bestimmung hierbei überlegen ist. Die Expression von ESR1 wurde parallel mittels kinetischer RT-PCR aus Paraffingewebe und Immunhistologie untersucht. ESR1 mRNA war ein signifikanter positiv-prognostischer Faktor hinsichtlich des Gesamtüberlebens ($p = 0,002$, HR 0,230, KI 0,102 - 0,516). ESR1 Proteinexpression korrelierte mit der ESR1 mRNA Expression ($p = 0,0001$). Allerdings konnte der prognostische Effekt auf Proteinebene nicht gezeigt werden. In einer multivariaten Überlebensanalyse war ESR1 mRNA unabhängig von Tumorstaging, Tumorgrading, Residualtumor nach Operation, Alter und ESR1 Proteinexpression ein unabhängiger prognostischer Faktor ($p = 0,006$, HR 0,227, CI 0,078-0,656). Die Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung von ESR1 Expression mittels kinetischer RT-PCR immunhistologischen Methoden überlegen ist, um biologisch relevante Unterschiede zu erfassen und zudem in FFPE-Gewebe anwendbar ist. In Hinblick auf zukünftige klinische Studien mit Östrogen-modulierenden Pharmaka könnte die Evaluation von ESR1 mRNA mittels der beschriebenen Methode der Immunhistochemie in der Prädiktion eines Therapieansprechens überlegen sein.

3.3 Der Chemoresistenzmarker Multidrug resistance protein 1 als Marker für kürzeres Überleben beim Ovarialkarzinom

Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R, **Sinn B**, Sehouli J, Könsgen D, Lage H, Noske A, Weichert W, Buckendahl A, Budczies J, Müller BM, Elwali NE, Dietel M, Denkert C. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in invasive ovarian carcinoma: implication for prognosis. *Histopathology*. 2009;54(6):657-666

Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika ist ein häufiges Problem im Verlauf der Behandlung des Ovarialkarzinoms. MRP1 ist ein Membrantransporter, der für den zellulären Efflux einer Reihe verschiedener Chemotherapeutika verantwortlich ist (23-24). In einigen Tumoren ist eine erhöhte Expression von MRP1 sowie eine Korrelation zu schlechtem Therapieansprechen beschrieben (25). Für das Ovarialkarzinom existieren wenige Studien, wobei eine Verbindung zu Überleben und Ansprechen auf Chemotherapie bislang nicht beschrieben ist (26-30). Deshalb wurde die Expression von MRP1 Protein- und mRNA-Expression untersucht und mit klinischen und pathologischen Tumoreigenschaften korreliert.

Auf Proteinebene wurde eine positive Korrelation zum Tumorgrading ($p = 0,005$) und zum Tumorstadium ($p = 0,04$) gefunden. Die MRP1 Proteinexpression war mit einem kürzeren Überleben verbunden ($p = 0,006$ in der univariaten Analyse; $p = 0,003$, HR 6,52, KI 1,78 - 22,75 in der multivariaten Analyse einschließlich histologischen Grading, Residualtumor nach Operation, FIGO Stadium, Alter). Eine erhöhte Proteinexpression war mit einem höheren Patientinnenalter (über 60 Jahre) verbunden ($p = 0,05$). TOPII α -mRNA und MRP1-mRNA-Expression korrelierten positiv miteinander ($p < 0,001$).

Die Daten liefern eine translationale Grundlage für weitere klinische Studien zur Evaluation eines möglichen prädiktiven Werts von MRP1 für das Ansprechen auf eine Chemotherapie, vorzugsweise in einem auch beim Ovarialkarzinom angewandten Studiendesign.

3.4 Topoisomerase II-alpha mRNA Expression ist mit schlechterem Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom verbunden

Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R, **Sinn B**, Sehouli J, Könsgen D, Lage H, Weichert W, Noske A, Budczies J, Müller BM, Buckendahl A, Röske A, Eldin Elwali N, Dietel M, Denkert C. Topoisomerase IIalpha mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Mod. Pathol.* 2009;22(4):579-588

Topoisomerase II-alpha ist ein nukleäres Enzym, das durch seine Eigenschaft, Helix-Windungen der DNA lockern und lösen zu können, eine zentrale Rolle in der DNA-Replikation und -Transkription einnimmt. Es stellt ein molekulares Target für eine Reihe von Chemotherapeutika dar, wobei bezüglich des Ovarialkarzinoms die in der second-line Therapie angewandten Substanzen Etoposid und Doxorubicin als direkte TOP-II α -Inhibitoren gelten (31). TOP-II α gilt als Marker für Therapieansprechen und Patientenüberleben (32). Ziel der Studie war es, die TOP-II α Genexpression mittels einer kinetischen RT-PCR aus Paraffingewebe sowie immunhistologisch in einer Gruppe von Ovarialkarzinompatientinnen zu untersuchen. Die Expression wurde dann mit klinischen und pathologischen Tumoreigenschaften und Patientinnenüberleben korreliert. Eine erhöhte Expression von TOP-II α mRNA-Expression wurde bei Vorliegen eines höheren Tumorgradings ($p = 0,003$) und Tumorstaging ($p = 0,011$) beobachtet. In einer univariaten Überlebensanalyse zeigte sich die TOP-II α Proteinexpression als negativer prognostischer Faktor ($p = 0,045$). Die Studie zeigt, dass TOP-II- α in einigen Tumoren eine Rolle in der Tumorprogression spielt und mit aggressiverem Tumorverhalten assoziiert ist. Die weitere Evaluation von TOP-II- α im Ovarialkarzinom scheint lohnenswert und könnte zur Planung einer individualisierten und risikoadaptierten Therapie beitragen.

3.5 IMP3 als positiver prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom

Noske A, Faggad A, Wirtz R, Darb-Esfahani S, Sehouli J, **Sinn B**, Nielsen FC, Weichert W, Buckendahl A, Röske A, Müller B, Dietel M, Denkert C. IMP3 expression in human ovarian cancer is associated with improved survival. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2009;28(3):d203-210

IMP3 gehört zur Familie der Insulin-like growth factor II bindenden Proteine (IMPs), die über eine Bindung an IGF-II mRNA und andere mRNAs wichtige Zellfunktionen wie Polarität, Migration und Proliferation beeinflussen (33). Eine vermehrte Expression von IMP3 wurde in verschiedenen Tumoren beschrieben (34). Es spielt außerdem eine wichtige Rolle in der menschlichen Embryogenese und ist an Entwicklung und Ausreifung weiblicher Keimzellen beteiligt (35). Ziel der Studie war es, die Rolle von IMP3 Protein- und mRNA-Expression im Ovarialkarzinom *in vivo* zu untersuchen. Dafür wurde die Expression von IMP3 immunhistologisch und mittels kinetischer RT-PCR aus Paraffingewebe untersucht.

IMP3-Protein und mRNA-Expression waren günstige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben ($p = 0,04$ bzw. $p = 0,05$). Ebenfalls korrelierten beide Parameter mit einem höheren Patientinnenalter ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,034$). Es fand sich eine Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression ($p = 0,012$). Die Ergebnisse zeigen, dass IMP3 in einer Subgruppe von Ovarialkarzinomen exprimiert wird und als Marker für eine bessere Prognose dienen könnte, was in zukünftigen Studien belegt werden muss.

3.6 DICER ist ein prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom und korreliert mit der Expression von Östrogenrezeptor 1

Faggad A, Budczies J, Tchernitsa O, Darb-Esfahani S, Sehouli J, Müller BM, Wirtz R, Chekerov R, Weichert W, **Sinn B**, Mucha C, Elwali NE, Schäfer R, Dietel M, Denkert C. Prognostic significance of Dicer expression in ovarian cancer-link to global microRNA changes and oestrogen receptor expression. *J. Pathol.* 2010 Feb;220(3):382-391

MicroRNAs (miRNAs) sind endogene, kurze, nicht-kodierende RNAs, die regulatorischen Einfluss auf die Genexpression nehmen. Die Regulation erfolgt post-transkriptional mittels einer sequenzspezifischen Bindung im Bereich der 3'-untranslatierten Region der Ziel-mRNAs. DICER ist eine zytoplasmatische Endonuklease, die unreife pre-miRNAs zu reifen, biologisch aktiven miRNAs prozessiert (36-38). Untersuchungen konnten zeigen, dass sich menschliche Tumore, einschließlich Ovarialkarzinome, durch miRNA-Expressionsmuster von Normalgewebe unterscheiden (39-41). Die genauen Mechanismen, die dieser Alteration zu Grunde liegen, sind jedoch bislang nicht vollständig bekannt. Ziel der Studie war es, die Rolle der DICER-Expression im Hinblick auf klinische und pathologische Parameter, eine mögliche Verbindung zur Östrogenrezeptorexpression sowie den Einfluss auf das Überleben der Patientinnen zu untersuchen. Die DICER-Expression wurde auf Proteinebene in einer Gruppe von Ovarialkarzinompatientinnen untersucht. In der Gruppe der serösen Tumoren fand sich eine negative Korrelation zum Tumorigrad (p = 0,04) und zum Nodalstatus (p = 0,005). Hinsichtlich des Überlebens zeigte sich ein positiver Einfluss in der Gruppe der serösen Tumoren (p = 0,02) und der Gruppe der Patientinnen im Stadium FIGO III-IV (p = 0,032). Es konnte eine positive Korrelation zwischen DICER-Proteinexpression und ESR1 Proteinexpression (p < 0,001) und ESR1 mRNA-Expression beobachtet werden (p = 0,03). Die Untersuchung zeigt, dass die DICER-Expression prognostischen Wert im Ovarialkarzinom besitzt. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen der ESR1-Expression und der Expression von DICER festgestellt werden. Die genaue Bedeutung dieses Zusammenhangs bleibt jedoch zu untersuchen.

4 Diskussion

Die klinische Onkologie stellt hohe Anforderungen an die pathologische Diagnostik, wobei die Evaluation molekularer prognostischer und prädiktiver Marker einen zunehmend hohen Stellenwert bezüglich Prognoseabschätzung und individueller Therapieplanung einnimmt. Die Immunhistochemie als semi-quantitatives Verfahren kann diesen Erfordernissen nicht in allen Fällen gerecht werden, gerade in Grenzfällen mit weitgehenden Therapieentscheidungen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die RNA-Extraktion aus Paraffingewebe möglich und für den Einsatz in einer kinetischen RT-PCR geeignet ist. Die Erschließung von FFPE-Gewebe ist für die translationale Forschung besonders attraktiv, da es sich hierbei um das Routinematerial in der pathologischen Diagnostik handelt und so auch eine Übertragung auf die direkte klinisch-diagnostische Anwendung möglich ist, insbesondere mit der Möglichkeit der voll automatischen Aufreinigung von RNA aus Routineproben. Unsere und vorangegangene Studien konnten zeigen, dass der Einsatz dieses Materials für molekularbiologische Untersuchungen geeignet ist. Die wichtigsten Limitationen des Verfahrens bleiben die durch chemische Modifikationen bedingten Qualitäts- und Quantitätseinbußen des gewonnenen Materials. Eine Rolle spielen hier durch den Fixierungsvorgang und Einbettungsprozess hervorgerufene Phänomene wie Vernetzungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren sowie Fragmentation der RNA. Besonders die fragmentierte RNA stellt hohe Anforderungen an das Design der PCR-Primer, wobei neben den allgemeinen Anforderungen die Produktlänge 100 Basenpaare nicht überschreiten sollte, um auch die Detektion von fragmentierter RNA zu gewährleisten. Das Design von transkriptspezifischen, intron-überspannenden Primern und entsprechenden Fluoreszenzsonden gestaltet sich in diesem Kontext mitunter schwierig und als nicht in allen Fällen möglich. Eine weitere Einschränkung gegenüber der Immunhistochemie ist, dass bei der beschriebenen Methodik nicht selektiv Tumorzellen ausgewertet werden, sondern Tumorgewebe als Gesamtheit verschiedener Zellen. Insbesondere Tumor-assoziierte Entzündungsreaktionen, aber auch andere begleitende Zellpopulationen könnten die Ergebnisse verfälschen. Dieses Konzept ist im Hinblick auf experimentelle Studien zu Mechanismen der Tumorbilogie zu berücksichtigen und zu hinterfragen, bevor funktionelle Rückschlüsse gezogen werden können. Eine mögliche Lösung stellt die Mikrodissektion von mikroskopisch markierten Tumorzellen vor dem Extraktionsprozess dar sowie die Validierung gewonnener Informationen durch alternative Methoden. Weiterhin gilt zu berücksichtigen, dass sich Daten von der mRNA- nicht immer auf die Proteinebene

übertragen lassen. Im Falle von ESR1 und IMP3 wurde eine Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Daten gefunden, im Falle von MRP1 und TOPII- α dagegen nicht. Dies spiegelt die vielfachen auf posttranskriptionaler Ebene stattfindenden Regulationsprozesse wie Beeinflussung der mRNA-Stabilität und Interaktion mit miRNAs wider. Die prognostische oder prädiktive Aussage eines Tests auf Proteinebene lässt sich also nicht in allen Fällen auf die RNA-Ebene übertragen. Im Hinblick auf klinische Fragestellungen bedarf die Übertragung neuer, aber auch etablierter immunhistologischer Marker auf die neue Methodik einer systematischen Analyse zur Optimierung von Assays und Datenanalysen sowie Studien zur klinischen Relevanz der Ergebnisse. Es muss berücksichtigt werden, dass die RNA-Extraktion aus Paraffingewebe noch immer kein Standardverfahren darstellt. Andererseits bietet die neue Methodik die Möglichkeit, auch kleine Mengen eines Transkripts sowie Unterschiede seiner Expression zu identifizieren, die biologisch relevant sein könnten und der immunhistologischen Analyse entgehen. Insgesamt bietet die Methodik einen Ansatz für eine standardisierbare und quantifizierbare Methode zur Biomarkerevaluation. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber der Immunhistologie dar, die mit einer hohen Variabilität der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Untersuchern behaftet ist. Die weitere Evaluation dieser neuen Ansätze bleibt Aufgabe zukünftiger Studien. Die Arbeit zeigt einen Weg, den steigenden Anforderungen an die pathologische Evaluation von Biomarkern gerecht zu werden.

Die meisten Studien mit antihormonellen Substanzen haben beim Ovarialkarzinom zu enttäuschenden Resultaten geführt (16-20). In einer aktuellen Studie konnte eine Ansprechrate von 17 % beobachtet werden (21). In einer Metaanalyse von mehreren klinischen Studien mit insgesamt 647 Patientinnen wurde eine Gesamtansprechrate von 11 % ermittelt. Die Ergebnissen der einzelnen Studien variierten jedoch von 0 bis 56 % (22). Das deutet auf das Vorhandensein von Tumor-assoziierten Faktoren hin, die sich innerhalb der verschiedenen Studienpopulationen unterscheiden. Bemerkenswerterweise wurde bisher noch kein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie und der ESR1-Expression beschrieben (15). In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass mittels einer kinetischen RT-PCR aus Paraffingewebe eine prognostische Aussage möglich ist, nicht aber durch die Bestimmung der ESR1-Expression mittels Immunhistochemie. Die Expression von ESR1 mRNA könnte in zukünftigen klinischen Studien mit östrogen-modulierenden Pharmaka als prädiktiver Marker zur Auswahl von Studiengruppen dienen und so zu einer Erhöhung der Ansprechrate beitragen.

Literatur

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59(4):225-249
2. Cannistra SA Cancer of the Ovary. *N Engl J Med* 2004;351(24):2519-2529
3. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian Cancer: epidemiology, biology and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000;19(1):3-10
4. Abrahamsen HN, Steiniche T, Nexø E, Hamilton-Dutoit SJ, Sørensen BS. Towards quantitative mRNA analysis in paraffin-embedded tissues using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a methodological study on lymph nodes from melanoma patients. *J Mol Diagn* 2003;5(1):34-41
5. Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive--gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol* 2001;195(1):66-71
6. Chang JC, Makris A, Gutierrez MC, Hilsenbeck SG, Hackett JR, Jeong J, Liu M, Baker J, Clark-Langone K, Baehner FL, Sexton K, Mohsin S, Gray T, Alvarez L, Chamness GC, Osborne CK, Shak S. Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008;108(2):233-240
7. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276(5317):1423-1425
8. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7(2):192-198
9. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001;20(4):672-682
10. Langdon SP, Crew AJ, Ritchie AA, Muir M, Wakeling A, Smyth JF, Miller WR. Growth inhibition of oestrogen receptor-positive human ovarian carcinoma by anti-oestrogens in vitro and in a xenograft model. *Eur J Cancer* 1994;30A(5):682-686
11. Lacey JV, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, Schatzkin A, Schairer C. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA* 2002;288(3):334-341
12. Lacey JV, Brinton LA, Leitzmann MF, Mouw T, Hollenbeck A, Schatzkin A, Hartge P. Menopausal hormone therapy and ovarian cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study Cohort. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(19):1397-1405
13. Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *JAMA* 2001;285(11):1460-1465
14. Danforth KN, Tworoger SS, Hecht JL, Rosner BA, Colditz GA, Hankinson SE. A prospective study of postmenopausal hormone use and ovarian cancer risk. *Br J Cancer*. 2007;96(1):151-156
15. Hatch KD, Beecham JB, Blessing JA, Creasman WT. Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. A Gynecologic Oncology Group study of second-line therapy in 105 patients. *Cancer* 1991;68(2):269-271
16. Karagol H, Saip P, Uygun K, Caloglu M, Eralp Y, Tas F, Aydinler A, Topuz E. The efficacy of tamoxifen in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Med Oncol* 2007;24(1):39-43
17. Ahlgren JD, Ellison NM, Gottlieb RJ, Laluna F, Lokich JJ, Sinclair PR, Ueno W, Wampler GL, Yeung KY, Alt D. Hormonal palliation of chemoresistant ovarian cancer: three consecutive phase II trials of the Mid-Atlantic Oncology Program. *J Clin Oncol* 1993;11(10):1957-1968
18. Wagner U, du Bois A, Pfisterer J, Huober J, Loibl S, Lück H, Sehouli J, Gropp M, Stähle A, Schmalfeldt B, Meier W, Jackisch C. Gefitinib in combination with tamoxifen in patients with ovarian cancer refractory or resistant to platinum-taxane based therapy--a phase II trial of the AGO Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR 2.6). *Gynecol Oncol* 2007;105(1):132-137
19. Markman M, Iseminger KA, Hatch KD, Creasman WT, Barnes W, Dubeshter B. Tamoxifen in platinum-refractory ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Ancillary Report. *Gynecol Oncol* 1996;62:4-6
20. Williams C, Simeria I. Tamoxifen for relapse of ovarian cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2001, Issue 1. Art. No.: CD001034. DOI: 10.1002/14651858.CD001034
21. Smyth JF, Gourley C, Walker G, MacKean MJ, Stevenson A, Williams AR, Nafussi AA, Rye T, Rye R, Stewart M, McCurdy J, Mano M, Reed N, McMahon T, Vasey P, Gabra H, Langdon SP. Antiestrogen

- therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor positive patients. *Clin Cancer Res* 2007;13(12):3617–3622
22. Tropé C, Marth C, Kaern J 2000 Tamoxifen in the treatment of recurrent ovarian carcinoma. *Eur J Cancer* 2000;36:59–61
 23. Deeley RG, Cole SPC. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett* 2006;580(4):1103-1111
 24. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics J* 2008;9(1):105-127
 25. Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, Zaman GJ, Scheper RJ, van Wingerden KE, Burger H, Oostrum R, Boersma T, Sonneveld P. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res* 1995;1(11):1301-1310
 26. Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorken JB, van der Valk P, Beliën JA, Giaccone G, Scheffer GL, Flens MJ, Pinedo HM, Kenemans P. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(16):1230-1237
 27. Arts HJ, Katsaros D, de Vries EG, Massobrio M, Genta F, Danese S, Arisio R, Scheper RJ, Kool M, Scheffer GL, Willemse PH, van der Zee AG, Suurmeijer AJ. Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5(10):2798-2805
 28. Yakirevich E, Sabo E, Naroditsky I, Sova Y, Lavie O, Resnick MB. Multidrug resistance-related phenotype and apoptosis-related protein expression in ovarian serous carcinomas. *Gynecol Oncol* 2006;100(1):152-159
 29. Ohishi Y, Oda Y, Uchiumi T, Kobayashi H, Hirakawa T, Miyamoto S, Kinukawa N, Nakano H, Kuwano M, Tsuneyoshi M. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8(12):3767-3775
 30. Kavallaris M, Leary JA, Barrett JA, Friedlander ML. MDR1 and multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression in epithelial ovarian tumors. *Cancer Lett* 1996;102(1-2):7-16
 31. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001;70:369-413
 32. Burden DA, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1998;1400(1-3):139-154
 33. Runge S, Nielsen FC, Nielsen J, Lykke-Andersen J, Wewer UM, Christiansen J. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J Biol Chem* 2000;275(38):29562-29569
 34. Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J Biol Chem* 2005;280(18):18517-18524
 35. Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 1999;19(2):1262-1270
 36. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-297
 37. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):522-531
 38. Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293(5531):834-838
 39. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-838
 40. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2007;67(6):2456-2468
 41. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu C, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007;67(18):8699-8707

Danksagung

Ich danke zuerst Herrn Prof. Dr. med. Carsten Denkert und Frau Dr. med. Silvia Darb-Esfahani für die Überlassung des Themas und für die gute, intensive und freundliche Betreuung. Herrn Prof. Dr. med. Manfred Dietel danke ich für die Möglichkeit, das Forschungsumfeld des Instituts für Pathologie nutzen zu können. Dr. rer. nat. Alexander Kaszubiak und Ines Koch danke ich für die geduldige Einarbeitung in Theorie und Praxis verschiedener Labormethoden. Dr. rer. nat. Ralph Wirtz danke ich für die Unterstützung bei der Datenanalyse und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Hervorragende technische Unterstützung lieferten Ines Koch, Petra Wachs, Lisa Glanz und Susanne Scharff. Ich danke auch der gesamten Arbeitsgruppe für translationale Tumorforschung für ihre Unterstützung und Anregungen. Besonderer Dank gilt meiner Familie für die liebevolle Unterstützung meines Studiums.

Lebenslauf

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

Publikationsverzeichnis und Anteilserklärung

Bruno Valentin Sinn hatte folgenden Anteil an den genannten Publikationen:

1. **Sinn BV***, Darb-Esfahani S*, Wirtz RM, Faggad A, Weichert W, Buckendahl A, Noske A, Müller BM, Budczies J, Sehouli J, Braicu EI, Dietel M, Denkert C. Vascular endothelial growth factor C mRNA expression is a prognostic factor in epithelial ovarian cancer as detected by kinetic RT-PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Virchows Arch* 2009;455(6):461-467 *geteilte Erstautorenschaft

Impact Factor 2,383. Anteil: 80%. Planung und Durchführung der Messungen, Datenauswertung, Erstellung der Abbildungen, Verfassen des Manuskripts.

2. Darb-Esfahani S*, Wirtz RM*, **Sinn BV***, Budczies J, Noske A, Weichert W, Faggad A, Scharff S, Sehouli J, Oskay-Ozcelik G, Zamagni C, De Iaco P, Martoni A, Dietel M, Denkert C. Estrogen receptor 1 mRNA is a prognostic factor in ovarian carcinoma: determination by kinetic PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Endocr Relat Cancer* 2009;16(4):1229-1239. *geteilte Erstautorenschaft

Impact Factor 5,827. Anteil: 50%. Im Einzelnen: Durchführung aller Messungen und Datenanalysen. Verfassen des Teils Material und Methoden im Manuskript, Beteiligung an allen anderen Anteilen des Manuskripts, Erstellen von Abbildungen.

3. Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R, **Sinn B**, Sehouli J, Könsgen D, Lage H, Noske A, Weichert W, Buckendahl A, Budczies J, Müller BM, Elwali NE, Dietel M, Denkert C. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in invasive ovarian carcinoma: implication for prognosis. *Histopathology* 2009;54(6):657-666

Impact Factor 3,919. Anteil: 15%. Durchführung von Messungen, Anteile der Datenanalyse und Verfassung von Teilen des Manuskripts.

4. Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R, **Sinn B**, Sehouli J, Könsgen D, Lage H, Weichert W, Noske A, Budczies J, Müller BM, Buckendahl A, Röske A, Eldin Elwali N, Dietel M, Denkert C. Topoisomerase IIalpha mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis. Mod Pathol 2009;22(4):579-588

Impact Factor 4,319. Anteil: 15%. Durchführung von Messungen, Anteile der Datenanalyse und Verfassung von Teilen des Manuskripts.

5. Noske A, Faggad A, Wirtz R, Darb-Esfahani S, Sehouli J, **Sinn B**, Nielsen FC, Weichert W, Buckendahl A, Röske A, Müller B, Dietel M, Denkert C. IMP3 expression in human ovarian cancer is associated with improved survival. Int J Gynecol Pathol 2009;28(3):203-210

Impact Factor 2,056. Anteil: 20%. Durchführung der Messungen, Anteile der Datenanalyse und Verfassung von Teilen des Manuskripts.

6. Faggad A, Budczies J, Tchernitsa O, Darb-Esfahani S, Sehouli J, Müller BM, Wirtz R, Chekerov R, Weichert W, **Sinn B**, Mucha C, Elwali NE, Schäfer R, Dietel M, Denkert C. Prognostic significance of Dicer expression in ovarian cancer-link to global microRNA changes and oestrogen receptor expression. J Pathol. 2010 Feb;220(3):382-91.

Impact Factor 5,583. Anteil: 10%. Durchführung von Messungen, Anteile der Datenanalyse und Verfassung von Teilen des Manuskripts.

Weitere Beteiligungen

1. Patent

„A method to assess prognosis and to predict therapeutic success in gynecologic cancer“

24.06.2009, International publication number WO 2009/068655 A1

Anteilmäßige Beteiligung am Patent zur Anwendung der Bestimmung der Expression von Östrogenrezeptor 1 mRNA im Ovarialkarzinom

2. Veröffentlichungen

1) Darb-Esfahani S, Sinn BV, Weichert W, Budczies J, Lehmann A, Noske A, Buckendahl AC, Müller BM, Sehouli J, Könsgen D, Györfy B, Dietel M, Denkert C. Expression of classical NF- κ B pathway effectors in human ovarian carcinoma. *Histopathology* 2010;56(6):727-739

2) Sinn BV, Darb-Esfahani S, Wirtz RM, Budczies J, Sehouli J, NN Gyn., Dietel M, Denkert C. Evaluation of a hormone receptor positive ovarian carcinoma subtype with a favourable prognosis by determination of ESR1 and PR mRNA expression using kinetic RT-PCR from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Histopathology* 2011, in press.

3. Kongressbeiträge

93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 4.-7. Juni 2009:

- Vortrag: **Sinn BV**, Darb-Esfahani S, Wirtz RM, Faggad A, Noske A, Budczies J, Sehouli J, Oskay-Özcelik G, Denkert C: Östrogen-Rezeptor 1 mRNA ist ein prognostischer Marker im Ovarialkarzinom - Bestimmung mittels RNA-Extraktion aus Paraffingewebe und kinetischer RT-PCR.
- Vortrag: Darb-Esfahani S, Wirtz RM, **Sinn BV**, Budczies J, Noske A, Weichert W, Buckendahl A, Müller B, Faggad A, Sehouli J, Zamagni C, Dietel M, Denkert C: Die Expressionsbestimmung von Östrogenrezeptor 1 (ESR1) mRNA durch kinetische RT-PCR in Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebetteten Gewebe ist ein starker Prognosefaktor im Ovarialkarzinom
- Poster: Noske A, Faggad A, Wirtz RM, Darb-Esfahani S, Sehouli J, **Sinn B**, Weichert W, Dietel M, Denkert C: Prognostische Bedeutung der IMP3 mRNA- und Proteinexpression in humanen Ovarialkarzinomen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Bruno Valentin Sinn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation prognostischer und prädiktiver Marker im Ovarialkarzinom mittels kinetischer RT-PCR aus Paraffingewebe“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Bruno V. Sinn

Anlage: Drucke der ausgewählten Publikationen

1. Vascular endothelial growth factor C mRNA expression is a prognostic factor in epithelial ovarian cancer as detected by kinetic RT-PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue.
2. Estrogen receptor 1 mRNA is a prognostic factor in ovarian carcinoma: determination by kinetic PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue.
3. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in invasive ovarian carcinoma: implication for prognosis.
4. Topoisomerase IIalpha mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis.
5. IMP3 expression in human ovarian cancer is associated with improved survival.
6. Prognostic significance of Dicer expression in ovarian cancer-link to global microRNA changes and oestrogen receptor expression.