

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

DISSERTATION

**Aldehyddehydrogenase 1 A1, Thymosin- β 15A und
Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 als prognostische
Marker im Ovarialkarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Catarina Alisa Kunze

geb. Liebscher

aus Kassel

Datum der Promotion: 27.02.2015

MEINEM LIEBEN GROSSVATER HANS ZINN

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	vi
Abstract	viii
Abkürzungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
Abbildungsverzeichnis	xiii
1. Einleitung	1
1.1 Ovarialkarzinome	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Klassifikation und Histologie.....	1
1.1.3 Aktuelle Konzepte zur Einteilung und Pathogenese	2
1.1.4 Klinik, Therapie und Prognose.....	3
1.2 Krebsstammzellen und die Aldehyddehydrogenase 1 A1	4
1.3 Das Aktinzytoskelett und die Rolle von Thymosin-β15A	6
1.4 Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1	8
1.5 Herleitung der Fragestellung	11
2. Materialien und Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Chemikalien, Kulturmedien und Enzyme.....	12
2.1.2 Lösungen.....	14
2.1.3 Kits	16
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.5 Geräte	18
2.1.6 Primer.....	19
2.1.7 Antikörper	19
2.1.8 Zelllinien	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	21
2.2.1.1 RNA-Isolation aus FFPE-Gewebe.....	22
2.2.1.2 Durchführung der qRT-PCR.....	23
2.2.1.3 Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes.....	24

2.2.1.4	Einschlusskriterien	26
2.2.2	Sequenzierung der PCR-Produkte	27
2.2.3	Immunhistochemische Färbungen	27
2.2.4	Zellkultur	29
2.2.5	Proteinisolierung und Proteinkonzentrationsbestimmung	30
2.2.6	Westernblot	30
2.3	Patientenkollektiv	31
2.4	Statistische Auswertung	33
2.5	Statistischer Analyseplan	34
3.	Ergebnisse	36
3.1	Aldehyddehydrogenase 1 (A1)	36
3.1.1	ALDH1A1-Expression auf mRNA-Ebene	36
3.1.2	ALDH1-Expression auf Proteinebene	40
3.1.3	Korrelation zwischen der ALDH1(A1)-mRNA- und Proteinexpression	46
3.1.4	Kombinierte ALDH1- und EGFR-Expression	47
3.2	Thymosin-β15(A)	49
3.2.1	TMSB15A-Expression auf mRNA-Ebene	49
3.2.2	TMSB15-Expression auf Proteinebene	51
3.2.3	Korrelation zwischen der TMSB15(A)-mRNA- und Proteinexpression	55
3.3	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1	55
3.3.1	PARP1-Expression auf mRNA Ebene	55
3.3.2	PARP-Expression auf Proteinebene	58
3.3.3	PARP(1)-Expression in Primär- und Rezidivtumoren	62
3.3.4	Korrelation zwischen der PARP1-mRNA- und Proteinexpression	63
4.	Diskussion	65
4.1	Aldehyddehydrogenase 1 (A1)	65
4.1.1	ALDH1 als prognostischer Marker auf Proteinebene	65
4.1.2	ALDH1A1 als prognostischer Marker auf mRNA-Ebene	70
4.1.3	ALDH1- und EGFR-Proteinexpression in Typ II Ovarialkarzinomen	71
4.2	Thymosin-β15(A)	73
4.3	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1	76
4.4	Limitationen der Arbeit	79
4.5	Ausblick	80

Literaturverzeichnis	82
Eidesstattliche Erklärung.....	96
Anteilsklärung an erfolgten Publikationen	97
Lebenslauf.....	98
Publikationsliste	99
Danksagung	100

Abstrakt

Epitheliale Ovarialkarzinome stellen eine häufige gynäkologische Tumorerkrankung mit schlechter Prognose dar. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Marker Aldehyddehydrogenase 1 A1 (ALDH1A1), Thymosin- β 15A (TMSB15A) und Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP1), welche sich bereits im Mammakarzinom als Biomarker mit prädiktiver und prognostischer Relevanz erwiesen hatten, hinsichtlich ihres prognostischen Wertes in Ovarialkarzinomen untersucht. Der Schwerpunkt lag in der Untersuchung der Marker in Typ II Ovarialkarzinomen. Untersucht wurden insbesondere Korrelationen mit Überlebensdaten, wichtigen klinisch-pathologischen Faktoren sowie eine Änderung der Markereexpression im Krankheitsverlauf.

Hierfür wurden Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von insgesamt 209 Patientinnen mit primären epithelialen Ovarialkarzinomen sowie 38 korrespondierende Rezidivtumoren untersucht. Auf mRNA-Ebene wurden die Marker mittels einer quantitativen real-time-PCR untersucht. Auf Proteinebene wurden immunhistochemische Färbungen an Tissue Microarrays durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinexpression des potentiellen Krebsstammzellmarkers ALDH1 einen signifikant ungünstigen Prognosefaktor in Typ II Ovarialkarzinomen darstellt. Darüber hinaus zeigten Tumoren die das ALDH1-Protein und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) exprimierten die statistisch ungünstigsten Verläufe. Das aktinbindende Protein TMSB15, welches die zytoskelettgesteuerte Lokomotion und somit möglicherweise auch die Metastasierungsfähigkeit der Zelle beeinflussen kann, war lediglich univariat ein signifikant günstiger Prognosemarker. Auf mRNA-Ebene konnte kein Einfluss der TMSB15A-Expression auf das Überleben der Patientinnen beobachtet werden. Die PARP1 ist als wichtiger Mediator des Basenexzisionsweg in die DNA-Reparatur involviert. Es konnte weder auf mRNA- noch auf Proteinebene ein Einfluss von PARP1 auf die Prognose festgestellt werden. Gemessene PARP1-mRNA- und Proteinwerte waren jedoch signifikant in Rezidivtumoren gegenüber den korrespondierenden Primärtumoren erhöht.

Eine Assoziation von ALDH1 und EGFR wird in der Literatur bereits in BRCA1-defizienten Brustepithelien und tripel negativen Mammakarzinomen beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass es sich bei ALDH1- und

EGFR-exprimierenden Tumoren um eine besonders aggressive Subgruppe von Typ II Ovarialkarzinomen handelt für die alternative Therapien angezeigt sein könnten. Eine weitere Charakterisierung dieser Subgruppe zusammen mit dem BRCA1-Mutationsstatus wäre daher ein interessanter Aspekt für zukünftige Studien. Höhere PARP1-Level in Rezidivtumoren der untersuchten Patientenproben könnten durch eine erhöhte chromosomale Instabilität und somit erhöhte Aktivität des Basenexzisionsweges in diesen Tumoren erklärt werden. Die Inhibierung von PARP in Zellen, in denen die homologe Rekombination beispielsweise durch eine BRCA-Mutation gestört ist, kann zur selektiven Apoptose führen, weswegen die Wirkung von PARP-Inhibitoren derzeit in klinischen Studien untersucht wird. Dennoch ist unklar, welche Patientengruppen tatsächlich von dieser Therapie profitieren und die PARP1-Expression sollte als potentieller prädiktiver Faktor weiter untersucht werden.

Abstract

Epithelial ovarian carcinoma constitutes a frequent gynecologic malignancy with a poor prognosis. As aldehyde dehydrogenase 1 A1 (ALDH1A1), thymosin- β 15A (TMSB15A) and poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) have already proved to be prognostic and predictive biomarkers in breast cancer, the aim of this study was to evaluate these biomarkers in ovarian cancer with emphasis on type II ovarian carcinoma. In this context correlations with survival and clinicopathologic parameters were regarded as well as changes in marker expression during the course of disease.

This study included 209 formalin-fixed and paraffin-embedded samples of patients with primary epithelial ovarian carcinoma and additional 38 specimens of corresponding relapse tumors. mRNA levels were quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction. To determine the protein expression immunohistochemical staining was performed on tissue microarrays.

In this study it was demonstrated that the potential cancer stem cell marker ALDH1 was a significant marker of poor prognosis in type II ovarian carcinoma. Furthermore ALDH1- and epidermal growth factor receptor (EGFR)-protein expressing tumors showed most unfavorable outcome compared to the other expression groups. The actin binding protein TMSB15 which is assumed to be involved in cytoskeleton mediated locomotion and metastasis was a significant favorable prognostic marker merely in univariate analysis. There was no association between TMSB15A mRNA expression and survival. As an important mediator of base excision repair pathway PARP1 is involved in DNA repair. Neither PARP1-mRNA nor cytoplasmatic or nuclear PARP-protein expression were associated with prognosis. However, PARP1 mRNA and nuclear protein expression were upregulated in relapse tumors compared to the corresponding primary tumors.

A correlation of ALDH1 and EGFR expression in BRCA1-deficient breast epithelium and triple negative breast cancer has already been described in previous observations. The results of this study indicate that ALDH1 and EGFR expressing tumors represent a highly aggressive subgroup of type II ovarian carcinoma for which alternative treatment options might be indicated. Further characterization of this subgroup in combination with the BRCA mutation status represents an interesting subject for future studies. Higher PARP1 levels in relapse tumors might be explained by a higher chromosomal instability

in these tumors. Inhibition of PARP in cells with defective homologous recombination due to BRCA mutation, for example, can lead to selective cell death, which is why the effect of PARP inhibitors is investigated in clinical studies to date. However it is still unclear which patients actually benefit from PARP inhibitor therapy so that the PARP1-expression should be further investigated as a predictive factor.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALDH1(A1)	Aldehyddehydrogenase 1 (A1)
BRCA	Brustkrebsgen (<i>breast cancer gene</i>)
CCC	klarzelliges Karzinom (<i>clear cell carcinoma</i>)
C _T	Schwellenwert-Zyklus (<i>Cycle of Threshold</i>)
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EC	endometrioides Karzinom (<i>endometrioid carcinoma</i>)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
FIGO	Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde (<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>)
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGSC	high grade seröses Karzinom (<i>high grade serous carcinoma</i>)
IRS	Immunreaktiver Score
LGSC	low grade seröses Karzinom (<i>low grade serous carcinoma</i>)
MC	muzinöses Karzinom (<i>mucinous carcinoma</i>)
NAD(P) ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>quantitative real-time polymerase chainreaction</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
TMA	Tissue Microarray

Abkürzungsverzeichnis

TMSB15(A)	Thymosin- β 15(A)
TNBC	tripel negatives Mammakarzinom (<i>triple negative breast cancer</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer für die qRT-PCR	19
Tabelle 2: Zusammensetzung der Primer-Sonden-Mixe	23
Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die qRT-PCR	24
Tabelle 4: Verteilung der klinisch-pathologischen Faktoren im Gesamtkollektiv	32
Tabelle 5: Multivariate Analyse des prognostischen Einflusses von ALDH1 auf das Gesamtüberleben der Patientinnen	46
Tabelle 6: Multivariate Analyse zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der kombinierten ALDH1- und EGFR-Expression.....	49
Tabelle 7: PARP1 mRNA-Expression im Gesamtkollektiv sowie in Typ I beziehungsweise Typ II Ovarialkarzinomen.....	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aktinkreislaufs und der Rolle der β -Thymosine.....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der selektiven Wirkungsweise von PARP-Inhibitoren.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der TaqMan-PCR.....	22
Abbildung 4: Berechnung des ΔC_T -Wertes.....	26
Abbildung 5: Statistischer Analyseplan zur einheitlichen Analyse der Ergebnisse von ALDH1(A1), TMSB15(A) und PARP1	35
Abbildung 6: Verteilung der gemessenen ALDH1A1-mRNA-Werte in Typ I beziehungsweise Typ II Ovarialkarzinomen.....	37
Abbildung 7: Boxplot-Diagramm zur $\Delta\Delta C_T$ -Verteilung von ALDH1A1 in den einzelnen histomorphologischen Subtypen.....	38
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebensanalysen anhand des optimalen Cutoffs für die ALDH1A1-mRNA-Expression in Typ II Ovarialkarzinomen.....	39
Abbildung 9: Westernblots für den ALDH1-Antikörper.....	41
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von ALDH1 im Ovarialkarzinom	42
Abbildung 11: Verteilung der IRS-Werte für ALDH1 im Gesamtkollektiv	43
Abbildung 12: ALDH1-Proteinexpression in histomorphologischen Subtypen von Ovarialkarzinomen.....	44
Abbildung 13: Gesamt- und rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der ALDH1 Proteinexpression in Typ II Ovarialkarzinomen.....	45
Abbildung 14: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der kombinierten ALDH1- und EGFR-Proteinexpression.....	48
Abbildung 15: Kaplan-Meier Überlebensanalysen anhand des optimalen Cutoffs für die TMSB15A-mRNA-Expression.....	51
Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von TMSB15 im Ovarialkarzinom.....	52
Abbildung 17: Verteilung der IRS-Werte für TMSB15 im Gesamtkollektiv	53

Abbildung 18: Kaplan-Meier Überlebensanalysen in Abhängigkeit von der TMSB15-Proteinexpression.....	54
Abbildung 19: Boxplot-Diagramm zur $\Delta\Delta C_T$ -Verteilung von PARP1 in den einzelnen histomorphologischen Subtypen.....	56
Abbildung 20: Kaplan-Meier Überlebensanalysen in Abhängigkeit von der PARP1-mRNA-Expression anhand des optimalen Cutoffs.....	57
Abbildung 21: Westernblots für den PARP-Antikörper.....	58
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von PARP im Ovarialkarzinom	59
Abbildung 23: Verteilung der IRS-Werte für die nukleäre und zytoplasmatische PARP-Expression im Gesamtkollektiv	60
Abbildung 24: Kaplan-Meier Überlebensanalysen in Abhängigkeit von der nukleären beziehungsweise zytoplasmatischen PARP-Proteinexpression	61
Abbildung 25: PARP1-Expression in Primär- und Rezidivtumor bei Patientinnen mit Typ II Ovarialkarzinomen.....	63
Abbildung 26: Korrelation der PARP1-mRNA- mit der PARP-Proteinexpression.....	64

1. Einleitung

1.1 Ovarialkarzinome

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Im Jahr 2008 erkrankten in Deutschland 7790 Frauen an Eierstockkrebs. Somit fielen 3,5% der malignen Neuerkrankungen der Frau auf die Ovarien. Zwar geht die Neuerkrankungsrate seit den 1990er Jahren zurück, dennoch ist die Überlebensrate weiterhin schlecht. 5529 Frauen starben 2008 in Deutschland an den Folgen der Erkrankung. Mit 5,6% nehmen Ovarialkarzinome somit nach Malignomen von Brust, Darm, Lunge und Bauchspeicheldrüse den fünfthäufigsten Platz krebsbezogener Sterbefälle bei Frauen in Deutschland ein [1]. In der westlichen Welt sind Ovarialkarzinome mittlerweile neben Mammakarzinomen die zweithäufigsten tödlich verlaufenden gynäkologischen Tumoren [2].

Das mittlere Erkrankungsalter für ein Ovarialkarzinom liegt bei 69 Jahren [1]. Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko tragen Frauen mit einer hohen Anzahl von Ovulationen beispielsweise durch eine frühe Menarche, späte Menopause oder Nulliparae [2]. Das Risiko wird hingegen durch die Einnahme von Ovulationshemmern gesenkt [3]. Etwa 10% der Ovarialkarzinome sind hereditär begründet. Am häufigsten finden sich in diesen Fällen Keimbahnmutationen der *breast cancer genes* (BRCA) 1 oder 2. Das kumulative Lebenszeitrisiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken beträgt für Trägerinnen einer BRCA1-Mutation 40-50%, während es bei Patientinnen mit BRCA2-Mutation 20-30% beträgt [4].

1.1.2 Klassifikation und Histologie

Gemäß internationaler Empfehlungen der World Health Organization (WHO) von 2014 werden ovarielle Neoplasien histologisch in drei Hauptgruppen eingeteilt, welche sich aus den drei histogenetisch unterschiedlichen Gewebekomponenten des Ovars herleiten. Die größte Gruppe bilden mit einem Anteil von 60-70% epitheliale Ovarialtumoren. Diese können entsprechend ihres histomorphologischen Erscheinungsbildes in seröse, muzinöse, endometrioid, klarzellige, undifferenzierte und transitionalzellige (Brennertumore) unterteilt werden. Je nach Dignität werden epitheliale ovarielle Neoplasien in benigne Ovarialtumoren, Tumoren mit unsicherer Dignität (Borderlinetumoren) oder maligne Ovarialkarzinome eingeteilt [2, 5].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Ovarialkarzinomen. Der Differenzierungsgrad dieser Tumorentität kann nach Silverberg in drei Graden angegeben werden. Diese Graduierung orientiert sich am Wachstumsmuster, der Mitoseaktivität und den Merkmalen des Zellkerns [6].

Das Stadium der Erkrankung wird gemäß der Richtlinien des TNM-Systems der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) und der FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) eingeteilt.

1.1.3 Aktuelle Konzepte zur Einteilung und Pathogenese

In der neueren Forschung wird ein dualistisches Modell zur Entstehung von Ovarialkarzinomen angenommen. Auf der Basis morphologischer und molekulargenetischer Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass es sich bei den histologischen Subtypen um verschiedene Tumorentitäten handelt, die sich hinsichtlich Pathogenese, Molekularbiologie, Therapieansprechen und Prognose unterscheiden.

Zur sogenannten Typ I-Gruppe werden niedrigmaligne Tumoren wie low grade seröse (LGSC), low grade endometrioid, muzinöse, klarzellige Karzinome und maligne Brenntumoren gezählt [7, 8]. Sie können sich in einem stufenweisen Verlauf aus serösen Borderlinetumoren (LGSC), Zystadenomen (muzinöse, endometrioid und klarzellige Ovarialkarzinome) oder aus atypischen Endometriosen (low grade endometrioid und klarzellige Ovarialkarzinome) entwickeln. Oft können bei LGSC BRAF oder KRAS Mutationen nachgewiesen werden [9, 10].

Typ II Ovarialkarzinome hingegen sind aggressive, schnell wachsende Malignome zu denen high grade seröse Ovarialkarzinome (HGSC), high grade endometrioid Ovarialkarzinome und Karzinosarkome des Ovars gezählt werden [7, 11]. Oft finden sich bei HGSC BRCA1- und p53-Mutationen [10, 12]. Die Frage nach dem Ursprungsgewebe von ovariellen Typ II Karzinomen ist nicht vollständig geklärt, da im Ovar eindeutige epitheliale Strukturen fehlen. Traditionellerweise wurde davon ausgegangen, dass epitheliale Ovarialkarzinome de novo aus dem Müller'schen-Oberflächenepithel (Mesothelium) oder aus Inklusionszysten des Ovars entstehen und sich durch nachfolgende Genmutationen die verschiedenen histomorphologischen Subtypen entwickeln [13, 14]. Neuere Konzepte gehen jedoch davon aus, dass Typ II Ovarialkarzinome tatsächlich im Tubenepithel entstehen. In Genexpressionsanalysen

konnte gezeigt werden, dass seröse Ovarialkarzinome dem Tubenepithel wesentlich ähnlicher sind als dem ovariellen Oberflächenepithel [15]. Kurman und Mitarbeiter stellten 2010 die Theorie auf, dass Epithelzellen des Fimbrientrichters aufgrund der räumlichen Nähe während der Ovulation in Form von Inklusionszysten in das Ovar gelangen könnten, woraus sich seröse Karzinome des Ovars bilden [16]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich seröse intraepitheliale Karzinomen der Tube (serous tubal intraepithelial carcinoma, STIC) auf der Oberfläche des Ovars implantieren und so seröse Karzinome des Ovars entstehen können. Für die genannten Theorien spricht, dass in prophylaktischen Adnektomien bei Frauen mit BRCA-Mutationen gehäuft STICs gefunden werden konnten. Diese Zellen waren zumeist im Fimbrientrichter lokalisiert und wiesen p53-Mutationen auf [16].

1.1.4 Klinik, Therapie und Prognose

Vor allem in frühen Erkrankungsstadien sind Ovarialkarzinome symptomarm und werden allenfalls bei gynäkologischen Routineuntersuchungen bemerkt. Je nach Größe und Ausbreitung des Tumors kommt es erst in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zu unspezifischen Symptomen wie diffusen Abdominalschmerzen, Meteorismus, Gewichtsverlust oder Schwellung des Abdomens [17]. Diese unspezifischen oder fehlenden Frühsymptome sind dafür verantwortlich, dass 70% der Fälle erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO IIB-IV) diagnostiziert werden [17].

Die Behandlung des Ovarialkarzinoms besteht in der Regel aus einer radikalen Tumorresektion in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie. Lediglich bei einem unilateralen Tumor im Stadium IA (G1 und gegebenenfalls G2) ist eine fertilitätserhaltende Operation möglich, auf eine adjuvante Chemotherapie kann in diesem Stadium gegebenenfalls verzichtet werden. Die Standardchemotherapie erfolgt mit Taxanen und platinhaltigen Substanzen. In fortgeschrittenen Tumorstadien kann eine zusätzliche Behandlung mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab erwogen werden [18].

Unabhängige Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom sind das Tumorstadium gemäß FIGO, das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin sowie der postoperativ verbleibende Tumorrest [17]. Insbesondere beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO IIB-IV) ist die Prognose im Wesentlichen vom Ausmaß der Tumorentfernung bei

der ersten Operation abhängig [19]. Fortschritte in den Operationsmethoden und der Chemotherapiebehandlung haben zu einer leichten Verbesserung der Überlebensraten bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen geführt. Dennoch ist die Prognose bei 5-Jahres-Überlebensraten von 40% weiterhin schlecht [1, 17], weswegen die Entwicklung neuer, alternativer Therapien dringend erforderlich ist.

Hinsichtlich Pathogenese und molekularer Charakterisierung konnten in den letzten Jahren zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen werden [7, 10]. Hierdurch konnten Subgruppen von Ovarialkarzinomen identifiziert werden, was bisher jedoch keine Konsequenzen in der Therapie mit sich brachte. Auch konnten potentielle therapeutische Targets ermittelt werden, von denen sich einige bereits in der klinischen Testung befinden. In klinischen Phase II- und III-Studien konnte zum Teil ein längeres krankheitsfreies Überleben der Patientinnen beobachtet werden, jedoch führten diese zielgerichteten Therapieansätze kaum zu einer relevanten Verbesserung der Gesamtprognose [20, 21]. Aus diesem Grund sind translationale Untersuchungen zur Identifizierung geeigneter Patientensubgruppen, die von zielgerichteten Therapien profitieren könnten ebenso nötig wie die Detektierung potentieller neuer, therapeutisch relevanter Targets.

Sowohl in ihrem klinischen Erscheinungsbild als auch morphologisch weisen HGSC und tripel negative Mammakarzinome (TNBC) Gemeinsamkeiten auf. Darüber hinaus konnten Genexpressionsanalysen zeigen, dass Mammakarzinome vom basalen Phänotyp, die überwiegend den TNBC entsprechen, und HGSC ähnliche molekulare Eigenschaften zeigen. Bei beiden Karzinomentitäten konnten unter anderem eine höhere genomische Instabilität, BRCA1-Inaktivierung oder -Mutationen sowie eine hohe Frequenz von TP53-Mutationen beobachtet werden [22, 23].

1.2 Krebsstammzellen und die Aldehyddehydrogenase 1 A1

Neuere Modelle zur Pathogenese und Progression von Neoplasien gehen davon aus, dass sich Tumoren aus einer kleinen Population sogenannter Krebsstammzellen erneuern [24]. Das Krebsstammzellmodell wurde zunächst für Leukämien vorgeschlagen [25, 26], jedoch weisen verschiedene Studien darauf hin, dass dieses Konzept auch auf eine Vielzahl solider Tumoren anwendbar ist [27-30]. Von Krebsstammzellen wird angenommen, dass diese für das Wachstum von Tumoren

verantwortlich sind, da sie in der Lage sind sich selbst zu erneuern und in verschiedene Richtungen differenzierte Tumorzellen hervorzubringen [24]. Darüber hinaus zeigen Krebsstammzellen Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika [31]. Insbesondere von Ovarialkarzinomen im fortgeschrittenen Stadium ist bekannt, dass diese zwar initial gut auf eine chemotherapeutische Behandlung ansprechen, es im Verlauf dennoch regelmäßig zu Rezidiven kommt [32]. Sollten sich diese Rezidive aus verbliebenen Krebsstammzellen regenerieren, könnte dies erklären warum im Laufe der Erkrankung häufig Chemoresistenzen, möglicherweise verursacht durch eine Anreicherung von Krebsstammzellen, zu beobachten sind.

Ein vielversprechender Marker der mit der Anwesenheit von Krebsstammzellen in Verbindung gebracht wird, ist die Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH1). ALDH1 gehört zur Familie der Aldehyddehydrogenasen, einer Gruppe von Enzymen, die in Abhängigkeit von NAD(P)^+ Aldehyde zu ihren entsprechenden Karbonsäuren oxidieren können. Bisher sind 17 verschiedene Isoformen dieser Enzymfamilie bekannt [33, 34]. ALDH1 ist eine zytosolische Aldehyddehydrogenase. Bevorzugte Substrate von ALDH1 sind all-trans Retinal und 9-cis Retinal, welche irreversibel zu ihren entsprechenden Retinsäuren oxidiert werden [34, 35]. Retinsäuren spielen, insbesondere in Ovarialkarzinomen, über genregulatorische Prozesse eine Rolle in der Differenzierung von Zellen, Hemmung der Zellproliferation und chemotherapieinduzierter Apoptose [36-38]. Das ALDH1A1-Gen ist auf dem Chromosom 9q21 lokalisiert [34].

Die enzymatische Aktivität der Aldehyddehydrogenase wurde erstmals 1999 genutzt, um hämatopoetische Stammzellen aus Zelllinien und Nabelschnurblut zu isolieren [39]. Mittlerweile findet das ALDEFLOUR-Assay Anwendung bei der Isolierung ALDH-positiver Zellen aus verschiedenen Geweben [40-43].

Die physiologische Expression von ALDH1 ist am höchsten in Organen des Gastrointestinaltraktes, endokrinen Organen und Organen des Reproduktionssystems. Ebenfalls wird beschrieben, dass die ALDH1-Expression von gesunden Ursprungsgewebe mit korrespondierenden epithelialen Tumoren dieser Gewebe korrelieren [43]. In unterschiedlichen Tumorentitäten wie Bronchialkarzinomen [42, 44, 45], Kolonkarzinomen [41], Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich [46], Pankreaskarzinomen [47] und Mammakarzinomen [40] wird ALDH1 mit einer ungünstigen Prognose für die Patienten und der möglichen Anwesenheit von

Krebsstammzellen in Verbindung gebracht. Eine beobachtete Koexpression mit etablierten Stammzellenmarkern wie CD44 und CD133 gibt ebenfalls Hinweise auf die Assoziation von ALDH1 mit Krebsstammzellen [44, 48]. Die Rolle von ALDH1 im Ovarialkarzinom ist bisher nicht vollständig geklärt und die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen weichen zum Teil stark voneinander ab. So wird in einigen Studien [43, 49, 50] ebenfalls eine schlechtere Prognose und eine Verbindung von ALDH1 zu Krebsstammzellen beschrieben, während in einer anderen Studie ALDH1 mit einer günstigeren Prognose bei Patientinnen verknüpft ist [51].

Interessanterweise wurde in Vorläuferzellen von BRCA1-defizienten Mammakarzinomen und in TNBC eine Verbindung zwischen ALDH1 und dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) beobachtet [52-54]. Da in einem früheren Projekt unserer Arbeitsgruppe bereits die EGFR-Expression an Ovarialkarzinomen bestimmt und als negativer Prognosefaktor identifiziert wurde [55] sollte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine mögliche Assoziation zwischen ALDH1 und EGFR untersucht werden.

1.3 Das Aktinzytoskelett und die Rolle von Thymosin- β 15A

Einen bedeutsamen Schritt in der Tumorprogression stellt die Fähigkeit zur Metastasierung dar, was unter anderem durch die aktive Bewegung (Lokomotion) von Tumorzellen ermöglicht wird [56]. Dieser Prozess wird im Wesentlichen über das Aktinzytoskelett gesteuert [57], wobei hier die unterschiedlichen Polymerisationskinetiken an den beiden Polen des Aktinfilaments und die Konzentration des freien Aktins in der Zelle zu einem dynamischen Auf- und Abbau beitragen [58].

In ruhenden Zellen ist etwa die Hälfte des intrazellulären Aktins zu Filamenten verbunden, während unter Laborbedingungen ein wesentlich höherer Anteil des Aktins in polymerisierter Form vorliegt. Dies wird dadurch bewirkt, dass monomeres Aktin durch die Bindung an aktinbindende Proteine vorübergehend aus dem dynamischen Kreislauf entfernt wird [59, 60]. Müssen in einer aktivierten Zelle schnell neue Aktinfilamente aufgebaut werden, kann dies durch die schnelle Abdissoziation des gebundenen Aktins von den aktinbindenden Proteinen bewerkstelligt werden. Aktinbindende Proteine können somit einen großen Vorrat an schnell verfügbarem Aktin bereitstellen [61, 62].

Thymosin- β 15 (TMSB15) gehört zur Familie der β -Thymosine, einer Gruppe hoch konservierter 5 kDa großer Peptide, die zu den aktinbindenden Proteinen gehören und aus 40 bis 44 Aminosäureresten aufgebaut sind. Bisher wurden 15 verschiedene β -Thymosine beschrieben, von denen beim Menschen nur die Thymosine - β 4, - β 10 und - β 15 nachgewiesen werden konnten [63]. Abbildung 1 zeigt schematisch die Rolle von β -Thymosinen im Aktinkreislauf.

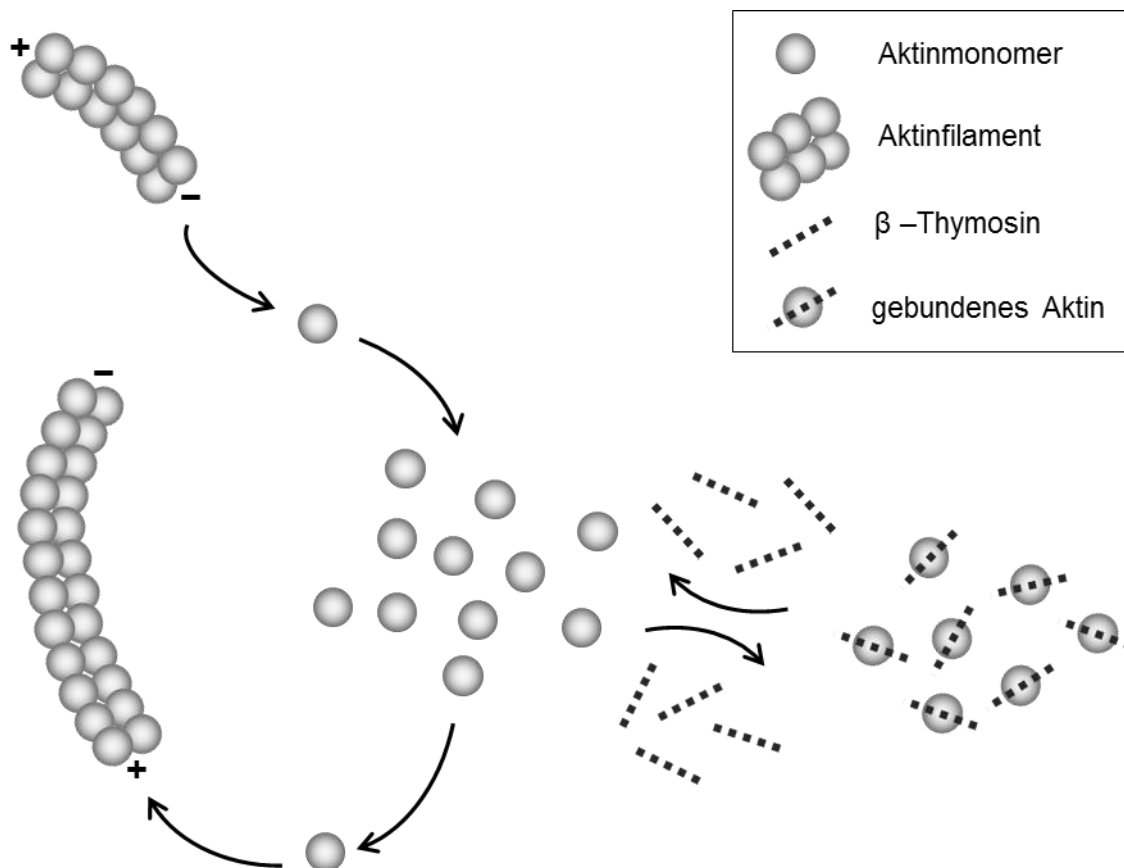


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aktinkreislaufs und der Rolle der β -Thymosine

Am Plusende erfolgt die Verlängerung des filamentösen Aktins (F-Aktins) unter Anbau von Aktinmonomeren (G-Aktin). Der G-Aktin Pool besteht aus freien Aktinmonomeren, sowie thymosin-gebundenem Aktin. Modifiziert nach [59].

Thymosin - β 4 ist das bisher am umfassendsten untersuchte Thymosin. Neben seiner Rolle als aktinbindendes Protein wird es mit Wundheilung und Angiogenese in Zusammenhang gebracht [59, 63]. In Rattenorganproben konnten die Thymosine - β 4

und - β 10 physiologischerweise in Herz, Gehirn, Lunge, Leber (nur - β 4), Skelettmuskel, Milz, Nieren und Hoden gefunden werden [64].

Thymosin- β 15 ist das bisher am wenigsten erforschte Thymosin [65]. Zwei auf dem X-Chromosom liegende Gene mit einer 87%igen Übereinstimmung in den Nukleotidsequenzen kodieren für das Thymosin- β 15 Protein. Beide Gene besitzen drei Exons. Die kodierenden Nukleotidsequenzen (135 bp) von TMSB15A (Xq22.1 Rückwärtsstrang) und TMSB15B (Xq22.2 Vorwärtsstrang) stimmen zu 98% überein. Bei den zwei sich unterscheidenden Nukleotidbasenpaaren handelt es sich um stille Nukleotidveränderungen, sodass das transkribierte Protein (TMSB15) beider Gene identisch ist [65]. Eine Hochregulierung von Thymosin- β 15 wird in Prostata- [64, 66] Bronchial- [64, 67] und Mammakarzinomen [64, 68] beschrieben. Darüber hinaus konnte TMSB15A bereits in unserer Arbeitsgruppe als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie im tripel negativen Mammakarzinom validiert werden [69]. Die Rolle von Thymosin- β 15 im Ovarialkarzinom ist bisher noch unklar, weswegen in dieser Arbeit vor allem der prognostische Wert, der bei Ovarialkarzinomen anhand der Überlebenszeit gemessen wird, untersucht werden sollte.

1.4 Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1

Unter physiologischen Bedingungen kommt es regelmäßig zur Schädigung der DNA. Dem zugrunde liegen sowohl spontane DNA-Veränderungen als auch Mutationen bedingt durch Sauerstoffradikale, Chemikalien, ultraviolette oder ionisierende Strahlung. Damit diese Mutationen nicht an Tochterzellen weitergeben werden, gibt es eine Reihe von DNA-Reparaturmechanismen. Während Einzelstrangbrüche oft effizient mittels der Basenexzisionsreparatur oder der Nukleotidexzisionsreparatur behoben werden, können Doppelstrangbrüche entweder durch die nichthomologe End-zu-End-Verknüpfung (*nonhomologous end-joining*) oder mit der homologen Rekombination beseitigt werden [70].

Ein wichtiger Mediator des Basenexzisionsweges ist die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP1) [71]. Es handelt sich hierbei um ein nukleär lokalisiertes Enzym mit einer molekularen Masse von 113 kDa. Erstmals beschrieben wurden DNA-abhängige polyribosylierende Enzyme 1963 durch Chambon und Mitarbeiter [72].

Mittlerweile sind neben der PARP1 noch 17 weitere Mitglieder der PARP-Familie bekannt [73]. PARP sind in der Lage, posttranslational Proteine zu modifizieren. Dazu werden unter NAD^+ -Verbrauch ADP-Ribosereste sowohl zu verzweigten als auch zu unverzweigten Polymeren verbunden [74] und auf Glutamat- oder Aspartatreste verschiedener Proteine übertragen [75]. Zu den Zielproteinen der PARP gehören sowohl nukleäre Proteine, wie beispielsweise Histone, Topoisomerasen oder DNA-Polymerasen (Heteromodifikation), als auch PARP selbst (Automodifikation) [75].

PARP1 ist die bisher am eingehendsten untersuchte PARP. Die basale enzymatische Aktivität der PARP1 ist niedrig, jedoch kommt es in Anwesenheit von DNA-Schäden zu einer Aktivierung der PARP1 [75, 76]. Durch die Polyribosylierung chromatinassoziierter Proteine, wie beispielsweise des Histons H1 kommt es zu einer Dekondensation des Chromatins, sodass DNA-Reparaturenzyme an der Stelle des DNA-Strangbruchs ansetzen können [74]. Darüber hinaus kommt es zu einer Akkumulation von Enzymen des Basenexzisionsreparaturweges, wie beispielsweise XRCC1 [77].

PARP-Inhibitoren stellen einen vielversprechenden ergänzenden Behandlungsansatz in BRCA-mutierten Neoplasien dar. BRCA1- oder 2-Mutationen werden in etwa 15-20% der Ovarialkarzinome gefunden [23, 78]. Diese Gene sind insbesondere über die homologe Rekombination in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert [79]. BRCA-defiziente Ovarialkarzinome sind häufig mit seröser Histologie, schlechter Differenzierung und fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert [80, 81]. Dennoch ist die Prognose für Patientinnen mit BRCA1- oder 2- mutierten Ovarialkarzinomen meist günstiger als die der Patientinnen ohne BRCA-Mutation was vermutlich an der hohen genomischen Instabilität und somit einer erhöhten Sensibilität für doppelstrangbruchinduzierende Therapeutika liegt [23, 82].

Das Prinzip von PARP-Inhibitoren ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Inhibiert man in Zellen, bei denen ein Einzelstrangbruch vorliegt, ein Schlüsselenzym des Basenexzisionsreparaturweges wie die PARP1, kommt es während der Zellteilung zu einem Doppelstrangbruch. Dieser Doppelstrangbruch kann nur durch homologe Rekombination beseitigt werden. Da dieser Reparaturmechanismus jedoch in Tumorzellen, die homozygot für eine BRCA1 oder BRCA2-Mutation sind, defekt ist, kommt es zum Tod der Zelle [83].

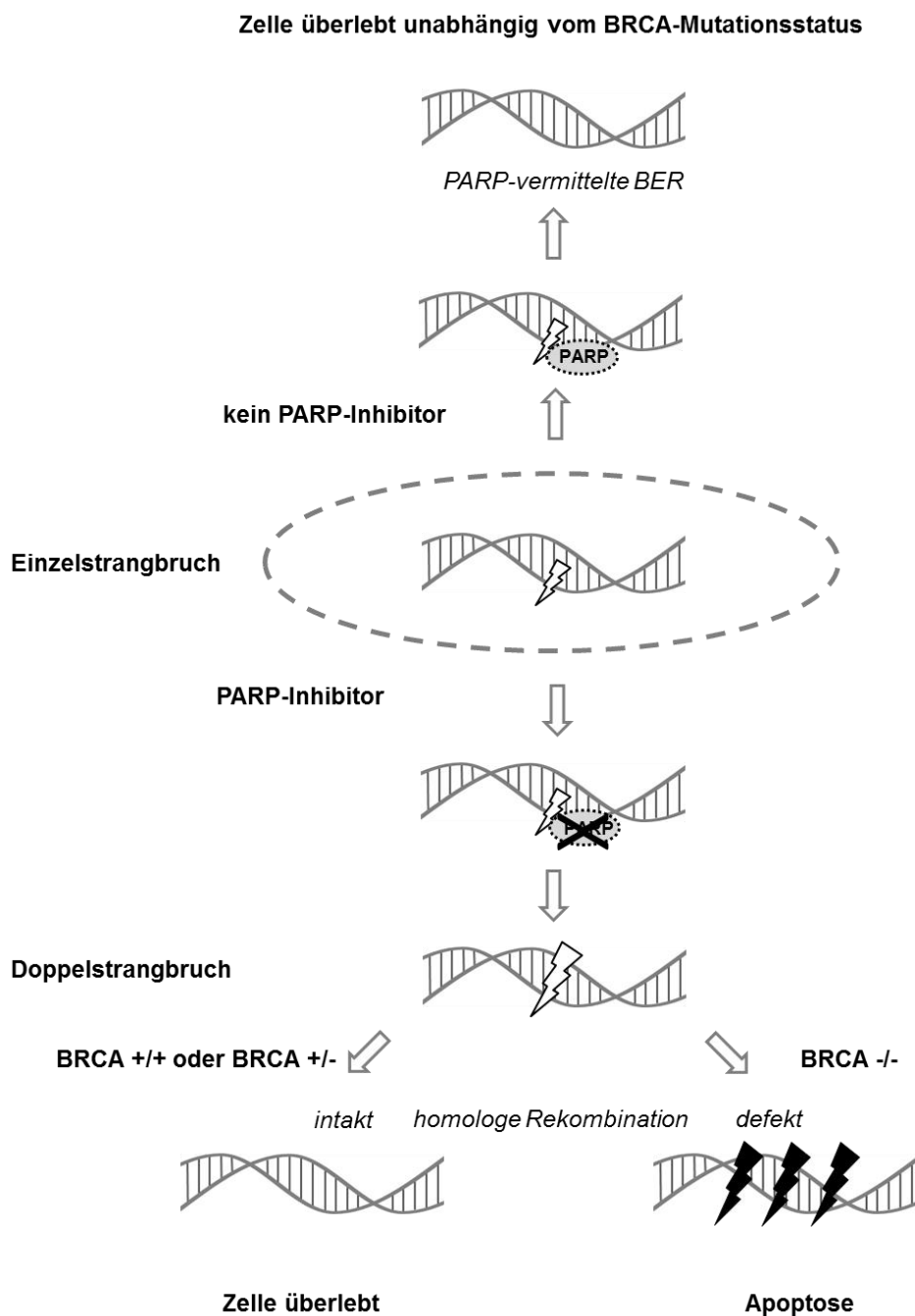


Abbildung 2: Schematische Darstellung der selektiven Wirkungsweise von PARP-Inhibitoren

Kommt es in einer Zelle zu einem Einzelstrangbruch kann dieser PARP-vermittelt über die Basenexzisionsreparatur (BER) behoben werden. Durch den Einsatz von PARP-Inhibitoren kommt es hingegen während der Zellteilung zu einem Doppelstrangbruch, welcher mittels homologer Rekombination behoben wird. Da dieser Reparaturmechanismus in BRCA-defizienten Zellen defekt ist, kommt es zur selektiven Apoptose dieser Zellen. Modifiziert nach [83].

PARP-Inhibitoren wurden in BRCA-defizienten Malignomen bisher in klinischen Phase I und II Studien getestet [84-89], aktuell wird PARP als therapeutisches Target in laufenden Phase III-Studien untersucht [90]. Dennoch konnten bisher keine prädiktiven Tests für das Ansprechen auf PARP-Inhibitortherapie etabliert werden, auch ist unklar welche Patientengruppen tatsächlich von dieser alternativen Therapie profitieren könnten.

1.5 Herleitung der Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines bestehenden Kollektivs neue, therapeutisch relevante Biomarker im Ovarialkarzinom zu untersuchen. Da sich tripel negative Mammakarzinome und Typ II Ovarialkarzinome in Bezug auf Molekulargenetik und Therapieansprechen ähneln, wurden hierzu drei Biomarker ausgewählt, die bereits im Mammakarzinom relevante Ergebnisse erzielten.

Generell wurden ALDH1(A1), TMSB15(A) und PARP1 aufgrund neuester molekulargenetischer Erkenntnisse in Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen separat betrachtet. Die Expressionsbestimmung erfolgte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- ➔ Wie ist das Expressionsmuster von ALDH1A1, TMSB15A und PARP1 im Ovarialkarzinom?
- ➔ Liefern die mRNA- und Proteinexpression unterschiedliche Informationen?
- ➔ Unterscheidet sich die Markerexpression zwischen Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen?
- ➔ Korreliert die Markerexpression mit klinisch-pathologischen Faktoren?
- ➔ Haben die Marker prognostischen Einfluss auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben der Patientinnen?
- ➔ Ändert sich die Markerexpression im Verlauf der Tumorprogression (Primär- versus Rezidivtumor)?

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Kulturmedien und Enzyme

Acrylamid	Appligene Oncor, Illkirchen-Graffenstaden, Frankreich
Antibody Diluent Reagent Solution	Invitrogen, Camarillo, CA, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CPD-Star Tropix	Applied Biosystems, Bedford, MA, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DNAse I, RNAse-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1 g/L Glucose	Lonza, Verviers, Belgien
Ethanol 100 Vol.-%	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glycerol	Fluka, Neu-Ulm
Glycin	Serva, Heidelberg
Hämalaunlösung sauer nach Meyer	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
I-Block	Applied Biosystems, Bedford, MA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MCDB 105 Medium #6395	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
MCDB 199 Medium #M-2154	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nuclease-Free Water Ambion	Applied Biosystems, Austin TX, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Nitro-Block-II Tropix	Applied Biosystems, Bedford, MA, USA
Pageruter Plus Prestained Protein Ladder #SM1811	Fermentas, USA

Peroxidase Blocking Solution REAL (S2023)	Dako, Glostrup, Dänemark
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck, Darmstadt
N, N, N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 20	Serva, Heidelberg
Trypsin	Biochrom, Berlin
Vitro Clud	R. Langenbrinck, Emmendingen
Xylol	JT Baker, Deventer, Niederlande
Zitronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt

2.1.2 Lösungen

10 x Assaypuffer	24,2 g TRIS-Base in 800 ml Aqua bidest lösen und auf pH 9,8 einstellen 2,033g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua bidest
Blockingpuffer	0,6 g I-Block 30 ml 10xPBS mit 270 ml Aqua bidest auffüllen und erhitzen 300 μl Tween-20
10 x Citratpuffer pH 6	3,78 g Zitronensäure 24,21 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad 1000 ml Aqua bidest. (Milipore)
10x Elektrophoresepuffer	30,3 g TRIS-Base 144 g Glycin 2,8 g SDS ad 1000 ml Aqua bidest. pH 8,3-8,4 einstellen
PBS-Puffer	103,166 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 23,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40,0 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest pH 7,2 einstellen
Proteinprobenpuffer	1,2 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 2,0 ml 10% SDS 1,0 ml Glycerol 0,5 ml 1M DTT 5,3 ml Aqua bidest

Sammelgel 4%	3,2 ml H ₂ O 0,5 ml Acrylamid 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 50 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 10 µl TEMED
10 x TBS pH 7,4	9 g Tris-Base 68,5 g Tris-HCl ad 1000 ml Aqua bidest. (Milipore)
1x Transferpuffer	2,90 g Glycin 5,80 g TRIS-Base 0,37 g SDS 200,00 ml Methanol ad 1000 ml Aqua bidest pH 8,3 einstellen und auf Endvolumen auffüllen
Trenngel 8%	5,3 ml H ₂ O 2,0 ml Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 5 µl TEMED
Trenngel 10%	4,5 ml H ₂ O 2,5 ml Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 5 µl TEMED

Waschpuffer 50 ml 10x PBS
 0,5 ml Tween 20
 mit Aqua bidest auf 500 ml auffüllen

2.1.3 Kits

BCA Protein Assay Kit BCA Reagenz A Pierce Biotechnology,
 BCA Reagenz B Rockford, IL, USA
 Bovines Serumalbumin

Dako REAL Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse Code K5001 A: Biotinylierte Sekundärantikörper Dako,
 B: Streptavidinperoxidase Glostrup, Dänemark
 C: DAB⁺ Chromogen (x 50)
 D: Merretichperoxidase Substatpuffer

DC Protein Assay Reagent A: alkalische Kupfer-Tartratlösung Bio-Rad Laboratories,
 Reagent B: verdünnte Folinlösung Hercules, CA, USA
 Reagent S

SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX SuperScriptIII Reverse Transkriptase Invitrogen,
 Platinum Taq DNA-Polymerase Forest City, CA, USA
 2x Reaktionsmix mit ROX

VERSANT[®] Sample Preparation 1.0 Reagents Lysepuffer Siemens Healthcare
 Waschlösung 1 Diagnostics,
 Waschlösung 2 Tarrytown NY, USA
 Waschlösung 3
 Elutionspuffer
 Magnet-Beads
 Proteinase K

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Chromatographiepapier	Whatman, Maidstone, UK
Conical Tube 15 ml, 50 ml	BD Biosciences, Canaan, CT, USA
Deckgläser 24 x 40 mm	Gerhard Menzel, Braunschweig
Disposable Adhesive EU-Optiseal Filter FP 30/0,2 CA-S	Bioplastics, Landgraaf, Niederlande Whatman, Dassel
Insulinspritzen 1 ml	Terumo, Leuven, Belgien
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Latex Einweghandschuhe pulverfrei	Emerson, Genua, Italien
Microtest 96 Well Platte	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Multiwell Zellkulturplatten 6 Well	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
PAP-Pen	The Binding Site, Birmingham, UK
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Eppendorf, Hamburg
qPCR-Platten 96 Well, semi-skirted	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Safe-Lock Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
SafeSeal ReagiergefäÙe 0,5 ml, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturflaschen 75 cm ²	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellschaber	Costar, Acton, MA, USA

2.1.5 Geräte

CO ₂ -Inkubator MCO-18AC	Sanyo, Moriguchi, Japan
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
Elektrophoresenetzgerät Power Pac P25	Biometra, Göttingen
Elektrophoresenetzgerät PowerPac HC	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Immunhistologie Nasskammer	Eigenbau
Kompaktschüttler KS-15	Edmund Bühler, Tübingen
Magnetrührer RET basic	IKA Werke, Staufen
Mikroplattenspektrometer Benchmark Plus	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mirax Slide Scanner	3D Histech, Ungarn
Multipipette Charlotte 5-250 µl	VistaLab Technologies, Brewster, NY, USA
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetboy Acu	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
qRT-PCR-Gerät Stratagene MX 3005P	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Schnellkochtopf Olympic System Plus	BergHOFF, Paderborn
Thermocycler TRIO	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International, Darmstadt
Versant kPCR Molecular System SP	Siemens Healthcare, Eschborn
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Vortexer MS 2 Minishaker	IKA Werke, Staufen
Zellkulturbrutschrank B6030	Heraeus Instruments, Hanau
Zellkulturmikroskop IMT-2	Olympus Optical, Hamburg
Zellkulturwerkbank LaminAir HBB2472	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Primer

Für die quantitative real-time-PCR wurden Primer- und Sondenoligonukleotide verwendet, die von der Firma Microsynth (Wolfurt-Bahnhof, Österreich) bezogen wurden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete Primer für die qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz	Oligo-ID
RPL37A forward	5'-TGT GGT TCC TGC ATG AAG ACA-3'	1063490
RPL37A reverse	5'-GTG ACA GCG GAA GTG GTA TTG TAC-3'	1063491
RPL37A probe	5'-TGG CTG GCG GTG CCT GGA-3'	1063489
ALDH1A1 forward	5'-TGT TCC AGG AGC CGA ATC A-3'	1277106
ALDH1A1 reverse	5'-CAA ATC GGT GAG TAG GAC ACC TAA-3'	1277108
ALDH1A1 probe	5'-AAA TGT CAT CCT CAG GCA CGC CAG A-3'	1277107
TMSB15A forward	5'-CCG CGA ACA GCC TTT CAC-3'	1171751
TMSB15A reverse	5'-CGA CAA GTC TGG CTT ATC ACT CA-3'	1171752
TMSB15A probe	5'-CAA GCT TTC AGG CTA TCT TCT AGT CAA-3'	1171750
PARP1 forward	5'-AAG ACC TCC CTG TGG TAA TTG G-3'	1277112
PARP1 reverse	5'-GCG CTT CGG GTG AAT TCA TA-3'	1277114
PARP1 probe	5'-TAG CCG AGT CAC ACC CGG TGG C-3'	1277113

2.1.7 Antikörper

Aktin (clone C4)	monoclonal mouse anti-human	Chemicon International, Temecula, CA, USA
ALDH1 (clone 44)	monoclonal mouse anti-human	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA
TMSB15 (ab52142)	polyclonal rabbit anti-human	Abcam, Cambridge, UK
PARP (clone 7D3-6)	monoclonal mouse anti-human	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

2.1.8 Zelllinien

OAW-42 (ECACC# 85073102) humanes Adenokarzinom des Ovars	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK
A27/80 (ECACC# 93112519) humanes Ovarialkarzinom	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK
OVCAR-3 (ATCC# HTB-161) humanes Adenokarzinom des Ovars	LGC Promochem, Wesel
CAOV-3 (ATCC# HTB-75) humanes Adenokarzinom des Ovars	WAK-Chemie Medical, Bad Soden
SKOV-3 (ATCC# HTB-77) humanes Adenokarzinom des Ovars	LGC Promochem, Wesel
EFO-27 (DSM# ACC 191) humanes Adenokarzinom des Ovars	DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
ES-2 (ATCC# CRL-1978) humanes klarzelliges Karzinom des Ovars	WAK-Chemie Medical, Bad Soden
EFO-21 (DSM# ACC 235) humanes Adenokarzinom des Ovars	DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
FuOV-1 (DSMZ# ACC 444) humanes Adenokarzinom des Ovars	DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
HOSE normales Oberflächenepithel des Ovars	Dr. S.W. Tsao, Hong Kong, China [91]

2.2 Methoden

2.2.1 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren das die exponentielle Amplifizierung ausgewählter Nukleinsäureabschnitte ermöglicht. Hierbei kommen Oligonukleotide (Primer), die komplementär zu den zu amplifizierenden Abschnitten sind, zum Einsatz.

In dieser Arbeit wurden Genprodukte mittels einer quantitativen real-time-PCR (qRT-PCR) nachgewiesen und quantifiziert. Im Unterschied zu konventionellen PCR-Verfahren, welche als Endpunkt-Verfahren erst nach Abschluss der PCR eine Beurteilung des PCR-Produktes zulassen, wird bei der qRT-PCR in jedem Zyklus das entstandene Produkt gemessen. Dies kann beispielsweise durch eine TaqMan-Sonde geschehen. TaqMan-Sonden sind Oligonukleotide, die komplementär zu einem zwischen dem Vorwärts- und Rückwärtsprimer liegenden Abschnitt des zu amplifizierenden Stranges sind. Durch eine zusätzliche Hybridisierung sind sie an ihrem 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff markiert, dessen Fluoreszenz durch die räumliche Nähe zu einem am 3'-Ende sitzenden Quencherfarbstoff und einen Phosphatrest unterdrückt wird. Im Verlauf des PCR-Zyklus lagert sich die Sonde an den komplementären Strang an, während der entstehende Strang durch die Taq-Polymerase verlängert wird (Abbildung 3A). Durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der am 5'-Ende sitzende Reporterfarbstoff hydrolytisch abgespalten und entfernt sich vom Quencher. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal ist proportional zum entstandenen PCR-Produkt und wird am Ende jedes PCR-Zyklus detektiert (Abbildung 3B) [92]. Als Reporterfarbstoff der in dieser Arbeit verwendeten Sonden diente 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), als Quencherfarbstoff 6-Carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA).

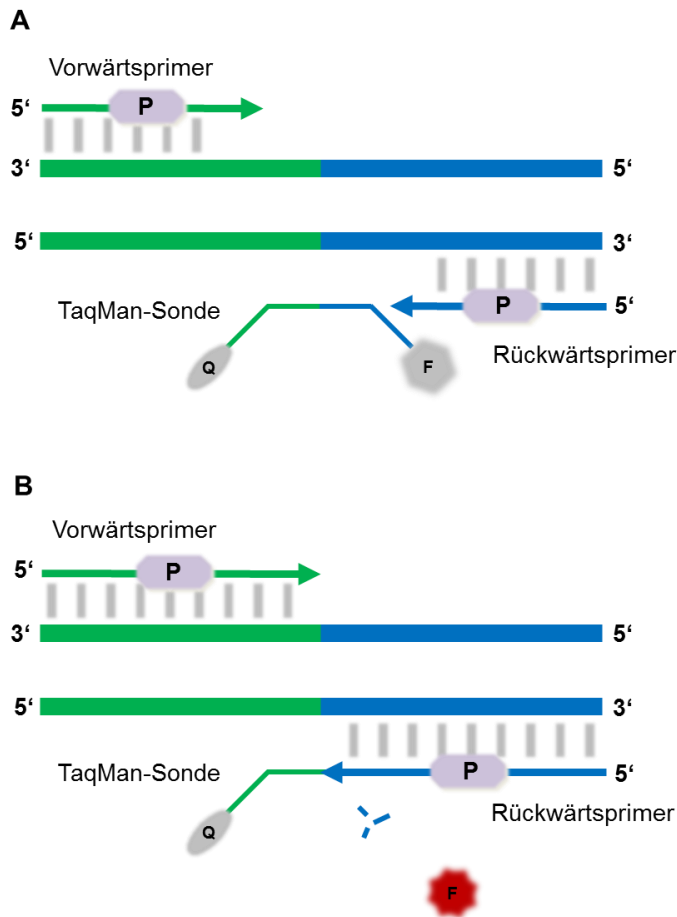


Abbildung 3: Schematische Darstellung der TaqMan-PCR

A Annealing von Primern und TaqMan-Sonde, Verlängerung des komplementären Strangs durch die Taq-Polymerase (P). **B** Hydrolytische Abspaltung des Rezeptorfarbstoffs durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase und Entstehung des Fluoreszenzsignals durch Entfernung des Rezeptorfarbstoffs (F) vom Quencher (Q). Modifiziert nach [93].

2.2.1.1 RNA-Isolation aus FFPE-Gewebe

Zur Vorbereitung der mRNA-Bestimmung musste zunächst RNA aus den Formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben der Patienten extrahiert werden. Dies erfolgte durch eine vollautomatische Methode mit einem Roboter. Verwendet wurden hierbei sowohl 10 µm dicke Paraffinschnitte die mindestens 50% Tumor enthielten, als auch 1,5 mm durchmessende Stanzen aus den Tumoren.

Die vollautomatisierte RNA-Extraktion wurde mit dem Versant kPCR Molecular System SP-Gerät der Firma Siemens, wie bereits durch Bohman und Mitarbeiter beschrieben,

durchgeführt [94]. Verwendet wurde hierfür das VERSANT Sample Preparation 1.0 Reagents-Kit. Zuerst wurden die FFPE-Proben herunterzentrifugiert, lysiert und das darin enthaltene Paraffin bei 80°C im FFPE-Puffer geschmolzen. Nach dem Herunterkühlen wurde ein Lysepuffer hinzugefügt und bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Übergebliebene Zellbestandteile wurden durch magnetische, silikonbeschichtete Beads gebunden und die Überstände in eine 96-well-Platte überführt. In diesen Lysaten wurden nach der Zugabe von Lysepuffer Nukleinsäuren mit Hilfe von neuen magnetischen Beads gebunden. Der Überstand wurde abpipettiert und die gebundenen Nukleinsäuren in drei verschiedenen Waschpuffern gewaschen. In jedem Waschschrift wurden die Proben magnetisiert und der Überstand anschließend verworfen. In einem letzten Schritt wurde ebenfalls gebundene DNA durch die Zugabe einer DNase lysiert. Die nun nur noch RNA-enthaltenden Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Durchführung der qRT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die Arbeitsfläche vor Beginn der Arbeiten mit RNase freier DNase gesäubert. Die bei -80°C aufbewahrten mRNA-Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut, gemischt und kurz herunterzentrifugiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Zunächst wurden die Primer und Sonden zusammengefügt (Tabelle 2). Diese konnten bei -20°C gelagert werden und so als Ausgangsmix für mehrere PCR-Läufe verwendet werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Primer-Sonden-Mixe

	RPL37A	ALDH1A1	TMSB15A	PARP1
Primer fwd	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Primer rev	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Probe	17,5 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Aqua	907,5 µl	875 µl	875 µl	875 µl
Gesamt	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Die Zusammensetzung jedes 20 µl-PCR-Ansatzes ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die qRT-PCR

Reagenz	Menge
Extrahierte RNA	1 µl
Primer-Sonden-Mix	2 µl
Reaktionsmix incl. ROX	10,04 µl
Platinum Taq-Polymerase	0,4 µl
RNAse freies Wasser	6,56
Gesamt	20 µl

Alle Ansätze wurden zusammengefügt, gemischt, kurz abzentrifugiert und als Doppelwerte zusammen mit einer mRNA- und einer Negativkontrolle (Aqua) auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Diese wurde mit einer transparenten Klebefolie verschlossen, 5 Minuten bei 450 U/min zentrifugiert und in das Stratagene MX 3005P-Gerät überführt.

Die PCR wurde in einem one-step-Verfahren durchgeführt, was bedeutet, dass die reverse Transkription von mRNA in cDNA der eigentlichen Amplifikation direkt vorgeschaltet ist. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte über 30 Minuten bei 50°C, wonach 2 Minuten bei 95 °C zur Aktivierung der Taq-Polymerase folgten. Im Anschluss folgten 40 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95° zur Denaturierung, sowie 30 Sekunden bei 60°C zum Annealing der Primer und Elongation des neuen Stranges. Am Ende jedes Zyklus wurde bei 60°C das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Resultate konnten nach Abschluss der PCR mit dem Programm MxPro (Version 4.01, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) betrachtet werden.

2.2.1.3 Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes

Zu Beginn der PCR kann in den Ansätzen lediglich eine Hintergrundfluoreszenz gemessen werden. Da sich die PCR-Produkte mit jedem Zyklus exponentiell vervielfältigen, steigt in proportionalem Maße auch das Fluoreszenzsignal an. Der Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal der Probe einen bestimmten Schwellenwert über

die Hintergrundfluoreszenz hinaus überschreitet wird als der *Cycle of Threshold* (C_T) bezeichnet. Je mehr PCR-Produkt in einer Probe enthalten ist, desto früher wird dieser Wert erreicht.

Da der Gehalt an mRNA in den Proben variierte, wurden diese normalisiert um die Expressionslevel der Marker zu vergleichen. Hierfür wurde für jede Probe ein sogenanntes Housekeeper-Gen als Referenz mitgemessen. In dieser Arbeit wurde zur Normalisierung das Referenzgen RPL37A (ribosomal protein 37A) verwendet. Dieses Gen wird unreguliert, also unabhängig vom Zellzyklus oder äußeren Einflüssen, exprimiert.

Alle Messungen wurden als Doppelwertbestimmung durchgeführt und der Mittelwert der Duplikate errechnet. Durch Subtraktion des C_T -Mittelwertes des Referenzgens vom C_T -Mittelwerte des Zielgens wurde der normalisierte ΔC_T -Wert gebildet (Abbildung 4):

$$\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Zielgen})} - \Delta C_{T(\text{RPL-37A})}$$

Da sich dieser Wert umgekehrt proportional zum gebildeten PCR-Produkt verhält, wurde dieser von 20 subtrahiert [95]:

$$\Delta\Delta C_T = 20 - (\Delta C_{T(\text{Zielgen})} - \Delta C_{T(\text{RPL-37A})})$$

Für alle weiteren Berechnungen wurde im Folgenden der $\Delta\Delta C_T$ -Wert verwendet.

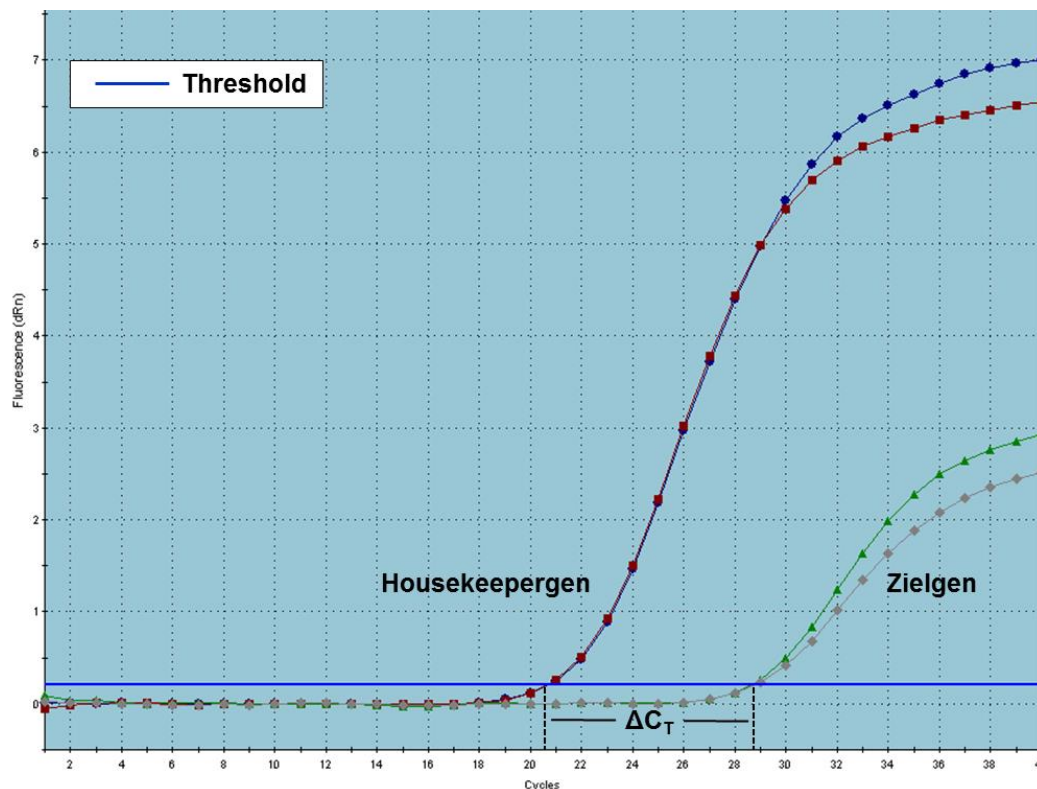


Abbildung 4: Berechnung des ΔC_T -Wertes

Dargestellt ist ein repräsentatives Bildschirmfoto des Programms MxPro. Auf der Y-Achse sind die Fluoreszenzwerte, auf der X-Achse die PCR-Zyklen dargestellt. Der PCR-Zyklus in dem die Fluoreszenz der Probe über den Schwellenwert hinaus fluoresziert wird als Cycle of Threshold (C_T) bezeichnet. Die C_T -Wert-Differenz zwischen Ziel- und Housekeepergen (ΔC_T) gibt die relative Höhe der Markerexpression an.

2.2.1.4 Einschlusskriterien

Alle Proben, die die folgenden Kriterien erfüllten, wurden in die Auswertung mit eingeschlossen:

- C_T -Differenz der Doppelwerte < 1
- C_T - Mittelwert der Proben < 39
- C_T -Wert Negativkontrolle im PCR-Lauf=40
- C_T -Mittelwert der RNA-Kontrolle im Lauf für RPL37A zwischen 17 und 19
- C_T -Mittelwert der RNA-Kontrolle im Lauf für ALDH1A1 zwischen 24 und 26
- C_T -Mittelwert der RNA-Kontrolle im Lauf für TMSB15A zwischen 26 und 28
- C_T -Mittelwert der RNA-Kontrolle im Lauf für PARP1 zwischen 22 und 24

2.2.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die entstandenen PCR-Produkte zu überprüfen wurden diese einmalig sequenziert. Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der 1977 von Sanger und Mitarbeitern vorgestellten Methode zur Kettenabbruchsynthese [96]. Ähnlich wie bei der PCR wird die cDNA bei dieser Methode unter Einsatz von Primern amplifiziert. Neben den zur Synthese neuer DNA-Stränge benötigten Desoxyribonukleosidtriphosphaten sind dem Reaktionsgemisch jedoch auch markierte 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugesetzt, deren Einbau durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe zu einem Abbruch der Kettensynthese führt. Je nachdem wann der Einbau der ddNTPs in den zu amplifizierenden Strang erfolgt, entstehen unterschiedlich lange Fragmente, welche bei der von Sanger vorgestellten Vorgehensweise radioaktiv markiert und mittels Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt werden. Modernere Verfahren verwenden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte ddNTPs, die mittels einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt und zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Fluoreszenzsignal kann im Folgenden von einer Photozelle detektiert werden [97]. Die Sequenzierungen der vorliegenden Arbeit wurden durch die Firma provitro (Berlin) durchgeführt.

2.2.3 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen erlauben die Darstellung von Proteinen und Peptiden in Gewebeschnitten durch die Bindung spezifischer Antikörper. Hierdurch können im Lichtmikroskop Expression und Verteilung eines bestimmten Proteins beurteilt werden. Das Prinzip beruht darauf, dass Antikörper spezifisch an Epitope eines entsprechenden Proteins binden. Mittels eines beispielsweise biotinylierten Sekundärantikörpers, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist, kann ein Chromogen über eine enzymatische Reaktion die entstandenen Komplexe sichtbar machen [98].

Die Anfärbung der Gewebeproben der vorliegenden Arbeit erfolgte an *Tissue Microarrays* (TMAs) eines bestehenden Ovarialkarzinomkollektivs. Hierzu wurden bei der Kollektiverstellung Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Großflächenschnitte von Tumorproben der Patienten lichtmikroskopisch beurteilt und der Tumor auf dem Schnitt markiert. Zwei bis vier 1,5 mm durchmessende Tumorstanzen pro Patient wurden mit Hilfe eines Tissue Microarrayers (Beecher Instruments, Woodland, CA, USA) aus dem

entsprechenden Paraffinblock entnommen zu neuen Paraffinblöcken zusammengefügt. Hierdurch konnten Gewebeproben von mehreren Patienten auf einem Objektträger angefärbt werden.

Für die immunhistochemische Färbungen wurden die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben zur Entparaffinierung zunächst 20 Minuten in Xylol gewaschen und anschließend jeweils eine Minute in einer absteigenden Alkoholreihe (3x100%, 1x96%, 1x90%, 1x80%, 3x70%, Aqua bidest) rehydriert. Da Proteine durch die Einwirkung des Formalins vernetzt wurden, mussten diese Vernetzungen der Antigenbindungsstellen rückgängig gemacht werden. Dies erfolgte durch das sogenannte hitzeinduzierte Epitop-Retrieval. Hierzu wurden die Schnitte fünf Minuten in einem Schnellkochtopf in Citratpuffer (pH 6) gekocht und anschließend unter fließendem Leitungswasser abgekühlt. Nachdem die Schnitte 15 Minuten in TBS-Puffer (pH 7,4) belassen wurden, wurden die Gewebeproben mit einem PAP-Pen umrandet und endogene Peroxidase mit einem Blockierungspuffer über 15 Minuten blockiert. Anschließend wurden 200 µl des jeweiligen verdünnten Primärantikörpers aufgetragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer Nasskammer auf den Schnitten inkubiert. Die zuvor ausgetestete Verdünnung des Primärantikörpers betrug für ALDH1 1:500, für TMSB15 1:9000 und für PARP1 1:1500. Dieser wurde nach Ablauf der Inkubationszeit nacheinander durch Leitungswasser, Aqua bidest, TBS/Tween 0,5% und TBS-Puffer heruntergewaschen und ein biotinylierter Sekundärantikörper für weitere 15 Minuten auf den Schnitten inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde anschließend mit TBS-Puffer heruntergewaschen und Streptavidin-Peroxidase aufgetragen. Nachdem diese nach weiteren 15 Minuten wiederum mit TBS-Puffer heruntergewaschen wurde, konnte die Antigen-Antikörper-Reaktion durch Auftragen eines Chromogens (3,3'-Diaminobenzidin, DAB⁺) visualisiert werden. Die Chromogenreaktion wurde bei ALDH1 nach 30 Sekunden, bei TMSB15 nach 2 Minuten und 10 Sekunden und bei PARP1 nach 2 Minuten mit Aqua bidest abgestoppt. Die Schnitte wurden 20 Sekunden mit Hämalaunlösung gegengefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten gebläut. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (Aqua bidest, 3x70%, 1x80%, 1x90%, 1x96%, 3x100%) wurden die Schnitte dehydriert und anschließend bis zum Eindecken mit Vitro Clud und einem Deckgläschen in Xylol belassen.

Die gefärbten Schnitte wurden mittels des Mirax Slide Scanner (3D Histech, Ungarn) digitalisiert, die Auswertung erfolgte über das Programm VM Slide Explorer 2009 (VM Scope, Berlin) durch eine erfahrene Pathologin. Zur Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen fand der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner Anwendung [99]. Hierzu wurde zum einen die Anzahl der gefärbten Tumorzellen beurteilt. 0% bekamen den Wert 0, <10% den Wert 1, 10-50% den Wert 2, 51-80% den Wert 3 und >81% den Wert 4. Dieser wurde dann mit der Intensität der Färbung (keine Färbung=0, schwache Färbung=1, moderate Färbung=2, starke Färbung=3) multipliziert und somit der IRS errechnet. Dieser konnte 0,1,2,3,4,6,8,9 oder 12 betragen.

In einem bereits durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlichten Projekt wurde an einem überlappenden Ovarialkarzinomkollektiv immunhistochemisch die EGFR-Expression bestimmt [55]. Zunächst lagen bei 83 Patientenproben Daten zu beiden Markern vor. Da zwischen den Untersuchungen zu EGFR und der vorliegenden Arbeit das Ovarialkarzinomkollektiv um einen weiteren TMA erweitert wurde, wurde dieser in unserer Arbeitsgruppe entsprechend dem von Frau Noske beschriebenen Protokoll nachgefärbt. Die Protokolle waren bis auf die Auswahl des Detektierungssystems 3,3'-Diaminobenzidin (statt FastRed), welches der aktuelle Standard des Ventana Benchmark Discovery XT Färbeautomatens ist, identisch. Die Reproduzierbarkeit der Färbung wurde kontrolliert, indem ebenfalls ältere TMAs gefärbt und mit den Originalen verglichen wurden. Somit konnte die Fallzahl auf 112 erhöht werden.

2.2.4 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5%igem Volumenanteil CO₂ inkubiert. Als Kulturmedium wurde für die Ovarialkarzinomzelllinien OAW-42, A27/80, OVCAR-3, CAOV-3, SKOV-3, EFO-27, ES-2, EFO-21 und FuOV-1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) verwendet, bei der ovariellen Oberflächenepithelzelllinie HOSE DMEM mit 10% FCS, sowie Medium 105 und Medium 199 zu gleichen Anteilen. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank sowie unter Verwendung steriler Lösungen und Materialien. Ein Mediumwechsel fand alle drei bis vier Tage statt, bei 80 %iger Konfluenz erfolgte eine Passagierung der

Zellen. Hierzu wurde zunächst das Medium der Zellen abgesaugt und mit 3 ml gefilterter Trypsinlösung gespült, welches zeitnah abgesaugt wurde. Nach erneuter Zugabe von 2 ml gefiltertem Trypsin erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C. Sobald die Zellen sich unter mikroskopischer Kontrolle vollständig vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und separiert hatten, wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 3 ml Medium gestoppt. Die Passagierung erfolgte in zweimal 2,5 ml mit Zugabe von jeweils 10 ml frischen Mediums.

2.2.5 Proteinisolierung und Proteinkonzentrationsbestimmung

Zunächst mussten Proteine aus den Zelllinien isoliert werden indem die Zellen einer 6-Well Zellkulturplatte mit 50 µl Proteinpuffer für fünf Minuten auf Eis aufgeschlossen und im Anschluss mehrfach in einer Insulinspritze aufgezogen wurden. Die Proben wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, bei 4°C 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, und der entstandene Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Der Proteingehalt wurde mit dem DC Protein Assay (Bio-Rad) bei 750 nm mit einem Mikroplattenspektrometer entsprechend der Empfehlung des Herstellers gemessen. Zur exakten Konzentrationsbestimmung wurde parallel eine Standardkurve mit einer definierten Proteinstandardreihe (bovines Serumalbumin des BCA Protein Assay Kits) erstellt.

2.2.6 Westernblot

Für die Elektrophorese wurden die Proteinproben mit Proteinprobenpuffer auf eine Konzentration von 10 µg/µl verdünnt und anschließend für 10 Minuten bei 95°C in einem Thermocycler denaturiert. Es wurden je 100 µg Protein in die Taschen eines vierprozentigen Sammelgels aufgetragen. Das Sammelgel, welches dem eigentlichen Trenngel aufgelagert ist, dient der gleichmäßigen Auftrennung der Proteinproben. Zusätzlich wurde zur Längenorientierung eine Kontrolle pro Gel aufgetragen. Je nach Größe des zu bestimmenden Proteins wurden acht- bis zehnprozentige Trenngele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 100 Minuten durchgeführt. Zum Überführen der Proteinproben vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran wurde anschließend ein Semi-dry-Blot durchgeführt. Dieser erfolgte für 90 Minuten bei einer Stromstärke von 144 mA pro Membran. Die Membran wurde anschließend mit PBS

gespült und unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockingpuffer blockiert. Die Primärantikörper gegen ALDH1 und PARP wurden jeweils 1:1000 in Blockingpuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Membranen inkubiert. Zur Beladungskontrolle wurden parallel Westernblots mit Aktin (Verdünnung 1:5000) angefertigt. Am folgenden Tag wurden ungebundene Primärantikörper zunächst dreimal für je 15 Minuten unter schnellem Schwenken mit einem Waschpuffer heruntergewaschen. Ein gegen die Spezies des Primärantikörpers (Maus) gerichteter Sekundärantikörper wurde 1:5000 mit Blockingpuffer verdünnt und 45 Minuten bei Raumtemperatur auf den Membranen inkubiert. Nach erneutem Herunterwaschen wurden die Membranen zweimal zwei Minuten in frisch angesetztem Assaypuffer gepuffert bevor diese mit einem aktivierten Chemolumineszenzsystem CPD-Star über 5 Minuten benetzt wurde. Die Visualisierung erfolgte über unterschiedliche Zeiträume auf ECL-Hyperfilmen.

2.3 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden in dieser Arbeit Gewebeproben von 209 Patientinnen untersucht, die sich zwischen 1991 und 2007 aufgrund eines primären Ovarialkarzinoms einer radikalen Operation mit dem Ziel der kompletten Tumormassenentfernung in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Charité Universitätsmedizin Berlin unterzogen hatten. Alle Tumorpräparate wurden am Institut für Pathologie der Charité untersucht und von einem versierten Gynäkopathologen hinsichtlich Histologie (gemäß aktueller WHO-Klassifikation 2003) [5] und Grading (gemäß Silverberg) [6] reevaluiert.

Das Erkrankungsalter der Patientinnen reichte 24,5 bis 87,1 Jahren, das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug 58,3 Jahre. Die mediane Überlebenszeit bis zum Rezidiv des Tumors betrug 20,2 Monate (0,5 bis 131,6 Monate), die mediane Gesamtüberlebenszeit 36,6 Monate (0,8 bis 220,1 Monate). 67 Patientinnen verstarben während des Follow-Up-Zeitraumes. Die Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter im Patientenkollektiv ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verteilung der klinisch-pathologischen Faktoren im Gesamtkollektiv

Charakteristik		Gesamtkollektiv	Typ I	Typ II
		n=209	n=59 (28,2%)	n=150 (71,8%)
		Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
Alter	≤60	115 (55,0)	37 (62,7)	78 (52,0)
	>60	94 (45,0)	22 (37,3)	72 (48,0)
Histologie	high grade serös	145 (69,4)	0 (0,0)	145 (96,7)
	low grade serös	21 (10,0)	21 (35,6)	0 (0,0)
	muzinös	8 (3,8)	8 (13,6)	0 (0,0)
	endometrioid	21 (10,0)	16 (27,1)	5 (3,3)
	klarzellig	14 (6,7)	14 (23,7)	0 (0,0)
Grading	G1	35 (16,7)	35 (59,3)	0 (0,0)
	G2	74 (35,4)	21 (35,6)	53 (35,3)
	G3	100 (47,8)	3 (5,1)	97 (64,7)
pT	pT1	42 (20,1)	25 (42,4)	17 (11,3)
	pT2	18 (8,6)	5 (8,5)	13 (8,7)
	pT3	149 (71,3)	29 (49,2)	120 (80,0)
pN	pN0	79 (45,1)	31 (62,0)	48 (38,4)
	pN1	96 (54,9)	19 (38,0)	77 (61,6)
	pNx	34	9	25
FIGO	FIGO I	37 (17,7)	25 (42,4)	12 (8,0)
	FIGO II	13 (6,2)	4 (6,8)	9 (6,0)
	FIGO III	143 (68,4)	28 (47,5)	115 (76,7)
	FIGO IV	16 (7,7)	2 (3,4)	14 (9,3)
Tumorrest	0	91 (66,4)	17 (65,4)	74 (66,7)
	>0	46 (33,6)	9 (34,6)	37 (33,3)
	fehlend (FIGO I)	37	25	12
	fehlend	35	8	27

Tabelle 4: Verteilung der klinisch-pathologischen Faktoren im Gesamtkollektiv
(Fortsetzung)

Charakteristik		Gesamtkollektiv	Typ I	Typ II
		Anzahl (%)	Anzahl (%)	Anzahl (%)
CTX	platinbasiert	179 (95,2)	49 (92,5)	130 (96,3)
	nicht platinbasiert	3 (1,6)	0 (0,0)	3 (2,2)
	keine CTX	6 (3,2)	4 (7,5)	2 (1,5)
	<i>davon FIGO Ia</i>	5		
	fehlend	21	6	15

CTX=Chemotherapie

Darüber hinaus wurde recherchiert, ob im Institut für Pathologie der Charité Proben aus Rezidivoperationen der Patientinnen eingegangen waren. Aus dem Institutsarchiv wurden Paraffinblöcke und HE-gefärbte Schnitte von Rezidivtumoren herausgesucht und mit der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Vorgehensweise ein TMA erstellt, der Rezidivfälle von 38 Patientinnen beinhaltet.

2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme PASW Statistics 18 (SPSS, Chicago, IL, USA) und Graph Pad Prism 5 (Version 5.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Das Patientenüberleben in Verbindung mit den verschiedenen Markern wurde univariat mittels der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse in Kombination mit dem Log-Rang-Test und multivariat mit Hilfe des Cox-Regressionsmodells untersucht. Korrelationsbestimmungen der kontinuierlichen mRNA-Daten mit klinischen und pathologischen Faktoren wurden anhand des Man-Whitney-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Bei gruppierten Proteinexpressionsdaten wurden Korrelationen mit klinischen und pathologischen Faktoren mittels des exakten Tests nach Fisher beziehungsweise des Chi-Quadrat-Tests bestimmt. Die Korrelation zwischen Primär- und Rezidivtumor wurde auf mRNA-Ebene mittels des T-Tests für gepaarte Stichproben, auf Proteinebene mittels des Wilcoxon-Tests für verbundene

Stichproben untersucht. Korrelationen zwischen den Protein- und mRNA-Daten der jeweiligen Marker wurden nach Spearmans-Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman-Rho) errechnet. Generell wurden p-Werte zweizeitig bestimmt und p-Werte $<0,05$ als signifikant angesehen.

Um den optimalen Cutoff der mRNA-Daten für das Gesamtüberleben zu berechnen, wurde der Cutoff Finder (<http://molpath.charite.de/cutoff>) verwendet [100]. Über verschiedene Möglichkeiten können auf dieser Webseite aus kontinuierlichen Biomarkerdaten optimale Cutoffs errechnet werden um Patientenkohorten zu unterteilen. In dieser Arbeit wurde hierfür ein Chi-Quadrat-basierter Test ausgewählt. Hierbei ergibt sich der optimale Cutoff aus dem Wert mit dem kleinsten p und der engsten Hazard Ratio.

2.5 Statistischer Analyseplan

Die erhobenen Daten zu den Markern ALDH1(A1), TMSB15(A) und PARP1 wurden in dieser Arbeit einheitlich anhand eines statistischen Analyseplans untersucht, welcher in Abbildung 5 dargestellt ist.

Die Ergebnisse des jeweiligen Markers sind getrennt für die mRNA- beziehungsweise die Proteinbestimmung aufgeführt. Zuerst dargestellt sind im Folgenden eine Übersicht der Ergebnisse des jeweiligen Markers im Gesamtkollektiv und Korrelationen des Markers zwischen Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen. Als nächstes erfolgt eine orientierende Darstellung der Markerexpression in den verschiedenen histomorphologischen Ovarialkarzinomsubtypen (HGSC, LGSC, EC, CCC, MC).

Im Anschluss daran erfolgt die ausführliche Darstellung der Ergebnisse des jeweiligen Markers in Typ II Ovarialkarzinomen. Für die Kaplan-Meier-Analysen zum Gesamt- und rezidivfreien Überleben werden auf mRNA-Ebene sowohl die kontinuierlichen Daten, wie auch Cutoffs beim Median und der optimale Cutoff dargestellt. Für Überlebensanalysen auf Proteinebene wurden Cutoffpunkte an verschiedenen IRS-Werten ausgetestet und der für den jeweiligen Marker statistisch günstigste Cutoff für das Gesamtüberleben dargestellt. Signifikante Ergebnisse in den Überlebensanalysen wurden zudem multivariat mit dem Alter (pro Lebensjahr), FIGO-Stadium (FIGO I-II versus FIGO III-IV) und dem Residualtumor (0 versus >0 cm) analysiert. Darauf folgend sind Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern wie dem Alter (≤ 60 Jahre

versus >60 Jahre), dem pT-Stadium (pT1 versus pT2-3), dem Nodalstatus (pN0 versus pN1), dem Ausbreitungsstadium gemäß FIGO (FIGO I-II versus FIGO III-IV) und dem Residualtumor (Residualtumor 0 cm versus Residualtumor >0 cm) aufgeführt. Zuletzt sind Korrelationen der Markerexpression zwischen Primär- und Rezidivtumor von Typ II Ovarialkarzinomen sowie Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinexpression des jeweiligen Markers im Gesamtkollektiv aufgeführt.

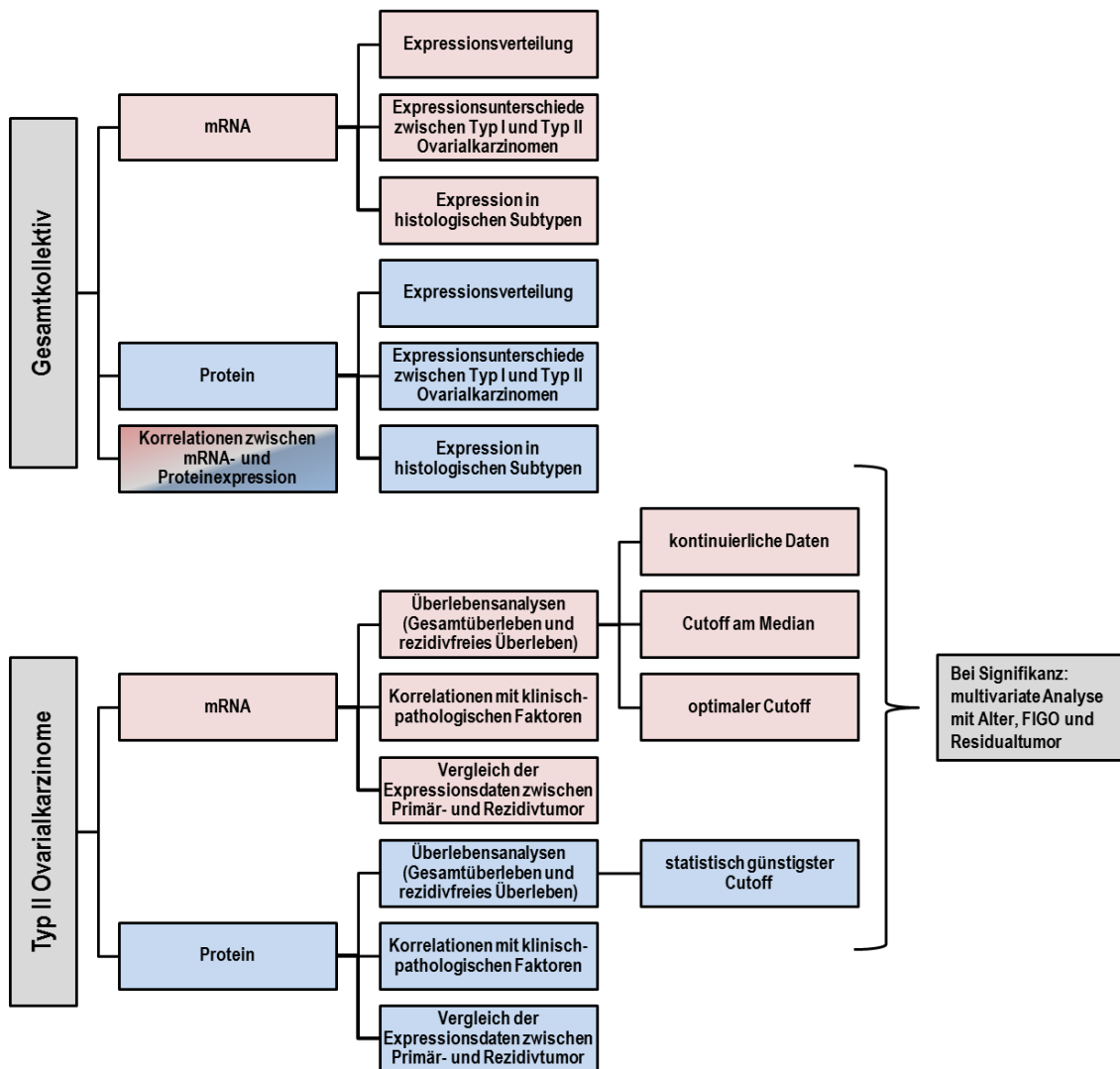


Abbildung 5: Statistischer Analyseplan zur einheitlichen Analyse der Ergebnisse von ALDH1(A1), TMSB15(A) und PARP1

Die Analysen erfolgten getrennt auf mRNA- und Proteinebene, zunächst im Gesamtkollektiv und darauffolgend separat in Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen.

3. Ergebnisse

3.1 Aldehyddehydrogenase 1 (A1)

3.1.1 ALDH1A1-Expression auf mRNA-Ebene

Um das entstandene PCR-Produkt zu überprüfen wurde eine Sangersequenzierung durchgeführt, welche den gewünschten 70 bp langen Genbereich des ALDH1A1-Gens bestätigte.

Nach Anwendung der in Kapitel 2.2.1.4 beschriebenen Qualitätskriterien konnten mRNA-Proben von 183 Patientinnen in die statistische Auswertung aufgenommen werden. Von diesen waren 43 Proben (23,5%) Typ I und 140 Proben (76,5%) Typ II Ovarialkarzinome. Die Verteilung der mRNA-Werte ist in Abbildung 6 dargestellt. Der mediane $\Delta\Delta C_T$ -Wert in Typ I Ovarialkarzinomen betrug 13,285 und gemessene Werte reichten von 9,79 bis 16,37. In Typ II Ovarialkarzinomen betragen die $\Delta\Delta C_T$ -Werte im Median 12,265 und reichten von 8,57 bis 16,65. Gemessene $\Delta\Delta C_T$ -Werte in Typ I Ovarialkarzinomen waren signifikant höher als in Typ II Ovarialkarzinomen ($p=0,005$; Mann-Whitney Test).

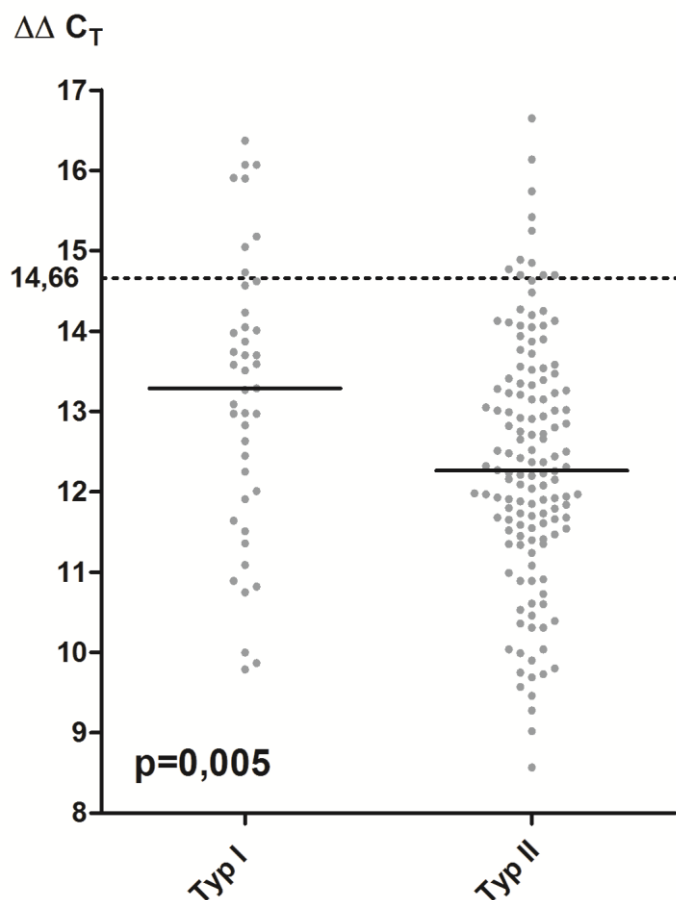


Abbildung 6: Verteilung der gemessenen ALDH1A1-mRNA-Werte in Typ I beziehungsweise Typ II Ovarialkarzinomen

Die medianen $\Delta\Delta C_T$ -Werte sind mit einer durchgezogenen, der optimale Cutoff in Typ II Ovarialkarzinomen ($\Delta\Delta C_T=14,66$) ist mit einer gestrichelten Linie dargestellt. Die ALDH1A1-mRNA-Expression war in Typ I Ovarialkarzinomen signifikant höher als in Typ II Ovarialkarzinomen ($p=0,005$; Mann-Whitney Test).

Die ALDH1A1-mRNA-Expression unterschied sich signifikant zwischen den verschiedenen histomorphologischen Typen von Ovarialkarzinomen und ist in Abbildung 7 dargestellt. Gemessene $\Delta\Delta C_T$ -Werte waren am niedrigsten in high grade serösen, am höchsten in muzinösen Ovarialkarzinomen ($p=0,003$; Kruskal-Wallis-Test).

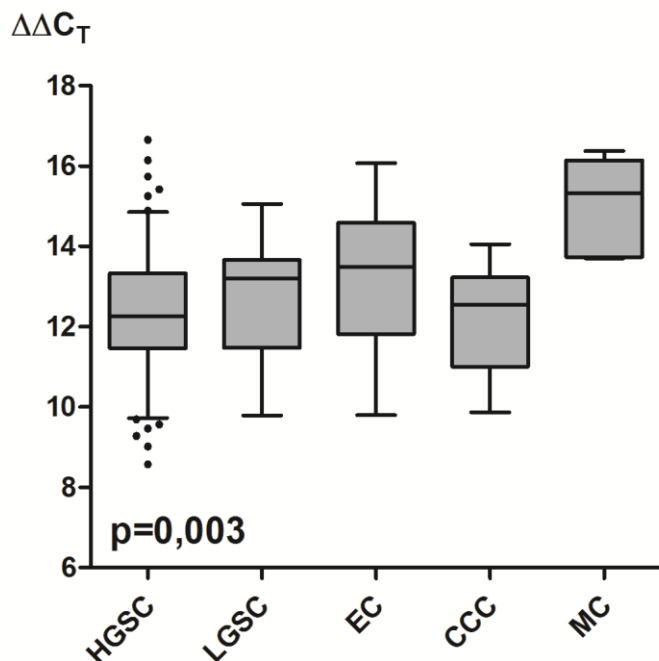


Abbildung 7: Boxplot-Diagramm zur $\Delta\Delta C_T$ -Verteilung von ALDH1A1 in den einzelnen histomorphologischen Subtypen

Die Boxen entsprechen dem Bereich, in dem 50% der $\Delta\Delta C_T$ -Werte der jeweiligen Gruppe liegen, die durchgezogenen Linien zeigen den medianen $\Delta\Delta C_T$ -Wert an. Die Antennen stellen die 5-95%-Perzentilen dar. Gemessene $\Delta\Delta C_T$ -Werte waren am niedrigsten bei high grade serösen, am höchsten bei muzinösen Ovarialkarzinomen (HGSC=high grade seröse Ovarialkarzinome, LGSC=low grade seröse Ovarialkarzinome, EC=endometrioide Ovarialkarzinome, CCC=klarzellige Ovarialkarzinome, MC=muzinöse Ovarialkarzinome) ($p=0,003$; Kruskal-Wallis-Test).

In der Gruppe der Typ II Ovarialkarzinome konnten mRNA-Proben von 140 Patientinnen quantifiziert und in die Auswertung aufgenommen werden.

In der univariaten Überlebensanalyse der kontinuierlichen mRNA-Daten mit dem Cox-Regressionsmodell zeigten sich keine Korrelationen der ALDH1A1-mRNA-Expression mit dem Gesamtüberleben (Hazard Ratio 0,893; 95% Konfidenzintervall 0,754-1,059; $p=0,194$) oder dem rezidivfreien Überleben (Hazard Ratio 0,932; 95% Konfidenzintervall 0,820-1,058; $p=0,276$).

Zunächst wurden Kaplan-Meier-Überlebensanalysen bei Unterteilung der Kohorte am Median ($\Delta\Delta C_T=12,265$) durchgeführt. Auch hier konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der ALDH1A1-mRNA-Expression und dem Gesamtüberleben ($p=0,534$) oder dem rezidivfreien Überleben ($n=125$; $p=0,095$; Log-Rang-Test) gefunden werden.

Ferner wurde, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, der optimale Cutoff anhand eines Chi-Quadrat-basierten Tests ermittelt. Für ALDH1A1 lag dieser bei $\Delta\Delta C_T=14,66$. Hiermit waren 129 Fälle (92,1%) ALDH1A1 niedrigexprimierend ($\Delta\Delta C_T \leq 14,66$) und 11 Fälle (7,9%) ALDH1A1 hochexprimierend ($\Delta\Delta C_T > 14,66$). Mit diesem Cutoff konnte eine signifikant positive Korrelation der ALDH1A1-Expression mit dem Gesamtüberleben gefunden werden ($p=0,044$; Abbildung 8A). Keine Korrelation hingegen zeigte sich hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens ($n=125$; $p=0,384$; Log-Rang-Test; Abbildung 8B).

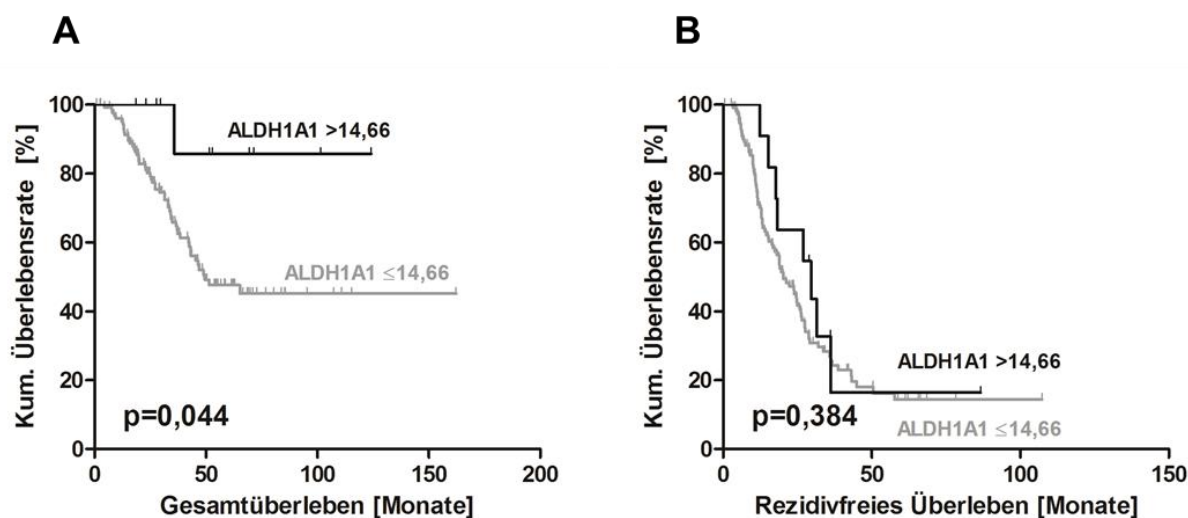


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebensanalysen anhand des optimalen Cutoffs für die ALDH1A1-mRNA-Expression in Typ II Ovarialkarzinomen

Der Cutoff bei $\Delta\Delta C_T=14,66$ entspricht der statistisch signifikantesten Aufteilung der Kohorte. **A** Patientinnen mit einer hohen ALDH1A1-Expression in Typ II Ovarialkarzinom überlebten signifikant länger als Patientinnen mit einer niedrigen ALDH1A1-Expression ($p=0,044$). **B** Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen ALDH1A1 hoch- und niedrigexprimierenden Typ II Ovarialkarzinomen hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens ($n=125$; $p=0,384$; Log-Rang-Test).

Da sich bei einem Cutoff von $\Delta\Delta C_T=14,66$ signifikante Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigten, wurde eine multivariate Analyse mit dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt. Hierbei konnte die Unabhängigkeit der ALDH1A1-mRNA-Expression als prognostischer Marker nicht bestätigt werden (Hazard Ratio 0,233; 95% Konfidenzintervall 0,032-1,708; $p=0,152$). Einziger unabhängiger prognostischer Marker war der Residualtumor (Hazard Ratio 2,502; 95% Konfidenzintervall 1,332-4,697; $p=0,004$).

Bei den gemessenen mRNA-Werten konnten keine signifikanten Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren wie dem Alter ($p=0,090$), pT ($p=0,776$), dem Lymphknotenstatus ($n=118$; $p=0,585$), dem FIGO-Stadium ($p=0,608$) oder dem Residualtumor ($n=105$; $p=0,711$; Mann-Whitney-Test) gefunden werden.

Die ALDH1A1-mRNA-Expression unterschied sich signifikant zwischen Primär- und Rezidivtumoren von 29 Patientinnen, wobei die ALDH1A1-mRNA-Expression in den Rezidivtumoren abnahm ($p=0,003$; T-Test bei gepaarten Stichproben).

3.1.2 ALDH1-Expression auf Proteinebene

Um die prognostische Bedeutung des ALDH1-Proteins im Ovarialkarzinom zu beurteilen, wurden Tumorgewebeproben von insgesamt 178 Patientinnen mittels Immunhistochemie angefärbt. Die Spezifität des hierbei verwendeten Antikörpers konnte im Westernblot bestätigt werden (Abbildung 9).

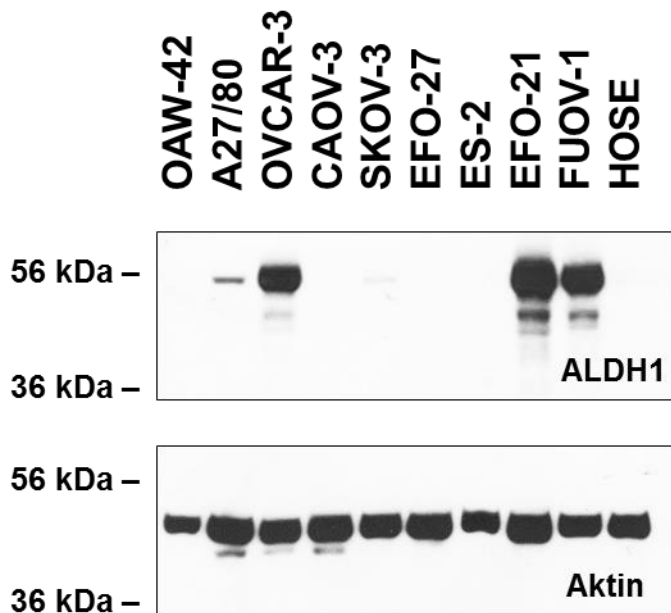


Abbildung 9: Westernblots für den ALDH1-Antikörper

Dargestellt sind der Westernblot für ALDH1 sowie der Westernblot der Ladekontrolle (Aktin). Es zeigte sich eine Bande bei 55 kDa, dem molekularen Gewicht von ALDH1. Als Kontrolle wurde Aktin verwendet, hier zeigte sich jeweils eine kräftige Bande bei 51 kDa.

In ALDH1-exprimierenden Tumoren wurden typischerweise disseminiert liegende Zellen angefärbt. Die ALDH1 Proteinexpression war auf das Zytoplasma einzelner Tumorzellen beschränkt, während die Zellkerne und eine größere Anzahl an Tumorzellen von der Immunfärbung ausgespart blieben (Abbildung 10A). Eine diffuse Färbung des Tumorstromas konnte ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 10B).

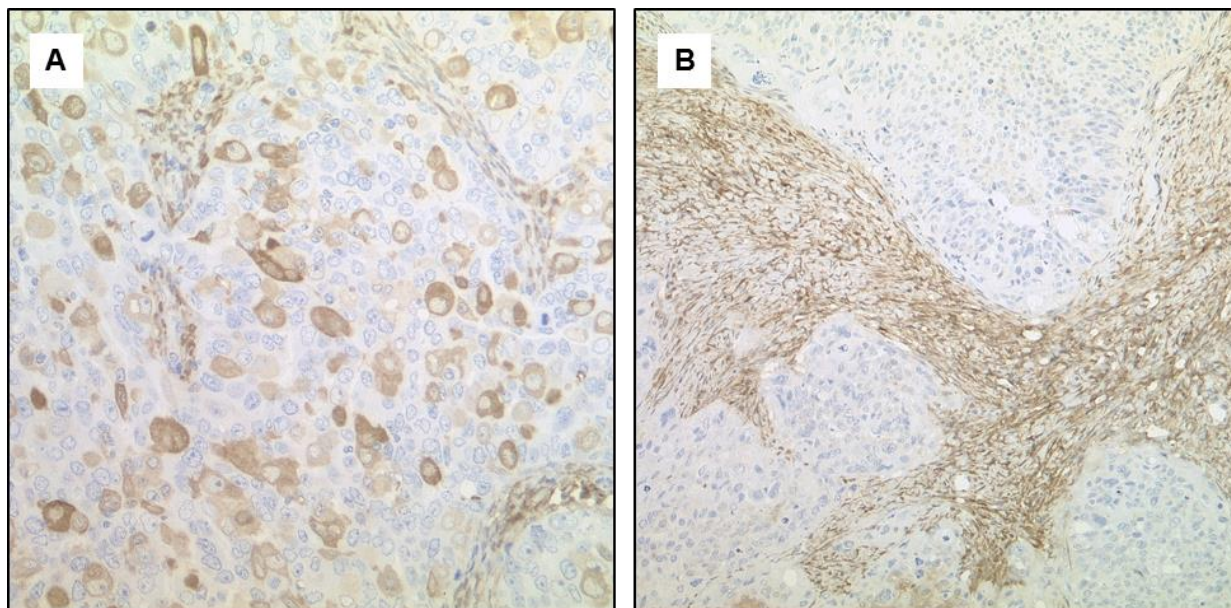


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von ALDH1 im Ovarialkarzinom

A Mosaikartiges Färbemuster: Einzelne Tumorzellen zeigen eine zyttoplasmatische Expression von ALDH1, während benachbarte Tumorzellen keine Expression zeigen, dazwischenliegende zarte Stromastränge weisen eine diffuse Anfärbung auf. **B** ALDH1 negativer Tumor: Die soliden Anteile des Tumors sind komplett negativ für ALDH1, während das dazwischenliegende Stroma eine mäßige immunhistochemische Reaktion zeigt (Vergrößerung 200x).

Von den angefärbten Gewebeproben waren 47 (26,4%) Typ I und 131 (73,6%) Typ II Ovarialkarzinome. Während nur in einem geringen Anteil der Tumoren eine starke ALDH1-Expression nachweisbar war, zeigten 83 Tumoren keine Immunreaktion für ALDH1. Die Verteilung der IRS-Werte ist in Abbildung 11 dargestellt.

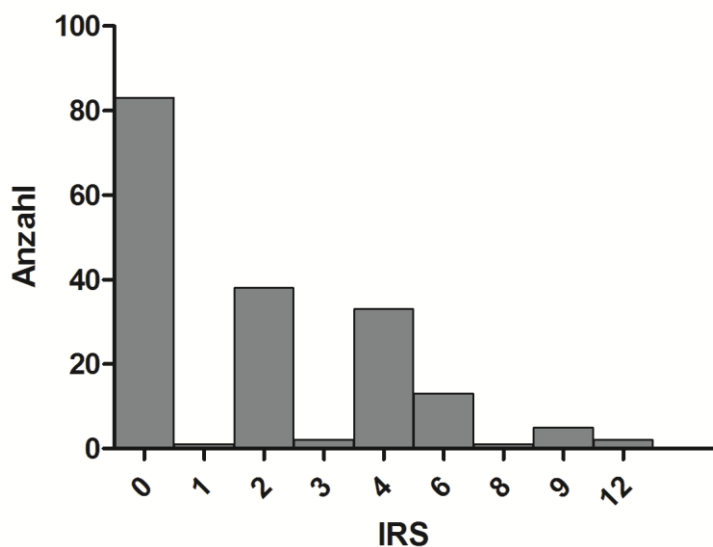


Abbildung 11: Verteilung der IRS-Werte für ALDH1 im Gesamtkollektiv

Gemessene IRS-Werte im Kollektiv reichten von 0-12. Während einige Tumore eine starke ALDH1-Expression zeigten, konnte bei 83 Tumoren keine Anfärbung für ALDH1 gefunden werden.

Bei dem für die Überlebensanalysen und klinisch-pathologischen Korrelationen in Typ II Ovarialkarzinomen gewählten Cutoff (IRS ≤ 3 versus >3) konnten keine signifikanten Unterschiede in der ALDH1-Proteinexpression zwischen Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen beobachtet werden ($p=0,463$; exakter Test nach Fisher) Die ALDH1-Proteinexpression unterschied sich jedoch signifikant in den verschiedenen histomorphologischen Subtypen von Ovarialkarzinomen ($p=0,020$; Chi-Quadrat Test; Abbildung 12B).

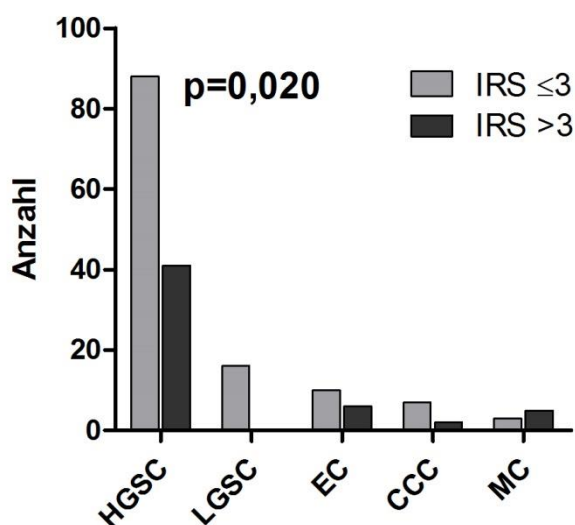


Abbildung 12: ALDH1-Proteinexpression in histomorphologischen Subtypen von Ovarialkarzinomen

Die Höhe der ALDH1-Expression (gruppiert in IRS ≤ 3 versus > 3) unterschied sich signifikant in histologischen Subtypen von Ovarialkarzinomen (HGSC=high grade seröse Ovarialkarzinome, LGSC=low grade seröse Ovarialkarzinome, EC=endometrioides Ovarialkarzinome, CCC=klarzellige Ovarialkarzinome, MC=muzinöse Ovarialkarzinome) ($p=0,020$; Chi-Quadrat-Test).

In der Gruppe der Typ II Ovarialkarzinome konnte die Proteinexpression bei 131 Gewebeproben semiquantifiziert werden. Da die IRS-Verteilungskurve keine Normalverteilung zeigte, wurden verschiedene Cutoffpunkte im Hinblick auf eine prognostische Aussagekraft des ALDH1 Proteins getestet. Bei dem Cutoff IRS ≤ 3 versus IRS > 3 erlangte ALDH1 hinsichtlich des Gesamtüberlebens statistische Signifikanz. Aus diesem Grund wurde die Kohorte für weitere Analysen in eine ALDH1 niedrigexprimierende (IRS ≤ 3 ; $n=89$; 67,9%) und eine ALDH1 hochexprimierende (IRS > 3 ; $n=42$; 32,1%) Gruppe geteilt.

In Kaplan-Meier-Überlebensanalysen zeigte sich hinsichtlich des Gesamtüberlebens, dass Patientinnen mit niedriger ALDH1-Proteinexpression bei einer Gesamtüberlebenszeit von 96,2 (82,3-110,2) Monaten im Mittel signifikant länger überlebten als Patientinnen mit hoher ALDH1-Proteinexpression (Abbildung 13A; mittlere Gesamtüberlebenszeit 72,7 [11,8-49,6] Monate; $p=0,010$; Log-Rang-Test).

Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der ALDH1-Proteinexpression und dem rezidivfreien Überleben ermittelt werden (Abbildung 13B; n=118; p=0,353; Log-Rang-Test).

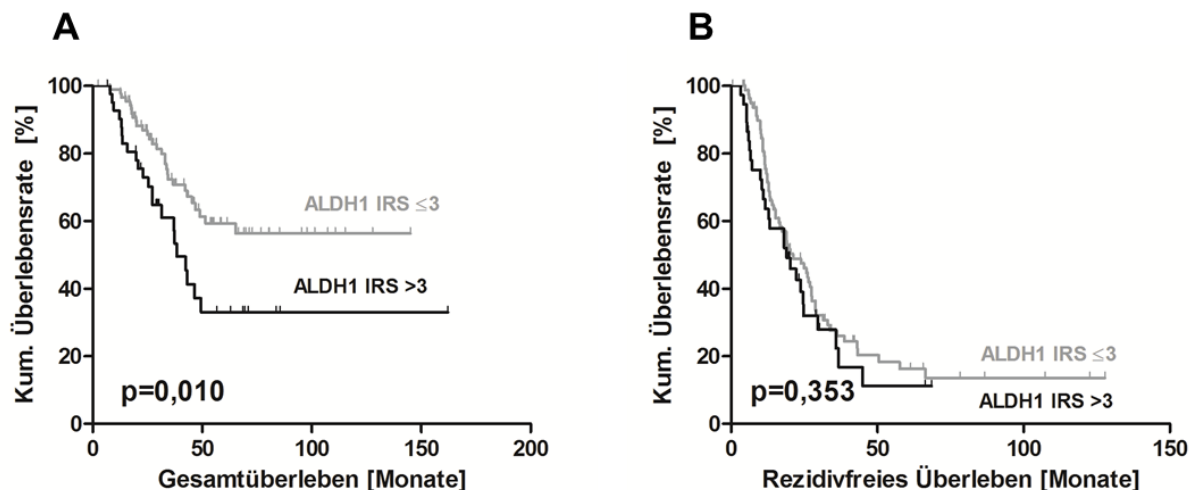


Abbildung 13: Gesamt- und rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der ALDH1 Proteinexpression in Typ II Ovarialkarzinomen

A Patientinnen mit einem ALDH1-niedrigexprimierenden Tumor überlebten signifikant länger als Patientinnen mit einer hohen ALDH1-Expression (p=0,010). **B** Es ergaben sich keine Unterschiede im rezidivfreien Überleben zwischen Patientinnen mit ALDH1-hoch- beziehungsweise niedrigexprimierenden Tumoren (n=118; p=0,353; Log-Rang-Test).

Um die Unabhängigkeit von ALDH1 als prognostischen Marker im Ovarialkarzinom zu überprüfen, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt, welche in Tabelle 5 dargestellt ist. Hierbei konnte die unabhängige prognostische Bedeutung von ALDH1 auf das Gesamtüberleben bestätigt werden. Patientinnen mit einem ALDH1-hochoxprimierenden Tumor hatten ein höheres Risiko, an den Folgen der Erkrankung zu versterben (Hazard Ratio 2,012; 95% Konfidenzintervall 1,030-3,929; p=0,041). Als weiterer unabhängiger prognostischer Faktor konnte der Residualtumor (Hazard Ratio 2,021; 95% Konfidenzintervall 1,045-3,910; p=0,037) bestätigt werden.

Tabelle 5: Multivariate Analyse des prognostischen Einflusses von ALDH1 auf das Gesamtüberleben der Patientinnen

Signifikante Werte sind unterstrichen.

		HR	95%-Konfidenzintervall	p
ALDH1 Protein	IRS ≤3			
	IRS >3	2,012	1,030-3,929	<u>0,041</u>
Alter	pro LJ	1,015	0,985-1,046	0,341
FIGO	I-II			
	III-IV	1,181	0,282-4,946	0,820
Residualtumor	0 cm			
	>0cm	2,021	1,045-3,910	<u>0,037</u>

HR=Hazard Ratio; LJ=Lebensjahr

Korrelationen der gruppierten ALDH1-Proteinexpressionsdaten (IRS ≤3 versus >3) mit klinisch-pathologischen Parametern wie dem Alter der Patientinnen (p=0,454), pT-Stadium (p=0,547), dem Lymphknotenstatus (n=106; p=0,828), dem Ausbreitungsstadium gemäß FIGO (p=0,773) oder dem intraoperativ verbleibenden Tumorrest (n=98; p=0,113; exakter Test nach Fisher) konnten nicht festgestellt werden.

Die Proteinexpression zwischen Primär- und Rezidivtumoren von 29 Patientinnen unterschieden sich nicht signifikant (p=0,430; Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben).

3.1.3 Korrelation zwischen der ALDH1(A1)-mRNA- und Proteinexpression
 Daten zur ALDH1(A1)-mRNA- und Proteinexpression lagen für 156 Patientinnen vor. Im Gesamtkollektiv korrelierten gemessene mRNA- und Proteinwerte (jeweils kontinuierliche Daten) schwach positiv miteinander (Korrelationskoeffizient r=0,171; p=0,032; Spearman-Rho-Test).

3.1.4 Kombinierte ALDH1- und EGFR-Expression

Aufgrund aktueller Publikationen zur ALDH1- und EGFR-Expression im tripel negativen Mammakarzinom [52-54] ergab sich im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die Untersuchung zur kombinierten ALDH1- und EGFR-Proteinexpression in 112 Typ II Ovarialkarzinomen.

Die ALDH1- und EGFR-Expression korrelierte signifikant positiv in Typ II Ovarialkarzinomen ($p < 0,0001$; exakter Test nach Fisher).

In den Kaplan-Meier-Überlebensanalysen mit kombinierten ALDH1 (IRS ≤ 3 versus > 3)- und EGFR (membranöse Expression 0% versus $> 0\%$)-Expressionsdaten zeigten sich signifikante Überlebensunterschiede. Patientinnen mit ALDH1⁻/EGFR⁻-Tumoren ($n=56$) überlebten am signifikant längsten, wohingegen ALDH1⁺/EGFR⁺-Tumoren ($n=26$) die ungünstigsten Verläufe zeigten ($p=0,004$; Log-Rang-Test; Abbildung 14A). Da sich das Gesamtüberleben zwischen ALDH1⁻/EGFR⁺-Tumoren ($n=17$) beziehungsweise ALDH1⁺/EGFR⁻-Tumoren ($n=13$) nicht von dem der ALDH1⁻/EGFR⁻-Tumoren unterschied ($p=0,729$ beziehungsweise $p=0,408$), wurden diese zu einer Gruppe zusammengefasst. In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit nur zwei Gruppen (ein oder beide Marker negativ versus beide Marker positiv) zeigte sich ein hochsignifikanter Überlebensunterschied ($p < 0,0001$; Log-Rang-Test; Abbildung 14B).

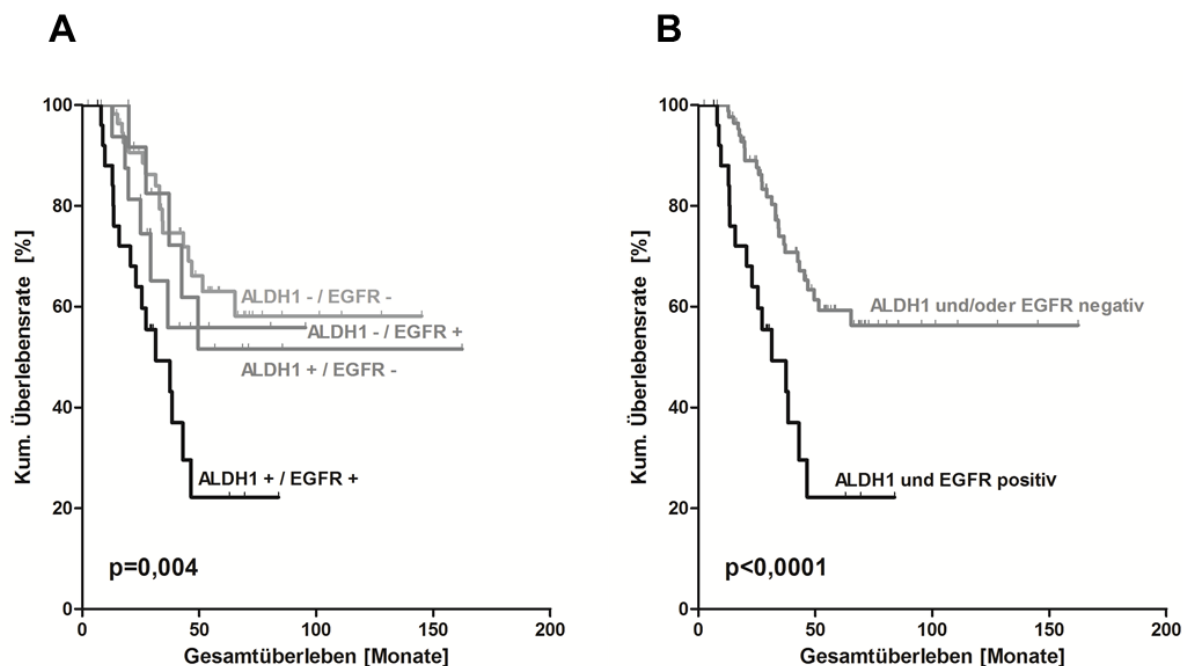


Abbildung 14: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der kombinierten ALDH1- und EGFR-Proteinexpression

A Gesamtüberleben in Abhängigkeit von kombinierter ALDH1- und EGFR Expression: Patientinnen mit ALDH1⁺/EGFR⁺-Tumoren zeigten eine signifikant schlechtere Prognose gegenüber Patientinnen mit einem anderen Expressionsstatus (p=0,004; Log-Rang-Test). **B** Patientinnen mit ALDH1- und EGFR-exprimierenden Tumoren überlebten signifikant kürzer als Patientinnen in deren Tumoren nur einer oder kein Marker exprimiert wurde (p<0,0001; Log-Rang-Test).

In der multivariaten Analyse mit dem Cox-Regressionsmodell konnte die kombinierte ALDH1- und EGFR-Expression als alleiniger unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben bestätigt werden (Hazard Ratio 3,181; 95% Konfidenzintervall 1,444-7,009; p=0,004; Tabelle 6).

Tabelle 6: Multivariate Analyse zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der kombinierten ALDH1- und EGFR-Expression

Signifikante Werte sind unterstrichen.

		HR	95%-Konfidenzintervall	p
ALDH1/EGFR-Kombination	+/-, -/+, -/-			
	+/+	3,181	1,444-7,009	<u>0,004</u>
Alter	pro LJ	1,004	0,966 – 1,043	0,845
FIGO	I-II			
	III-IV	1,154	0,269-4,957	0,847
Residualtumor	0 cm			
	>0cm	1,841	0,884-3,835	0,103

HR=Hazard Ratio; LJ=Lebensjahr

Für das rezidivfreie Überleben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier verschiedenen kombinierten ALDH1- und EGFR-Expressionsgruppen ($p=0,223$; Log-Rang-Test). Bei Analyse der Gruppen mit einem oder beiden Markern negativ versus beiden Markern positiv zeigte sich der Trend für eine kürze Rezidivfreiheit der ALDH1⁺/EGFR⁺-Gruppe gegenüber den übrigen Expressionstypen ($n=99$; $p=0,072$; Log-Rang-Test).

3.2 Thymosin- β 15(A)

3.2.1 TMSB15A-Expression auf mRNA-Ebene

Mittels Sangersequenzierung konnte das PCR-Produkt als der gewünschte 77 bp lange Genbereich des TMSB15A-Gens bestätigt werden.

Die mRNA-Expression von Thymosin- β 15A konnte in 174 Patientenproben bestimmt werden. Hiervon waren 41 (23,6%) Typ I und 133 (76,4%) Typ II Ovarialkarzinome. Der mediane $\Delta\Delta C_T$ -Wert betrug bei den Typ I Ovarialkarzinomen 6,47 und gemessene Werte reichten in dieser Gruppe von 3,23 bis 13,36. Der mediane $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Typ II Ovarialkarzinome betrug 6,44, gemessene Werte reichten von 2,01 bis 12,58. Die

medianen $\Delta\Delta C_T$ -Werte unterschieden sich nicht zwischen Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen ($p=0,949$; Mann-Whitney-Test).

Auch zwischen den histomorphologischen Subtypen von Ovarialkarzinomen unterschied sich die TMSB15A-Expression nicht ($p=0,058$; Kruskal-Wallis-Test).

Es konnten mRNA-Proben von 133 Typ II Ovarialkarzinomen in die Auswertung aufgenommen werden.

In univariaten Überlebensanalysen mit dem Cox-Regressionsmodell konnten keine Korrelationen zwischen den kontinuierlichen TMSB15A-mRNA-Daten und dem Gesamtüberleben (Hazard Ratio 1,051; 95%-Konfidenzintervall 0,914-1,208; $p=0,486$) oder dem rezidivfreien Überleben (Hazard Ratio 0,998, 95%-Konfidenzintervall 0,896-1,111; $p=0,972$) gefunden werden.

Zunächst wurden Kaplan-Meier Überlebensanalysen bei Unterteilung der Kohorte am medianen $\Delta\Delta C_T$ -Wert der Typ II Ovarialkarzinome ($\Delta\Delta C_T$ -Wert $\leq 6,44$ versus $>6,44$) durchgeführt. Mit dieser Einteilung waren 67 Proben niedrig- und 66 hochexprimierend. Hierbei konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der TMSB15A-Expression und dem Gesamtüberleben ($p=0,132$) oder dem rezidivfreien Überleben ($n=119$; $p=0,652$; Log-Rang-Test) festgestellt werden.

Der optimale Cutoff hinsichtlich des Gesamtüberlebens lag in der Gruppe der Typ II Ovarialkarzinome für TMSB15A bei $\Delta\Delta C_T=6,52$. Hiermit wurde die Gruppe in 69 (51,9%) niedrigexprimierende ($\Delta\Delta C_T \leq 6,52$) und 64 (48,1%) hochexprimierende ($\Delta\Delta C_T >6,52$) Tumoren geteilt. Auch mit diesem Cutoff ergaben sich keine signifikanten Korrelationen mit dem Gesamtüberleben ($p=0,130$; Abbildung 15A) oder dem rezidivfreien Überleben ($n=119$; $p=0,624$; Log-Rang-Test; Abbildung 15B) der Patientinnen.

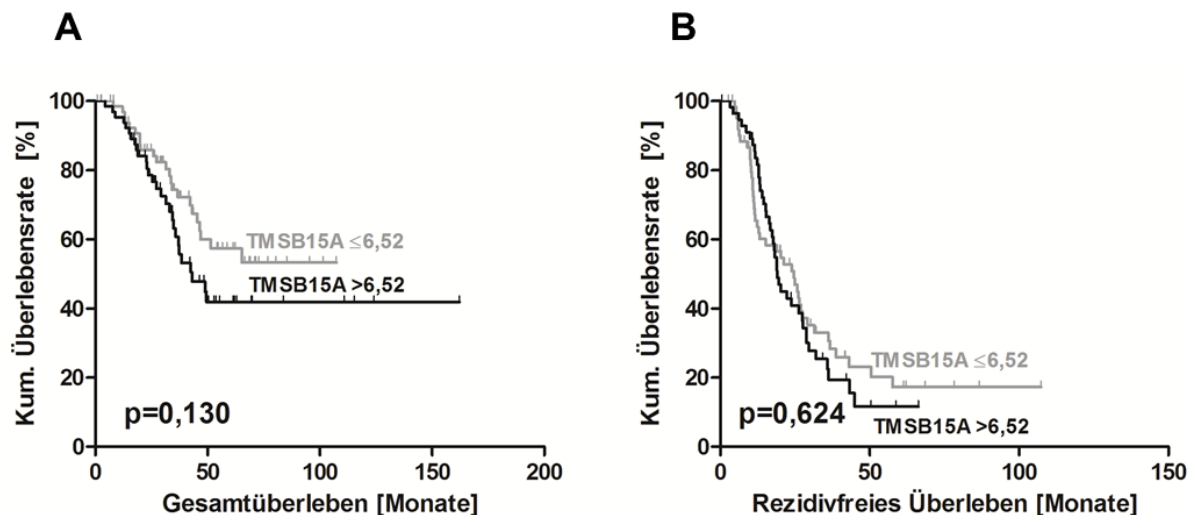


Abbildung 15: Kaplan-Meier Überlebensanalysen anhand des optimalen Cutoffs für die TMSB15A-mRNA-Expression

A Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der TMSB15A-mRNA-Expression ($p=0,130$). **B** Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im rezidivfreien Überleben in Abhängigkeit von der TMSB15A-mRNA-Expression ($n=119$; $p=0,624$; Log-Rang-Test).

Gemessene mRNA-Werte korrelierten nicht mit klinisch-pathologischen Faktoren wie dem Alter ($p=0,219$), dem pT-Stadium ($p=0,090$), dem Lymphknotenstatus ($n=113$; $p=0,243$), der Tumorausbreitung gemäß FIGO ($p=0,636$), oder dem intraoperativ verbliebenen Residualtumor ($n=102$; $p=0,061$; Mann-Whitney-Test).

Die TMSB15A-mRNA-Expression korrelierte nicht zwischen Primär- und Rezidivtumoren der Patientinnen ($n=26$; $p=0,840$; T-Test für gepaarte Stichproben).

3.2.2 TMSB15-Expression auf Proteinebene

Die Detektion von TMSB15 im Westernblot gestaltete sich aufgrund der kleinen Molekülgröße (5 kDa) als schwierig und konnte nicht erfolgen.

Insgesamt konnten 177 Gewebeproben immunhistochemisch für TMSB15 angefärbt und ausgewertet werden. Es zeigte sich eine ausschließlich zytoplasmatische Expression von TMSB15, Zellkerne und das umgebende Stroma blieben von der

Immunfärbung ausgespart. Ein repräsentatives Foto der Immunfärbung ist in Abbildung 16 abgebildet.

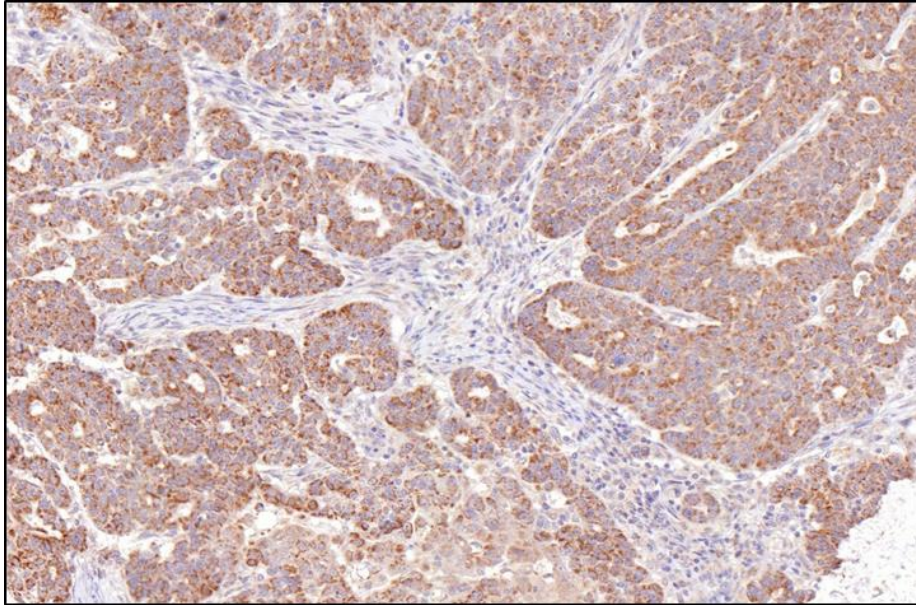


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von TMSB15 im Ovarialkarzinom
Die Immunfärbung für TMSB15 ist auf das Zytoplasma der Tumorzellen beschränkt.
Der Zellkern und das umgebende Stroma bleiben von der Immunfärbung ausgespart
(Vergrößerung 200x).

Die Verteilung der IRS-Werte variierte deutlich im Gesamtkollektiv und ist in Abbildung 17 dargestellt. Gemessene IRS-Werte reichten von 0 bis 12. Die Proteinexpression ($IRS \leq 3$ versus >3) unterschied sich nicht zwischen Typ I ($n=47$) und Typ II ($n=130$) Ovarialkarzinomen ($p=0,864$; exakter Test nach Fisher). Auch unterschied sich die TMSB15-Proteinexpression ($IRS \leq 3$ versus >3) nicht zwischen den verschiedenen histomorphologischen Subtypen von Ovarialkarzinomen ($p=0,545$, Chi-Quadrat-Test).

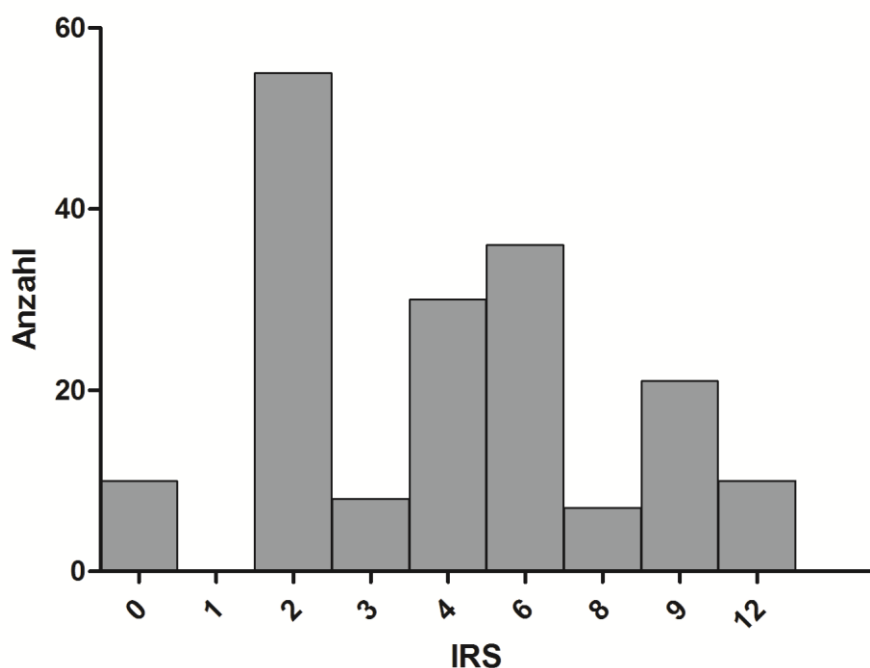


Abbildung 17: Verteilung der IRS-Werte für TMSB15 im Gesamtkollektiv

Die Höhe des Balkens gibt die Anzahl der Tumoren mit gleich hoher Proteinexpression (als IRS-Wert) an.

In Typ II Ovarialkarzinomen konnte die TMSB15-Proteinexpression bei 130 Patientinnen semiquantifiziert werden. Für weitere Analysen wurde die Kohorte in eine niedrigexprimierende ($IRS \leq 3$) und eine hochexprimierende ($IRS > 3$) Gruppe aufgeteilt. Mit dieser Aufteilung waren 53 Tumoren (40,77%) TMSB15 niedrig- und 77 (59,23%) TMSB15-hochexprimierend.

Von den in die Analysen zur TMSB15-Expression eingeschlossenen Patientinnen verstarben 53 an den Folgen der Erkrankung. Hiervon hatte 28 Patientinnen einen TMSB15 niedrig- und 25 Patientinnen einen TMSB15 hochexprimierenden Tumor. Die Kaplan-Meier Überlebensanalysen für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der TMSB15-Proteinexpression sind in Abbildung 18 dargestellt. Es zeigte sich, dass die TMSB15-Proteinexpression einen signifikant günstigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der Patientinnen darstellt. Patientinnen mit einem niedrigexprimierenden Tumor überlebten im Mittel 76,4 (56,4-96,4) Monate, während Patientinnen mit einem hochexprimierenden Tumor mit 94,0 (78,5-109,5) Monaten signifikant länger überlebten ($p=0,029$; Log-Rang-Test; Abbildung

18A). Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von der TMSB15-Expression beobachtet werden ($n=115$; $p=0,273$; Log-Rang-Test; Abbildung 18B).

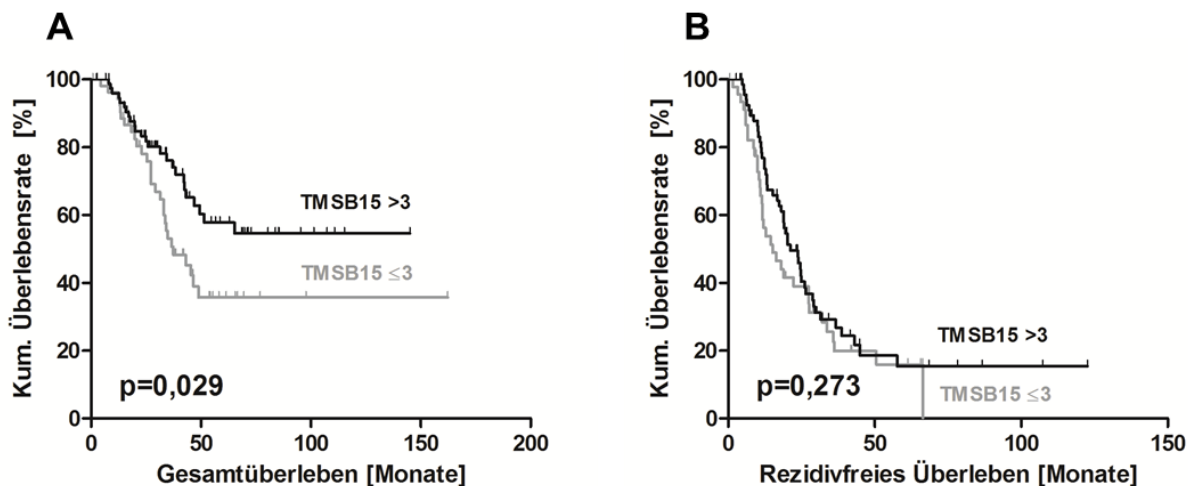


Abbildung 18: Kaplan-Meier Überlebensanalysen in Abhängigkeit von der TMSB15-Proteinexpression

A Patientinnen mit einem hochexprimierenden Tumor überlebten signifikant länger als Patientinnen mit einem niedrigexprimierenden Tumor ($p=0,029$) **B** Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Dauer der Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von der TMSB15-Expression ($n=115$; $p=0,273$; Log-Rang-Test).

Da sich in Abhängigkeit von der TMSB15-Expression ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zeigte, wurde eine multivariate Analyse mit dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt. Die Unabhängigkeit von TMSB15 als Marker für das Gesamtüberleben konnte hierbei nicht bestätigt werden (Hazard Ratio 0,627; 95% Konfidenzintervall 0,326-1,206; $p=0,161$). Als einziger unabhängiger Prognosefaktor konnte der Residualtumor (Hazard Ratio 1,956; 95% Konfidenzintervall 1,027-3,762; $p=0,041$) bestätigt werden.

Die TMSB15 Proteinexpression korrelierte nicht mit klinisch-pathologischen Faktoren wie dem Alter ($p=0,285$), dem pT-Stadium ($p=0,238$), dem Nodalstatus ($n=106$; $p=0,217$), dem Ausbreitungsstadium gemäß FIGO ($p=1,000$), oder dem intraoperativ verbliebenen Residualtumor ($n=95$; $p=0,503$; exakter Test nach Fisher).

Bei 24 Patientinnen lagen Daten sowohl zum Primär- als auch zu einem Rezidivtumor vor. Die Proteinexpression zwischen Primär- und Rezidivtumoren unterschied sich nicht signifikant ($p=0,104$; Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben).

3.2.3 Korrelation zwischen der TMSB15(A)-mRNA- und Proteinexpression
Daten zur TMSB15(A)-mRNA- und Proteinexpression lagen für 149 Patientinnen vor. Gemessene mRNA- und Proteinwerte (jeweils kontinuierliche Daten) korrelierten im Gesamtkollektiv nicht miteinander (Korrelationskoeffizient $r=-0,160$; $p=0,052$; Spearman-Rho-Test)

3.3 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1

3.3.1 PARP1-Expression auf mRNA Ebene

Mittels Sangersequenzierung konnte das entstandene PCR-Produkt als der gewünschte 75 bp lange Genbereich des PARP1-Gens bestätigt werden.

Es konnten mRNA-Proben von 183 Patientinnen in die Auswertung mit aufgenommen werden. Gemessene $\Delta\Delta C_T$ -Werte für PARP1 lagen zwischen 13,43 und 17,34. Die PARP1-mRNA-Expression war in Typ II Ovarialkarzinomen signifikant höher als in Typ I Ovarialkarzinomen ($p=0,039$; Mann-Whitney-Test). Die $\Delta\Delta C_T$ -Wert-Verteilung im Gesamtkollektiv und in Typ I beziehungsweise Typ II Ovarialkarzinomen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: PARP1 mRNA-Expression im Gesamtkollektiv sowie in Typ I beziehungsweise Typ II Ovarialkarzinomen

	n	$\Delta\Delta C_T$-Werte	medianer $\Delta\Delta C_T$-Wert	p (Mann-Whitney)
Gesamt	183	13,42-17,34	15,435	
Typ I	43	13,73-16,66	15,255	0,039
Typ II	140	13,43-17,34	15,480	

Auch in den verschiedenen histomorphologischen Subtypen unterschied sich die PARP1-mRNA-Expression. Gemessene $\Delta\Delta C_T$ -Werte sind in Abbildung 19 dargestellt

und waren am niedrigsten in low grade serösen, am höchsten in klarzelligen Ovarialkarzinomen ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test).

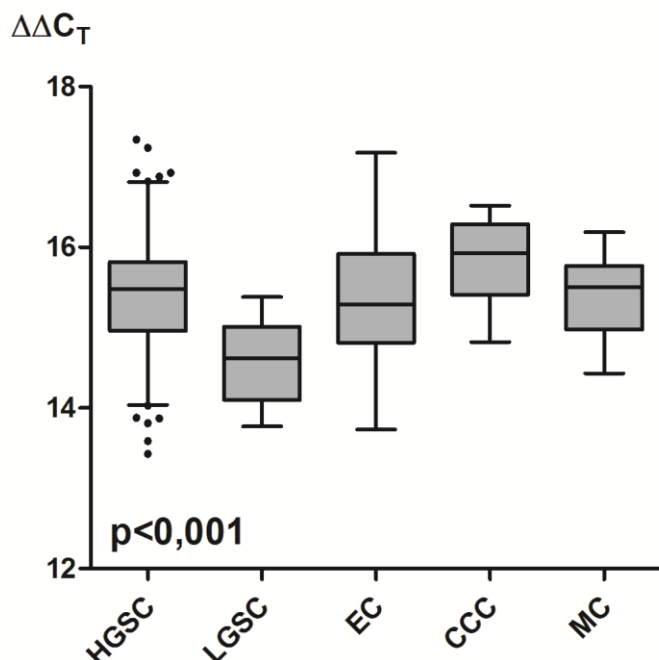


Abbildung 19: Boxplot-Diagramm zur $\Delta\Delta C_T$ -Verteilung von PARP1 in den einzelnen histomorphologischen Subtypen

Die Boxen entsprechen dem Bereich, in dem 50% der $\Delta\Delta C_T$ -Werte der jeweiligen Gruppe liegen, die durchgezogenen Linien zeigen den medianen $\Delta\Delta C_T$ -Wert an. Die Antennen stellen die 5-95%-Perzentile dar. Gemessene $\Delta\Delta C_T$ -Werte waren am niedrigsten bei low grade serösen, am höchsten bei klarzelligen Ovarialkarzinomen (HGSC= high grade seröse Ovarialkarzinome, LGSC=low grade seröse Ovarialkarzinome, EC=endometrioide Ovarialkarzinome, CCC=klarzellige Ovarialkarzinome, MC=muzinöse Ovarialkarzinome) ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test).

Insgesamt konnte die PARP1-mRNA-Expression in Proben von 140 Typ II Ovarialkarzinomen bestimmt werden.

In einer orientierende Überlebensanalyse mit dem Cox-Regressionsmodell konnte für die kontinuierlichen mRNA-Expressionsdaten keine Assoziation mit dem Gesamtüberleben ($n=137$; Hazard Ratio 1,047; 95%-Konfidenzintervall 0,746-1,468;

$p=0,792$) beziehungsweise dem rezidivfreien Überleben ($n=123$; Hazard Ratio 1,018; 95%-Konfidenzintervall 0,782-1,324; $p=0,897$) der Patientinnen gefunden werden.

Bei Kaplan-Meier Überlebensanalysen mit Unterteilung der Kohorte am medianen $\Delta\Delta C_T$ -Wert für Typ II Ovarialkarzinome ($\Delta\Delta C_T \leq 15,48$ versus $>15,48$) waren 71 (50,71%) PARP1-niedrig- und 69 Proben (49,29%) PARP1-hochexprimierende Karzinome. Mediane Überlebenszeiten für das Gesamtüberleben ($p=0,412$) oder das rezidivfreie Überleben ($n=125$; $p=0,628$; Log-Rang-Test) unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

Der optimale Cutoff für das Gesamtüberleben der Patientinnen betrug 15,46. Bei Unterteilung der Kohorte mit diesem Cutoff ($\Delta\Delta C_T \leq 15,46$ versus $>15,46$) waren 68 Proben (48,57%) PARP1-niedrigexprimierend und 72 (51,43%) PARP1-hochexprimierend. Auch mit diesem Cutoff unterschieden sich die medianen Überlebenszeiten für das Gesamtüberleben ($p=0,120$; Abbildung 20A) und das rezidivfreie Überleben ($n=125$; $p=0,346$; Log-Rang-Test; Abbildung 20B) nicht.

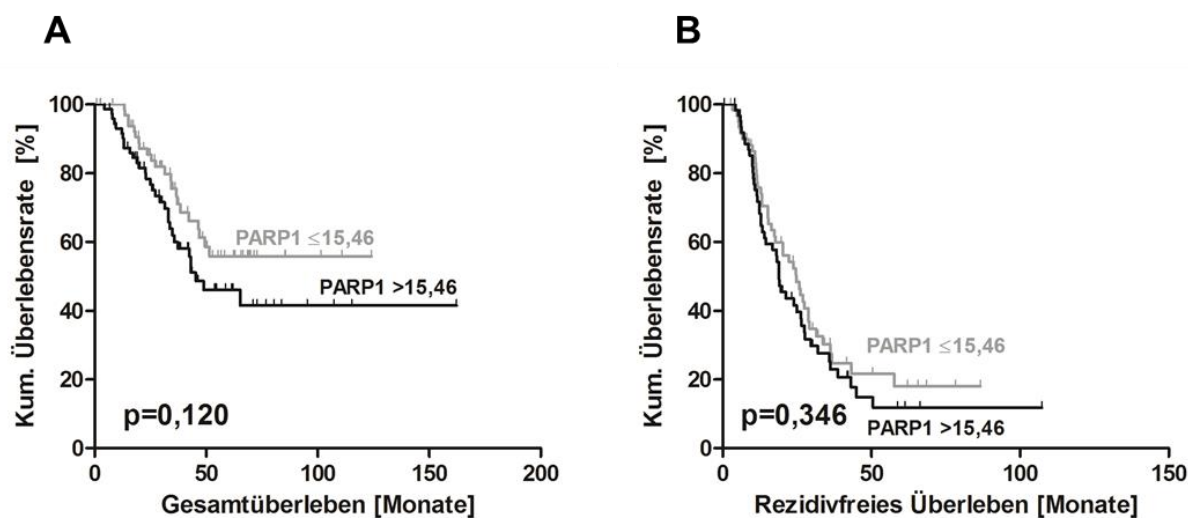


Abbildung 20: Kaplan-Meier Überlebensanalysen in Abhängigkeit von der PARP1-mRNA-Expression anhand des optimalen Cutoffs

A Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben ($p=0,120$).

B Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im rezidivfreien Überleben ($n=125$; $p=0,346$; Log-Rang-Test).

Gemessene $\Delta\Delta C_T$ -Werte für PARP1 korrelierten nicht mit klinisch-pathologischen Faktoren wie dem Alter ($p=0,600$), dem pT-Stadium ($p=0,424$), dem Nodalstatus ($n=118$; $p=0,606$), dem Ausbreitungsstadium gemäß FIGO ($p=0,716$) oder dem Residualtumor ($n=105$; $p=0,534$; Mann-Whitney-Test).

3.3.2 PARP-Expression auf Proteinebene

Die PARP-Proteinexpression konnten an 140 Gewebeproben semiquantifiziert werden.

Die Spezifität des verwendeten PARP-Antikörpers wurde im Westernblot überprüft (Abbildung 21).

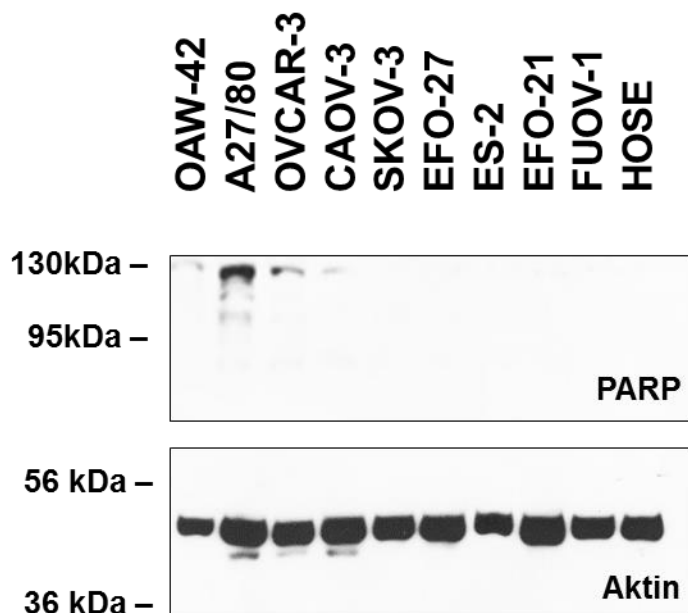


Abbildung 21: Westernblots für den PARP-Antikörper

Dargestellt sind der Westernblot für PARP sowie der Westernblot der Ladekontrolle (Aktin).

Bei der Auswertung fiel auf, dass der verwendete Antikörper sowohl die Zellkerne, als auch das Zytoplasma der Tumorzellen färbte (Abbildung 22). Aus diesem Grund wurden nukleäre und zytoplasmatische PARP-Expression getrennt voneinander bestimmt und ausgewertet.

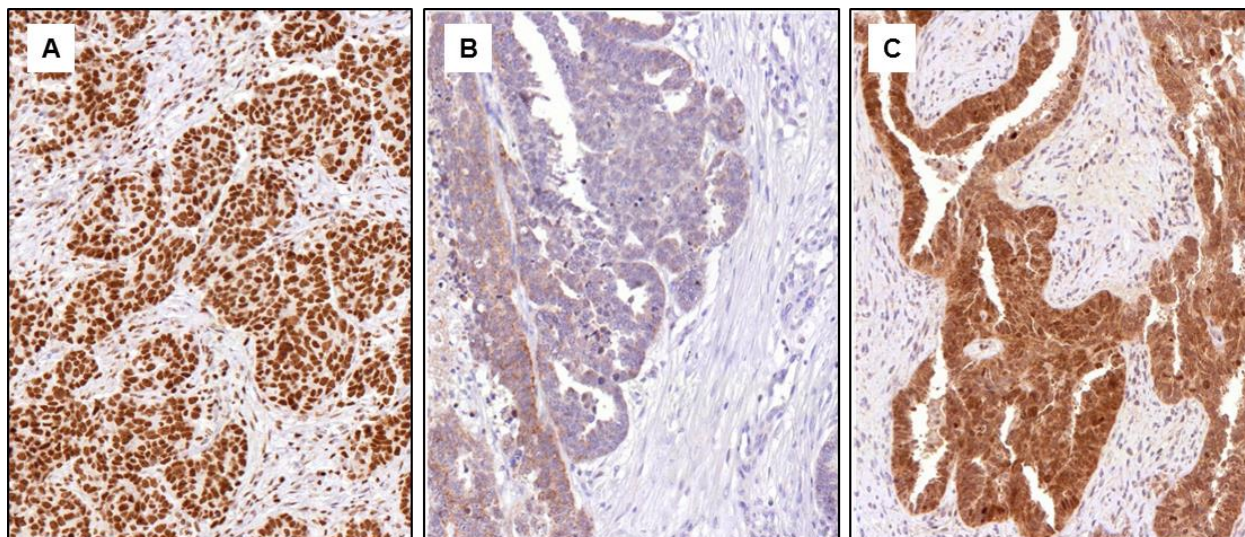


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von PARP im Ovarialkarzinom

A Starke nukleäre PARP-Expression. **B** Schwache zytoplasmatische PARP-Expression. **C** Starke nukleäre und zytoplasmatische PARP-Expression (Vergrößerung 200x).

Die Verteilung der IRS-Werte ist in Abbildung 23 dargestellt. Insgesamt konnte häufiger eine nukleäre PARP-Expression beobachtet werden. Für weitere Analysen zur nukleären PARP-Expression wurde die Gruppe in eine PARP-niedrigexprimierende (IRS ≤ 6) und eine PARP-hochexprimierende Gruppe (IRS > 6) geteilt. Bei einem großen Teil der Tumoren (n=94; 67,1%) konnte keine zytoplasmatische PARP-Expression gefunden werden (IRS=0). Als Cutoff für Analysen zur zytoplasmatischen PARP-Expression wurde daher der IRS 0 versus IRS > 0 gewählt.

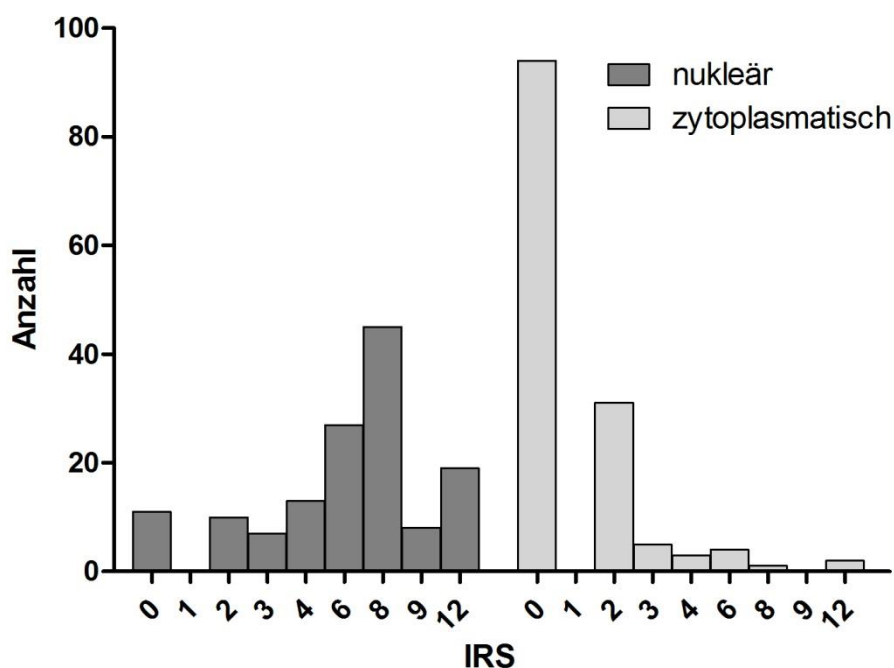


Abbildung 23: Verteilung der IRS-Werte für die nukleäre und zytoplasmatische PARP-Expression im Gesamtkollektiv

Die nukleäre Expression ist dunkelgrau, die zytoplasmatische Expression hellgrau dargestellt. Es zeigte sich insgesamt häufiger eine nukleäre als eine zytoplasmatische PARP-Expression.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der PARP-Proteinexpression zwischen Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen hinsichtlich der nukleären (IRS ≤ 6 versus >6 ; $p=0,849$) oder der zytoplasmatischen (IRS=0 versus >0 ; $p=0,539$; exakter Test nach Fisher) festgestellt werden. Auch unterschieden sich die nukleäre ($p=0,987$) oder die zytoplasmatische ($p=0,705$; Chi-Quadrat-Test) PARP-Expression nicht zwischen den histomorphologischen Subtypen der Ovarialkarzinome.

Bei 104 Typ II Ovarialkarzinomen konnte die PARP-Expression immunhistochemisch bestimmt werden. In Abbildung 24 sind Kaplan-Meier Überlebensanalysen der nukleären (Abbildung 24A und B) beziehungsweise der zytoplasmatischen (Abbildung 24C und D) PARP-Proteinexpression in Typ II Ovarialkarzinomen dargestellt. Ein signifikanter Einfluss der PARP-Proteinexpression (nukleär oder zytoplasmatisch) konnte weder auf das Gesamtüberleben ($p=0,730$ beziehungsweise $p=0,877$) noch auf

das rezidivfreie Überleben (n=92; p=0,742 beziehungsweise p=0,892; Log-Rang-Test) festgestellt werden.

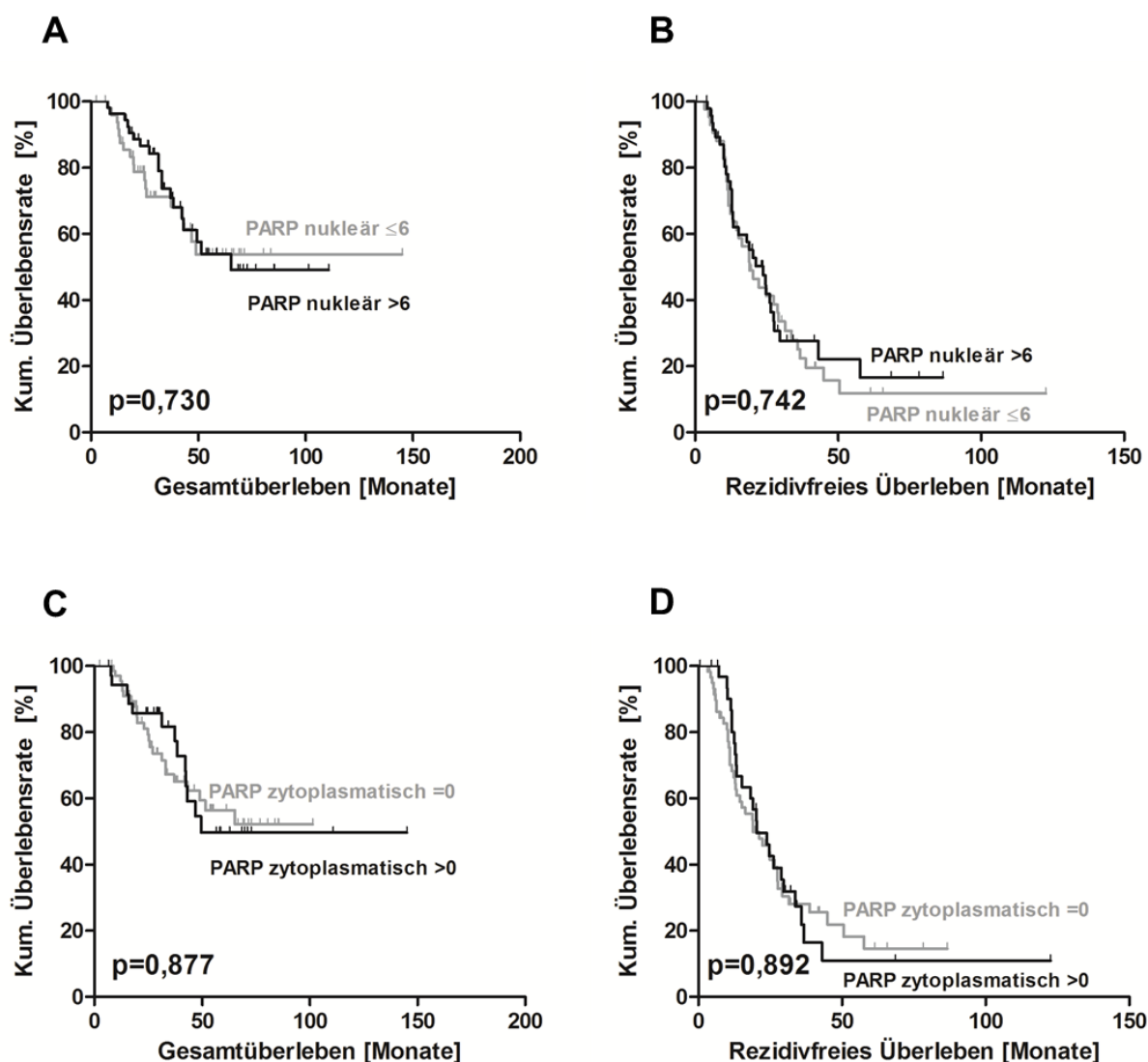


Abbildung 24: Kaplan-Meier Überlebensanalysen in Abhängigkeit von der nukleären beziehungsweise zytoplasmatischen PARP-Proteinexpression

A Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der nukleären PARP-Expression (p=0,730). **B** Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im rezidivfreien Überleben in Abhängigkeit von der nukleären PARP-Expression (n=92; p=0,742). **C** Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen PARP-Expression (p=0,877). **D** Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im rezidivfreien Überleben in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen PARP-Expression (n=92; p=0,892; Log-Rang-Test).

Die nukleäre PARP-Proteinexpression (gruppierte Daten mit IRS ≤ 6 versus >6) korrelierte nicht mit klinisch-pathologischen Faktoren wie dem Alter ($p=0,699$), dem pT-Stadium ($p=0,307$), dem Nodalstatus ($n=89$; $p=0,084$), dem Ausbreitungsstadium gemäß FIGO ($p=0,515$) oder dem intraoperativ verbliebenen Residualtumor ($n=80$; $p=0,159$; exakter Test nach Fisher). Die zytoplasmatische PARP-Proteinexpression (gruppierte Daten mit IRS=0 versus >0) korrelierte ebenfalls nicht mit klinisch-pathologischen Faktoren wie dem Alter ($p=0,411$), dem pT-Stadium ($p=0,492$), dem Nodalstatus ($n=89$; $p=0,266$), dem Ausbreitungsstadium gemäß FIGO ($p=1,000$) oder dem intraoperativ verbliebenen Residualtumor ($n=80$; $p=0,096$; Chi-Quadrat-Test).

3.3.3 PARP(1)-Expression in Primär- und Rezidivtumoren

Die PARP1-Expression unterschied sich signifikant zwischen Primär- und Rezidivtumoren der Patientinnen mit Typ II Ovarialkarzinomen. Die PARP1-mRNA-Expression konnte in Rezidivtumoren von 29 Patientinnen bestimmt werden und stieg signifikant an ($p=0,001$; T-Test für gepaarte Stichproben; Abbildung 25A). Die nukleäre PARP-Proteinexpression konnte bei 21 Rezidivtumoren bestimmt werden und stieg ebenfalls in den Rezidiven an ($p=0,029$; Abbildung 25B). Die zytoplasmatische PARP-Expression hingegen unterschied sich nicht signifikant zwischen Primär- und Rezidivtumor ($p=0,205$; Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben)

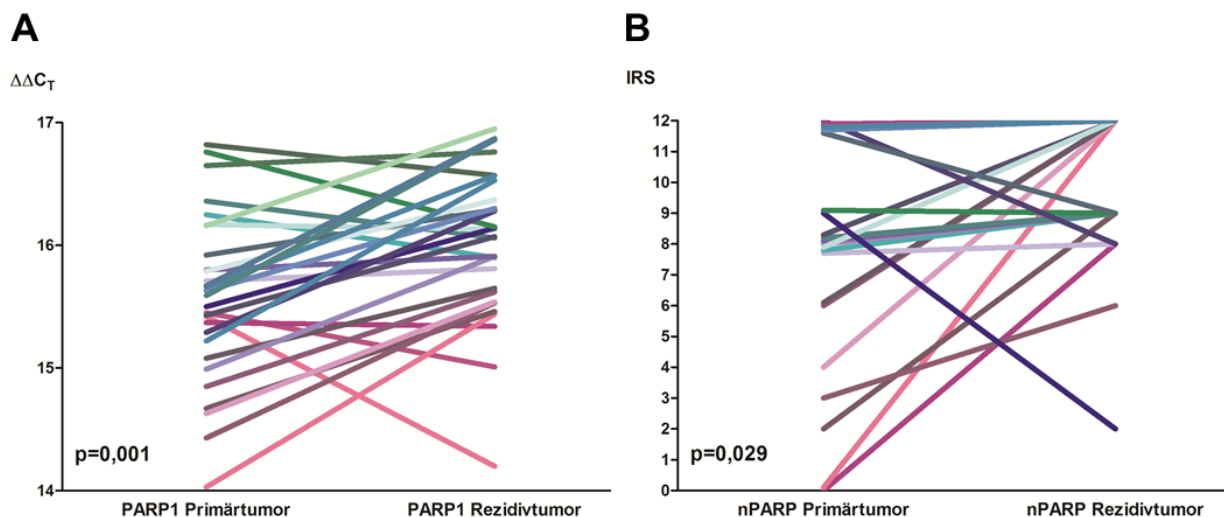


Abbildung 25: PARP1-Expression in Primär- und Rezidivtumor bei Patientinnen mit Typ II Ovarialkarzinomen

A Die PARP1-mRNA-Expression stieg signifikant in den Rezidiven an ($n=29$; $p=0,001$; T-Test für gepaarte Stichproben). **B** Die nukleäre PARP-Expression (nPARP) war in Rezidiven signifikant höher als in den Primärtumoren ($n=21$; $p=0,029$; Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben).

3.3.4 Korrelation zwischen der PARP1-mRNA- und Proteinexpression

Daten zur PARP1-mRNA- und Proteinexpression waren für 132 Patientinnen verfügbar und sind in Abbildung 26 grafisch dargestellt. Im Gesamtkollektiv korrelierten die nukleäre Proteinexpression und die mRNA-Expression positiv miteinander ($r=0,203$; $p=0,020$), während die zytoplasmatische Proteinexpression und die mRNA-Expression eine gegensinnige Korrelation zeigten ($r=-0,193$; $p=0,027$; Spearman-Rho; Abbildung 26).

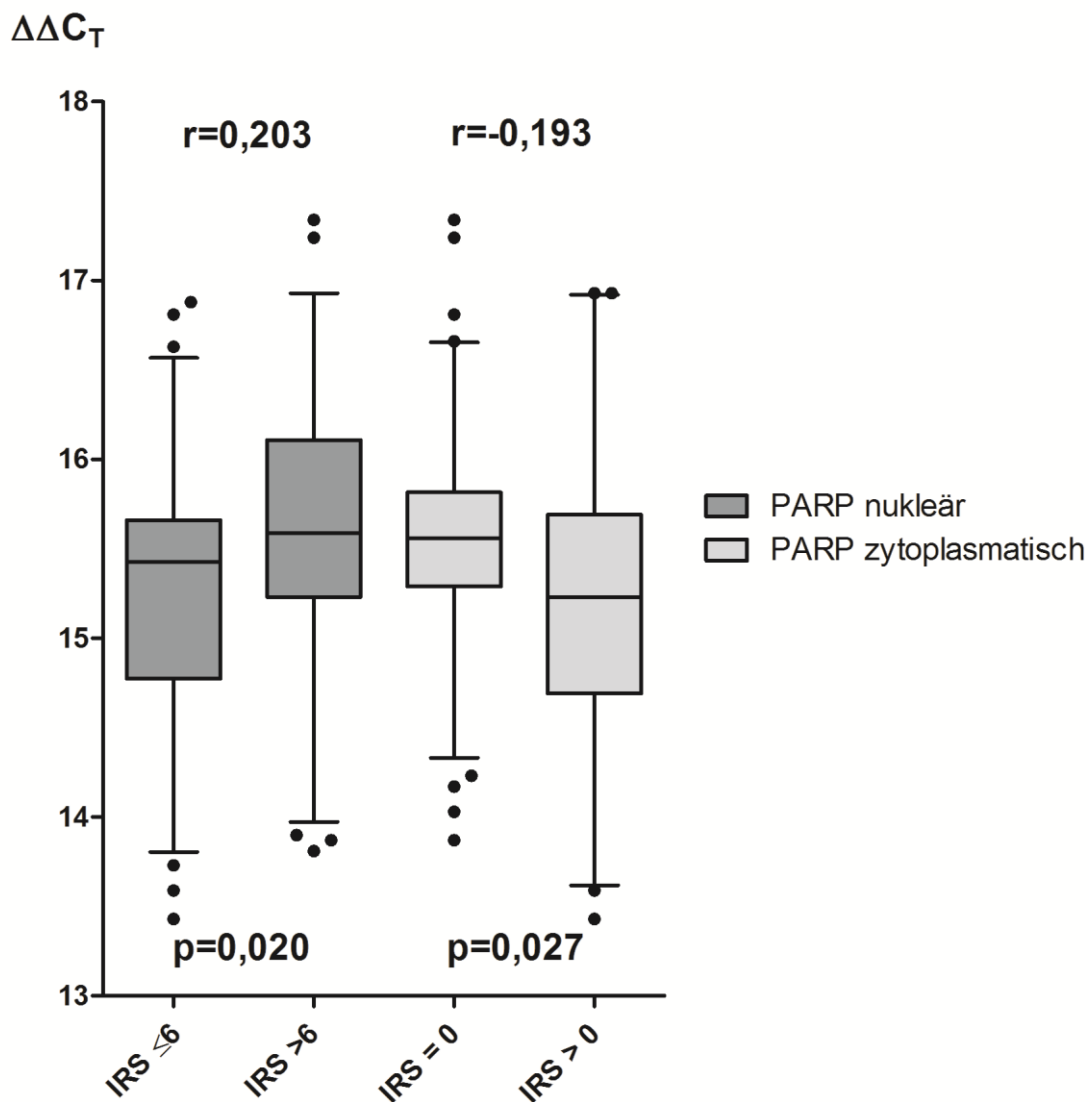


Abbildung 26: Korrelation der PARP1-mRNA- mit der PARP-Proteinexpression

Die Boxen (dunkelgrau für die nukleäre, hellgrau für die zytoplasmatische PARP-Proteinexpression) entsprechen dem Bereich, in dem 50% der $\Delta\Delta C_T$ -Werte der jeweiligen Gruppe liegen, die durchgezogenen Linien zeigen den medianen $\Delta\Delta C_T$ -Wert an. Die Antennen stellen die 5-95%-Perzentilen dar. Während die nukleäre Protein- und die mRNA-Expression positiv miteinander korrelierten ($r=0,203$; $p=0,020$) zeigten die zytoplasmatische Protein- und die mRNA-Expression eine inverse Korrelation ($r=-0,193$; $p=0,027$; Spearman-Rho).

4. Diskussion

4.1 Aldehyddehydrogenase 1 (A1)

4.1.1 ALDH1 als prognostischer Marker auf Proteinebene

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand eines gut charakterisierten Kollektivs gezeigt werden, dass das ALDH1-Protein in Ovariakarzinomen exprimiert wird und einen unabhängigen negativen Prognosefaktor für das Überleben der Patientinnen mit Typ II Ovariakarzinomen darstellt.

Der in dieser Arbeit für die Immunhistologie verwendete ALDH1-Antikörper erzeugte eine ausschließlich zytoplasmatische Anfärbung einzelner Tumorzellen, was im Einklang mit Beobachtungen anderer Studien steht, die denselben ALDH1-Antikörper (clone 44, BD-Biosciences) verwendeten [43, 51]. Zudem konnte übereinstimmend mit den zitierten Studien gelegentlich eine diffuse Anfärbung des Tumorstromas beobachtet werden [43].

Die ALDH1-Expression in high grade serös-papillären Ovariakarzinomen wurde bereits in einer anderen Studie immunhistochemisch untersucht [49]. Bezüglich der ALDH1-Proteinexpression beschrieben Landen und Mitarbeiter hierbei sowohl eine große Schwankungsbreite zwischen den untersuchten Proben, als auch eine heterogene Verteilung innerhalb eines Tumors. In 27,1% der Proben konnte in der zitierten Studie keine ALDH1-Expression nachgewiesen werden, während 28,9% hingegen eine hohe ALDH1-Expression zeigten (21-100% ALDH1-positive Tumorzellen). Dies deckt sich insofern mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, als dass auch hier in einem großen Teil der Typ II Ovariakarzinome (41,22%) keine ALDH1-Expression nachgewiesen werden konnte. Hohe Expressionswerte, quantifiziert mittels des Immunreaktiven Scores, konnten hingegen nur selten verzeichnet werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass in der vorliegenden Arbeit vor allem einzelne, disseminiert liegende Zellen eine immunhistochemische Reaktion auf den ALDH1-Antikörper zeigten, während ein großer Teil der angrenzenden Tumorzellen negativ für ALDH1 war. Diese variable Verteilung ALDH1-positiver Zellen innerhalb von Tumoren wurde ebenfalls von Landen und Mitarbeitern beschrieben. Interessanterweise wurde dort jedoch beobachtet, dass ALDH1 positive Zellen gehäuft in Gruppen zu finden waren, was Grund für den höheren Anteil hochexprimierender Tumore in der Studie sein kann [49].

Die immunhistochemische Expression von ALDH1 sowohl in gesundem Ovargewebe als auch in benignen und malignen epithelialen Tumoren des Ovars wurde in einer Studie von Penumatsa und Mitarbeitern anhand von Großflächenschnitten untersucht. Sie konnten zeigen, dass ALDH1 signifikant niedriger in malignen als in benignen Ovarialtumoren oder normalem Ovarialgewebe exprimiert wurde. Interessanterweise zeigte sich eine zum Teil starke Anfärbung des Oberflächenepithels gesunder Ovarien, weswegen in der zitierten Studie eine physiologische Rolle von ALDH1 im Ovar nicht ausgeschlossen wird [50]. Auch in der eingangs erwähnten Studie von Deng und Mitarbeitern wird eine physiologische Rolle von ALDH1 im Ovar diskutiert. Dort konnte gezeigt werden, dass ALDH1 neben einer physiologisch hohen Expression in Organen des Gastrointestinaltraktes und des Endokriniums auch hohe Expressionslevel im Reproduktionstrakt aufweist. Weiter wurde beobachtet, dass die ALDH1-Enzymaktivität in normalen Oberflächenepithelzelllinien des Ovars höher als in Ovarialkarzinomzelllinien ist [43]. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die ALDH1-Expression in epithelialen Ovarialkarzinomen. Für die Immunhistochemie wurden TMAs verwendet, welche Stenzen aus dem Tumorgewebe enthielten. Gesunde Ovarien und insbesondere das ovarielle Oberflächenepithel, von welchem traditionellerweise angenommen wurde, dass aus diesem Ovarialkarzinome de novo entstehen [13, 14], wurden nicht untersucht. Allerdings ist die Frage nach dem Ursprungsgewebe von Ovarialkarzinomen nicht abschließend geklärt. In neueren Modellen zur Pathogenese von Ovarialkarzinomen wird davon ausgegangen, dass high grade seröse beziehungsweise Typ II Ovarialkarzinome tatsächlich aus dem Tubenepithel entstehen [16].

In der bereits erwähnten Studie von Penumatsa und Mitarbeitern wurde darüber hinaus beobachtet, dass der Anteil ALDH1-positiver Zellen in schlecht differenzierten Karzinomanteilen sehr gering war. Die Autoren mutmaßten hier, dass ein Verlust von ALDH1 zu einer besonders aggressiven Erkrankungsform führe [50]. Dies steht im Widerspruch zu den Überlebensanalysen der vorliegenden Arbeit. Wie im Ergebnisteil beschrieben, war eine hohe Expression von ALDH1 in Typ II Ovarialkarzinomen sowohl univariat als auch multivariat mit einem verkürzten Gesamtüberleben der Patientinnen verknüpft.

Bisherige Studien zur Rolle von ALDH1 als Biomarker für das Überleben der Patientinnen zeigen voneinander abweichende Ergebnisse. In einer Studie wurden 84

epitheliale Ovarialkarzinome untersucht und sowohl uni- als auch multivariat konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit einer hohen ALDH1-Expression (>50% der Tumorzellen) ein kürzeres Gesamtüberleben hatten [48]. Das Risiko, an den Folgen der Erkrankung zu sterben (Hazard Ratio) lag bei 2,43. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die ebenfalls zeigt, dass ALDH1 sowohl uni- als auch multivariat einen unabhängigen Prognosefaktor für das Überleben darstellt. Das Risiko an der Erkrankung zu versterben war auch hier gegenüber ALDH1-negativen Tumoren etwa um den Faktor 2 erhöht. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung von Typ II Ovarialkarzinomen, während in die genannte Studie verschiedene Ovarialkarzinomentitäten miteinbezogen wurden. Gleichwohl gaben die Autoren an, dass eine Subanalyse high grade seröser Ovarialkarzinome ebenfalls statistische Signifikanz erreichte [48].

Deng und Mitarbeiter beobachteten in ihrer Studie von 2010 ebenfalls ein kürzeres Gesamtüberleben und darüber hinaus auch ein kürzeres rezidivfreies Überleben bei Patientinnen mit hoher ALDH1-Expression in serösen Ovarialkarzinomen [43]. Landen und Mitarbeiter konnten an 65 high grade serös-papillären Ovarialkarzinomen im Krankheitsstadium III-IV ebenfalls ein kürzeres rezidivfreies Überleben beobachten. Daneben konnte der Trend zu einem kürzeren Gesamtüberleben bei ALDH1 positiven Tumoren festgestellt werden, der jedoch nicht signifikant war [49]. Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens erlangte ALDH1 in der vorliegenden Arbeit keine statistische Relevanz. Es muss an dieser Stelle allerdings erwähnt werden, dass nicht für alle Patientinnen Follow-Up-Daten für das rezidivfreie Überleben vorhanden waren.

Im Kontrast zu den bisher genannten Studien und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten Chang und Mitarbeiter ein verlängertes Überleben in Abhängigkeit von der ALDH1-Expression beobachten [51]. In dieser Studie wurden Tumorproben von 442 Patientinnen mittels Immunhistochemie angefärbt. Eine hohe ALDH1-Proteinexpression war mit einem längeren Gesamt- und rezidivfreien Überleben verbunden. Außerdem war eine hohe ALDH1-Expression mit einem frühen Erkrankungsstadium (FIGO I) assoziiert. Diese abweichenden Ergebnisse können Folge der unterschiedlichen Studiengruppenkompositionen sein. In die Chang-Kohorte wurden verschiedene histologische Subtypen miteinbezogen und insbesondere eine Korrelation von ALDH1 mit dem endometrioiden Subtyp gefunden. Unsere Studiengruppe hingegen bestand hauptsächlich aus high grade serösen Ovarialkarzinomen. Dies könnte darauf

hindeuten, dass das ALDH1-Protein im Ovarialkarzinom abhängig vom histomorphologischen Typ exprimiert wird. Hierzu passt auch die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass sich die ALDH1-Proteinexpression zwischen high grade serösen, low grade serösen, endometrioiden, klarzelligen und muzinösen Ovarialkarzinomen unterscheidet.

Neben der Einbeziehung unterschiedlicher Ovarialkarzinomentitäten können aber auch Unterschiede im Quantifizierungssystem der Immunfärbung Grund für die uneinheitlichen Ergebnisse sein. Deng und Mitarbeiter [43] verwendeten einen vergleichsweise niedrigen Cutoff und trennten die Studiengruppe bei einem Wert von $\geq 10\%$ ALDH1 positiver Tumorzellen. In den Studien von Landen [49] und Chang [51] wurden ALDH1 positive Tumoren als Tumoren mit $>20\%$ positiven Zellen definiert und Wang und Mitarbeiter [48] wählten mit $<50\%$ versus $>50\%$ positiven Zellen einen vergleichsweise hohen Cutoff. In die Quantifizierung der Immunfärbung für ALDH1 ging in der vorliegenden Arbeit nicht nur der Anteil positiver Tumorzellen, sondern auch die Intensität der Färbung im jeweiligen Tumor mit ein. Daraus resultierend wurde der Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner gebildet und die Kohorte bei einem IRS ≤ 3 versus >3 geteilt.

Nichtsdestotrotz gibt es Hinweise darauf, dass die Quantifizierung von ALDH1 durch immunhistochemische Färbungen Grenzen hat. Die enzymatische Aktivität der Aldehyddehydrogenase kann genutzt werden, um ALDH1-positive Zellen mittels des ALDEFUOR Assays aus verschiedenen Geweben zu isolieren [43]. Interessanterweise wird in der Studie von Deng und Mitarbeitern beobachtet, dass die Proteinexpression mit der Enzymaktivität von ALDH1 korreliert, allerdings wurden weniger enzymatisch aktive Zellen mittels Flowzytometrie detektiert als in der Immunfärbung angefärbt werden konnten [43]. Ähnliches wurde auch von Penumatsa und Mitarbeitern beobachtet. Hier wurde zum einen eine herabgesetzte Enzymaktivität in malignen Ovarialtumoren gefunden, zum anderen aber auch eine generell niedrigere Enzymaktivität als Proteinexpression in den Proben beobachtet [50]. Die Autoren folgerten daraus, dass nicht alle ALDH1-exprimierenden Zellen auch enzymatisch aktiv sind.

Eine Reihe von Studien weisen darauf hin, dass ALDH1 positive Tumorzellen in verschiedenen Malignomen Stammzeleigenschaften besitzen [40, 41, 44, 46].

Beispielsweise zeigten Ginestier und Mitarbeiter, dass ALDH ein geeigneter Marker zur Detektierung von Stammzellen in normalem Brustgewebe und im Mammakarzinom ist [40]. Die Rolle von ALDH1 als potentieller Krebsstammzellmarker in Ovarialkarzinomen ist derzeit Gegenstand der Forschung. In zwei Studien von 2011 wird berichtet, dass Ovarialkarzinomzellen, die ALDH1 und den etablierten Stammzellmarker CD133 exprimieren, Stammzelleigenschaften zeigen, Tumore generieren können und eine erhöhte Chemotherapieresistenz aufweisen. Silva und Mitarbeiter konnten darüber hinaus zeigen, dass ALDH1-positive Zellen allein Tumore in Mäusen generieren konnten. Weitaus größere Tumore wurden in dieser Studie jedoch durch ALDH1+/CD133+ Tumorzellen gebildet [101]. Die zweite Studie zeigte, dass ALDH1 und CD133 positive Zellen dreidimensionale Zellkugeln bilden konnten und dass diese Zellen Stammzellgene exprimierten [102]. Während in dieser Studie keine Assoziationen zu weiteren etablierten Stammzellmarkern gefunden werden konnte, zeigten Wang und Mitarbeiter, dass ALDH1 positive klarzellige Ovarialkarzinomzelllinien mit dem Stammzellmarker CD44, nicht aber mit CD133, assoziiert sind. Ein chemotherapieresistenter Zellklon einer serösen Ovarialkarzinomzelllinie zeigte ebenfalls eine gesteigerte ALDH1-Enzymaktivität gegenüber der ursprünglichen Zelllinie [48]. Auch Landen und Mitarbeiter untersuchten ALDH1 als potentiellen Stammzellmarker in Ovarialkarzinomen. In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass sowohl das ALDH1A1-Gen in taxan- und platinresistenten Zelllinien als auch die ALDH1-Proteinexpression in chemoresistenten Zelllinien gegenüber den normalen Zellklonen hochreguliert war. Darüber hinaus erzeugten ALDH1 positive Zellen, isoliert mittels des ALDEFLUOR Assays, in immunkompromittierten Mäusen wesentlich häufiger und bereits in kleineren Mengen Tumoren als ALDH1 negative Zellen. Durch die Inhibierung von ALDH1 mittels siRNA-Transfektion konnten chemotherapieresistente Zellklone für Chemotherapeutika sensibilisiert werden [49].

Die übereinstimmenden Beobachtungen der genannten Studien bezüglich der Chemoresistenz ALDH1 positiver Tumorzellen sind hochinteressant. Bereits einleitend wurde erwähnt, dass Ovarialkarzinome zwar initial gut auf eine Chemotherapie ansprechen, es im Verlauf aber häufig zu einer Platinresistenz kommt. Eine Anreicherung und Reproduktion chemoresistenter Krebsstammzellen nach erfolgter Chemotherapie könnte dieses Phänomen gut erklären. Um dies zu evaluieren, untersuchten Steg und Mitarbeiter 45 gepaarte Patientenproben vor und nach erfolgter

Chemotherapie. Die chirurgische Entnahme der Rezidivtumoren erfolgte entweder bei Patientinnen, die klinisch ohne Anzeichen eines Rezidives waren, aber aus einem anderem Grund innerhalb von drei Monaten nach Chemotherapie operiert wurden (persistierende Tumoren), bei Patientinnen mit einem Rezidiv mehr als sechs Monate nach erfolgter Chemotherapie (unbehandeltes Rezidiv) oder bei Patientinnen mit einem chemotherapieresistenten Rezidiv (behandeltes Rezidiv). Nach erfolgter Chemotherapie konnte eine dichtere Expression der potentiellen Stammzellmarker ALDH1, CD44 und CD133 beobachtet werden. Am deutlichsten war dieser Expressionsunterschied, insbesondere bei chemotherapieresistenten Rezidiven, für CD133. Im Falle von ALDH1 zeigte sich nur in der Subgruppe der persistierenden Tumoren ein signifikanter Anstieg von 29,7% auf 54,9% positive Zellen. Darüber hinaus wurden 12 Gene, die in Stammzellsignalwege involviert sind, in Rezidivtumoren überexprimiert [103]. Ob ALDH1 tatsächlich ein brauchbarer Marker zur Detektierung potentieller Krebsstammzellen in Ovarialkarzinomen ist, kann anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht geklärt werden. In Rezidivtumoren konnte im Vergleich zu korrespondierenden Primärtumoren eine signifikante Abnahme der ALDH1A1- mRNA-Expression beobachtet werden, jedoch zeigten sich keine Expressionsunterschiede auf Proteinebene. Die Bestimmung konnte allerdings nur bei 29 Rezidivtumoren erfolgen. Die Tatsache, dass ALDH1 einen unabhängigen negativen Prognosefaktor für das Überleben der Patientinnen darstellt, legt jedoch zumindest nahe, dass es sich bei ALDH1-exprimierenden Tumoren um eine aggressive Subgruppe von Ovarialkarzinomen handelt.

4.1.2 ALDH1A1 als prognostischer Marker auf mRNA-Ebene

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Assoziationen zwischen der ALDH1A1-mRNA-Expression und klinisch-pathologischen Faktoren oder dem Überleben der Patientinnen gefunden werden. Unserer Kenntnis nach gibt es bisher eine Studie, die die ALDH1-mRNA-Expression in Ovarialkarzinomen untersuchte. Hierbei wurden mRNA- und Proteinexpression von normalem Ovar, benignen und malignen Ovarialtumoren bestimmt und verglichen. Analog zu ihren immunhistochemischen Untersuchungen beobachteten Penumatsa und Mitarbeiter eine niedrigere ALDH1-mRNA-Expression in malignen ovariellen Tumoren verglichen zu benignen Tumoren oder normalem

ovariellen Gewebe [50]. Alnouti und Mitarbeiter beobachteten ebenfalls eine hohe ALDH1A1 mRNA Expression in gesunden Ovarien von Mäusen [104].

Unter Einbezug eigener Beobachtungen in der Immunhistochemie und den Ergebnissen anderer Studien [43, 51] ist allerdings davon auszugehen, dass ALDH1 auch im Tumorstroma exprimiert wird. Deswegen ist zu vermuten, dass Untersuchungen, bei denen mRNA aus Großflächenschnitten oder Stenzen von Tumoren gewonnen wurde, nicht allein die mRNA Expression im Tumor, sondern gegebenenfalls auch die des Stromas miteinfassen. Eine rückblickende Aussage, inwieweit die gemessene mRNA-Expression die Expression allein in Tumorzellen widerspiegelt und in welchem Maße die Expression des Stromas mitgemessen wurde ist somit nicht mehr möglich. Auch könnten wie von Deng und Mitarbeitern [43] beschrieben, ALDH1⁺ tumorinfiltrierende Leukozyten die in den Proben gemessenen mRNA-Werte für ALDH1A1 erhöht haben.

Die in dieser Arbeit gemessene ALDH1A1 mRNA-Expression unterschied sich signifikant sowohl zwischen Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen als auch zwischen den histomorphologischen Subtypen. Der mediane $\Delta\Delta C_T$ -Wert war in Typ I Ovarialkarzinomen höher als in Typ II Ovarialkarzinomen. Mögliche Gründe hierfür könnte eine verstärkte Stromaexpression von ALDH1 oder die Infiltration durch ALDH1-exprimierende hämatopoetische Zellen in der niedrigmalignen Tumorvariante sein.

4.1.3 ALDH1- und EGFR-Proteinexpression in Typ II Ovarialkarzinomen

Die Analyse der vorliegenden Daten in Kombination mit Ergebnissen einer zuvor veröffentlichten Studie unserer Arbeitsgruppe ergab, dass die ALDH1-Expression stark mit der EGFR-Expression in der Studienkohorte korreliert war. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die kombinierte Expression der Marker ALDH1 und EGFR mit einer besonders schlechten Prognose für Patientinnen mit Typ II Ovarialkarzinomen assoziiert war ‡[105].

‡[105] Liebscher CA, Prinzler J, Sinn BV, Budczies J, Denkert C, Noske A, Sehouli J, Braicu EI, Dietel M, Darb-Esfahani S. *Aldehyde dehydrogenase 1/epidermal growth factor receptor coexpression is characteristic of a highly aggressive, poor-prognosis subgroup of high-grade serous ovarian carcinoma*. Hum Pathol 2013;44(8):1465-71.

Eine Assoziation zwischen ALDH1 und EGFR wurde erstmals in BRCA1-mutierten Brustepithelzellen beschrieben. Burga und Mitarbeiter zeigten, dass ALDH1-positive Brustepithelien stärker proliferierten als ALDH1-negative und dass in diesen Zellen zudem die EGFR-Expression erhöht war. Verschiedene Gene wie p53, EGFR, BRCA1/2 und die Serin-Threonine-Proteinkinase ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) waren ebenfalls in diesen Zellen erhöht, was vermuten lässt, dass es sich bei dieser ALDH1⁺/EGFR⁺/BRCA1⁻ Zellgruppe um Vorläuferzellen BRCA1-mutierter Mammakarzinome handeln könnte [52]. BRCA1-mutierte Mammakarzinome sind zumeist tripel negativ beziehungsweise Karzinome mit Basalzelleigenschaften [106, 107]. Die Arbeitsgruppe um Burga zeigte später, dass EGFR in diesen Zellgruppen auf transkriptionaler Ebene direkt durch BRCA1 reguliert wird und dass eine Suppression von BRCA1 durch siRNA zu einer Erhöhung ALDH1-positiver Zellen führt [53]. Obwohl Burga und Mitarbeiter in beiden Studien ausschließlich Vorläuferzellen von Mammakarzinomen untersuchten, konnte eine andere Arbeitsgruppe auch eine Assoziation zwischen ALDH1 und EGFR in tripel negativen Mammakarzinomen beobachten [54].

Aufgrund ihrer klinischen und molekularen Ähnlichkeiten wäre es deshalb denkbar, dass sich die Beobachtungen der genannten Studien im Mammakarzinom auch auf HGSC ausweiten lassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass, analog zum tripel negativen Mammakarzinom, bei Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression eine erhöhte Anzahl ALDH1-positiver Zellen, möglicherweise Krebsstammzellen, gefunden werden kann. Während BRCA1 und -2 Mutationen, vermutlich aufgrund einer höheren Sensibilität für Chemotherapeutika, günstige prognostische Faktoren in Ovarialkarzinomen sind [108, 109], war die Expression von ALDH1 und EGFR in dieser Arbeit interessanterweise ein Indikator für eine sehr schlechte Prognose. Dies könnte dafür sprechen, dass es sich bei den ALDH1⁺/EGFR⁺-Tumoren um eine besonders aggressive Subgruppe von Ovarialkarzinomen handeln kann, für die alternative und intensiviertere Therapieansätze in Frage kommen.

Der BRCA1-Mutationsstatus der Patientinnen der vorliegenden Studie ist nicht bekannt. Die Betrachtung der ALDH1- und EGFR-Expression im Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom BRCA1-Mutationsstatus wäre dementsprechend ein hochinteressanter Aspekt für folgende Forschungsprojekte.

4.2 Thymosin- β 15(A)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Thymosin- β 15, das möglicherweise in Abläufe der Metastasierung von Karzinomen involviert ist, Einfluss auf die Prognose bei Patientinnen mit ovariellen Typ II Karzinomen hat. Es zeigte sich, dass eine hohe Expression des TMSB15 Proteins ein günstiger prognostischer Faktor für das Überleben der Patientinnen ist.

Thymosine gehören zu den aktinbindenden Proteinen. Im Menschen konnten bisher nur die Thymosine- β 4, - β 10 und - β 15 nachgewiesen werden [63]. TMSB15 ist das bisher am wenigsten erforschte β -Thymosin. Eine Studie an Rattenorganen zeigte, dass die mRNA der Thymosine- β 4 und - β 10 in den meisten Geweben etwa in gleicher Höhe exprimiert wurden, während TMSB15 physiologischerweise nur im Hodengewebe nachweisbar war [64]. Im Zellversuch konnte von einer anderen Arbeitsgruppe hingegen gezeigt werden, dass Thymosin- β 15 in Prostata- (TMSB15A) und Kolonzelllinien (TMSB15B) exprimiert wird [110]. In Malignomen wurde TMSB15 bisher am eingehendsten im Prostatakarzinom untersucht [66, 111-113], darüber hinaus konnte ebenfalls in Melanomzelllinien [64], sowie im Bronchial- [64, 67] und Mammakarzinom [64, 69, 110] eine TMSB15(A)-Expression gezeigt werden. Unserer Kenntnis nach untersucht die vorliegende Arbeit erstmals die TMSB15-Expression in Ovarialkarzinomen. Sowohl das TMSB15 Protein als auch die TMSB15A-mRNA konnte in einem Teil der Ovarialkarzinome nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des verwendeten Antikörpers gegen TMSB15 erfolgte eine ausschließlich zytoplasmatische Anfärbung der Tumorzellen, Zellkerne und das tumorumgebende Stroma zeigten keine Immunreaktion. Dies deckt sich mit den Beschreibungen von Bao und Mitarbeitern, welche TMSB15 im Prostatakarzinom untersuchten. Hier konnte TMSB15 immunhistochemisch ebenfalls im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen werden, während im Stroma keine Anfärbung erfolgte [66].

Während in der vorliegenden Studie anhand von TMAs ausschließlich Stenzen aus malignen Neubildungen des Ovars untersucht wurden, evaluierten Bao und Mitarbeiter auch die TMSB15-Expression in angrenzenden benignen Anteilen der Prostata [66]. Hier konnte die Arbeitsgruppe keine TMSB15-Expression beobachten. Die TMSB15-Expression korrelierte in der zitierten Studie außerdem positiv mit der glandulären Differenzierung der Neoplasien. Karzinome mit höherem Gleasongrad exprimierten

häufiger und stärker TMSB15 als Karzinome mit niedrigem Gleasongrad. In Fällen benigner Prostatahyperplasie fehlte jegliche TMSB15-Expression [66]. In der vorliegenden Arbeit konnten keine TMSB15-Expressionsunterschiede zwischen den besser differenzierten, niedrigmalignen Typ I Ovarialkarzinomen und den schlecht differenzierten, hochmalignen Typ II Ovarialkarzinomen festgestellt werden. Dennoch ist die Beobachtung von Bao und Mitarbeitern, dass sich TMSB15-Expressionslevel zwischen besser und schlechter differenzierten Tumoren einer Entität unterscheiden, hochinteressant. Im Allgemeinen zeigen schlecht differenzierte Karzinome häufig wesentlich aggressiveren Verlaufsformen als gut differenzierte, was unter anderem auf ihre Fähigkeit zur frühen Metastasierung zurückzuführen ist.

Über die Modifikation der Zellmotilität ist TMSB15 darüber hinaus vermutlich in die Metastasierung von Tumoren involviert. Eine Hochregulierung von TMSB15 in hochmotilen Zelllinien konnte von Bao und Mitarbeitern im Prostatakarzinom [66] und später im Mammakarzinom und Melanom [64] gezeigt werden. Durch Einbringen von TMSB15-Antisensevektoren, -Plasmiden oder spezifischer siRNA konnte die Zellmotilität in unterschiedlichen Zelllinien modifiziert werden [66, 67, 110]. Außerdem konnten im Prostatakarzinom in schlecht differenzierten Tumoranteilen einzelne in das Stroma einbrechende stark TMSB15-exprimierende Tumorzellen beobachtet werden [66]. Chakravati und Mitarbeiter beschreiben eine höhere Thymosin- β 15-Expression bei Patienten, die Knochenmetastasen eines Prostatakarzinoms entwickelten. Daneben war die TMSB15-Expression in dieser Studie ein negativ prognostischer Marker für das Gesamtüberleben [111].

Während sich in der vorliegenden Arbeit keine Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern zeigten, war eine erhöhte TMSB15(A)-Expression in einer anderen Studie mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen und schlechter Tumordifferenzierung in Patientenproben von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen verbunden [67].

Die Ergebnisse der bisher genannten Studien legen nahe, dass TMSB15 durch Erhöhung der Zellmotilität in die Metastasierung von Karzinomen involviert ist und somit negativen Einfluss auf die Prognose der Patienten hat. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Ovarialkarzinomen nicht gezeigt werden. Vielmehr war eine hohe TMSB15-Expression zumindest univariat mit einer günstigeren Prognose für die

Patientinnen verbunden. Im rezidivfreien Überleben, also der Zeit bis zum erneuten Auftreten der Krankheit lokal oder fern der ursprünglichen Tumorlokalisation, ergaben sich keine Unterschiede in Abhängigkeit von der TMSB15-Expression.

Als aktinbindendes Protein entfernt TMSB15 Aktin aus dem dynamischen Kreislauf. Bao und Mitarbeiter stellten die Hypothese auf, dass Thymosin- β 15 dadurch die depolymerisierende Phase der Zellmigration fördere und somit zu einer erhöhten Zellmotilität und Metastasierung im Prostatakarzinom beitrage [64]. Banyard und Mitarbeiter mutmaßten, dass eine Überexpression von TMSB15 zu einem veränderten Zytoskelettaufbau mit einer herabgesetzten intrazellulären F-Aktin-Konzentration führe [65]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch vermuten, dass TMSB15 im Ovarialkarzinom eine andere Bedeutung als in Prostatakarzinomen hat. Der Einfluss von TMSB15 auf die Migration von Ovarialkarzinomzellen könnte in Zellkulturassays weiter untersucht werden, wenngleich sich die Bestimmung von TMSB15 im Zellkulturversuch mittels Westernblot in der vorliegenden Arbeit als technisch schwierig gestaltete. Bei TMSB15 handelt es sich um ein Peptid, das aufgrund seiner geringen Größe (5 kDa) während der Elektrophorese nicht im Trenngel gehalten werden konnte. Dieses Problem wird ebenfalls in einer anderen Studie beschrieben [110].

In unserer Arbeitsgruppe wurde die TMSB15A-mRNA-Expression bereits in tripel negativen Mammakarzinomen untersucht. Patientinnen mit hoher mRNA-Expression sprachen in dieser Studie signifikant besser auf eine neoadjuvante Chemotherapie an. [69]. Die Prognose von Ovarialkarzinomen ist stark von dem Ansprechen auf Chemotherapie abhängig. Aus diesem Grund sollte auf der Basis dieser Ergebnisse untersucht werden, ob TMSB15A auch als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf Chemotherapie bei Typ II Ovarialkarzinomen relevant ist. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, die TMSB15A-mRNA-Expression korrelierte nicht mit dem rezidivfreien oder Gesamtüberleben der Patientinnen. Signifikante TMSB15A-Expressionsunterschiede zwischen Typ I oder Typ II Ovarialkarzinomen konnten ebenso wenig festgestellt werden wie Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern. Allerdings beschreiben Banyard und Mitarbeiter zwei verschiedene Gene, TMSB15A und TMSB15B, die für ein identisches Protein TMSB15 codieren. Diese Gene liegen auf unterschiedlichen Stellen des X-Chromosoms und die kodierenden Nukleotidsequenzen stimmen zu 98% überein [65]. In der weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde die differentielle Expression der Gene TMSB15A und TMSB15B in

verschiedenen Karzinomzelllinien beschrieben. Unter anderem wurde auch eine Ovarialkarzinomzelllinie (SKOV-3) untersucht in der TMSB15A und TMSB15B annähernd in gleichen Anteilen exprimiert wurden [110]. Es wäre denkbar, dass trotz der Resultate von Banyard und Mitarbeitern das Gen TMSB15B eine bedeutsamere Rolle in Ovarialkarzinomen spielt. Zu dieser Hypothese würde passen, dass sich in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen der TMSB15-Proteinexpression und der TMSB15A-mRNA-Expression feststellen ließ.

4.3 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten keine Korrelationen zwischen der PARP1-mRNA- oder Proteinexpression und klinisch-pathologischen Faktoren oder dem Überleben von Patientinnen festgestellt werden. Allerdings korrelierte sowohl die PARP1-mRNA- als auch die nukleäre PARP-Proteinexpression zwischen Primär- und Rezidivtumoren von Patientinnen.

Bei der Auswertung der Immunfärbung fiel auf, dass PARP sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch exprimiert wurde. Während eine nukleäre Färbung häufig zu finden war, zeigten nur etwa ein Drittel (32,9%) der untersuchten Ovarialkarzinome eine zytoplasmatische Anfärbung für PARP. Im Vergleich dazu konnte in anderen Karzinomentitäten häufiger eine zytoplasmatische PARP-Expression beobachtet werden. In Projekten, in die unsere Arbeitsgruppe involviert war, konnte unter Verwendung des identischen Antikörpers eine zytoplasmatische PARP-Expression in 83,7% der Pankreaskarzinome [114] und 74,6% der Mammakarzinome [115] beobachtet werden. Im letztgenannten Projekt stellte eine hohe PARP-Expression im Zytoplasma einen negativen prognostischen Marker dar. Interessanterweise zeigten die Patientinnen jedoch ein wesentlich besseres Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie, wengleich die Rolle der zytoplasmatischen PARP bei der Reparatur von DNA-Schäden noch unklar ist. In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sowohl die zytoplasmatische, als auch die nukleäre PARP-Expression in hereditären Mammakarzinomen gegenüber sporadischen erhöht war [116]. Eine zytoplasmatische PARP-Expression in Ovarialkarzinomen wird in der Literatur unserer Kenntnis nach bisher nicht beschrieben.

Während sich im Gesamtkollektiv weder in der nukleären, noch in der zytoplasmatischen PARP-Proteinexpression Unterschiede zwischen Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen zeigten, konnte auf mRNA-Ebene ein signifikanter Expressionsunterschied beobachtet werden. Die PARP-mRNA-Expression war in Typ II Karzinomen höher als in Typ I Ovarialkarzinomen. Denkbar wäre, dass durch die höhere chromosomale Instabilität ovarieller Typ II Karzinome es häufiger zur DNA-Reparatur mittels der homologen Rekombination kommt und somit auch die Aktivität der PARP erhöht ist. In der Literatur wurden PARP-Expressionslevel bisher nicht zwischen Typ I und Typ II Ovarialkarzinomen verglichen, jedoch wird eine Erhöhung der PARP-mRNA in Ovarialkarzinomen gegenüber normalem Ovargewebe beschrieben. Die höchsten PARP-Level konnten in dieser Studie in serös-papillären Adenokarzinomen und malignen Müller-Mischtumoren beobachtet werden [117].

Im Gesamtkollektiv war darüber hinaus die PARP1-mRNA- mit der Proteinexpression korreliert. Während Patientinnen mit hoher nukleärer PARP-Expression im Mittel auch eine hohe mRNA-Expression aufwiesen, zeigte sich bei der zytoplasmatischen PARP-Expression eine inverse Korrelation. Allerdings konnte, wie eingangs erwähnt, nur selten eine zytoplasmatische PARP-Proteinexpression verzeichnet werden, was einen Grund für die gegensinnige Korrelation darstellen könnte.

Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene korrelierte die PARP1-Expression in der vorliegenden Arbeit mit klinisch-pathologischen Parametern. In einer Studie von 2007 konnte jedoch gezeigt werden, dass PARP mit einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (gemäß FIGO) assoziiert war. Darüber hinaus zeigten Patientinnen mit einer hohen PARP-Expression in der genannten Studie einen ungünstigen Krankheitsverlauf [118]. In der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede im progressionsfreien oder im Gesamtüberleben in Abhängig von der PARP-Expression bei Typ II Ovarialkarzinomen festgestellt werden. In einer vergleichbaren Studie, die kürzlich von Gan und Mitarbeitern veröffentlicht wurde, konnte unter Verwendung eines identischen PARP-Antikörpers hingegen gezeigt werden, dass die nukleäre PARP-Proteinexpression mit einer ungünstigen Prognose bei Patientinnen mit HGSC assoziiert ist. In dieser Studie wurde die PARP-Expression zunächst in BRCA1-hochexprimierenden (BRCA intakt) und BRCA1-niedrigexprimierenden (BRCA1 mutiert) HGSC getrennt untersucht, jedoch stellte sich in weiteren Analysen heraus, dass PARP unabhängig von der BRCA1-Expression mit einem kürzeren progressionsfreien und

kürzeren Gesamtüberleben der Patientinnen verbunden war. Darüber hinaus war die PARP-Expression positiv mit einer erhöhten Chemoresistenz der Tumore korreliert [119]. In einer Studie von Godoy und Mitarbeitern hingegen wird PARP mit einem besseren Ansprechen auf eine initiale Chemotherapie assoziiert, während sich keine Unterschiede im progressionsfreien oder Gesamtüberleben der Patientinnen zeigten [120].

Das PARP-Enzym ist Mediator für die Reparatur von DNA-Schäden. Kommt es spontan, durch endogene oder durch exogene Noxen zu einem DNA-Einzelstrangbruch, kann eine PARP-vermittelte Poly(ADP-)Ribosylierung von Histonen, Topoisomerasen und DNA-Polymerasen erfolgen, sodass die DNA-Reparatur mittels des Basenexzisionsreparaturweges stattfinden kann [75]. PARP-Inhibitoren blockieren diesen Reparaturweg, was in gesunden Zellen jedoch keinen Schaden verursacht, da nach der Zellteilung aus dem Einzelstrangbruch ein Doppelstrangbruch resultiert, der mittels homologer Rekombination behoben werden kann [70]. In Zellen mit BRCA1- oder -2-Mutation ist dieser Reparaturweg jedoch defekt, wodurch der Einsatz von PARP-Inhibitoren in vitro und in vivo über die Bildung von Doppelstrangbrüchen zu chromosomaler Instabilität, Zellzyklusarrest und schließlich subsequent zur Apoptose dieser Zellen führt [121]. Das Konzept, dass ein molekularer Defekt für eine Zelle oft tolerabel ist, das gleichzeitige Auftreten zweier molekularer Defekte jedoch für eine Zelle letal ist wird *synthetische Letalität* genannt und stellt einen vielversprechenden Ansatz zur zielgerichteten Tumorthherapie dar [122, 123]. In BRCA-defizienten Malignomen wie tripel negativen Mammakarzinomen und Ovarialkarzinomen befinden sich PARP-Inhibitoren bereits in laufenden klinischen Phase III-Studien [90]. Phase I [85] und II-Studien [86-89] zeigten zum Teil einen Vorteil im progressionsfreien, nicht aber im Gesamtüberleben der Patientinnen. In den genannten Phase I- bis II-Studien erfolgte eine Stratifizierung der Patientinnen zumeist über den BRCA-Mutationsstatus und das Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie, wobei nach wie vor unklar ist, welche Faktoren tatsächlich prädiktiv für den Therapieerfolg sind. Da PARP in der bereits erwähnten Studie von Gan und Mitarbeitern unabhängig vom BRCA1-Status einen negativen Prognosefaktor darstellte, schlugen die Autoren vor, dass die PARP-Expression ein brauchbarer Marker sein könnte um Patientinnen zu identifizieren, die auf eine Therapie mit PARP-Inhibitoren ansprechen könnten [119]. Eine kürzlich veröffentlichte in vitro-Studie zeigte ebenfalls, dass eine Überexpression von PARP in

platinresistenten Bronchialkarzinomzelllinien mit einem erhöhten Ansprechen auf PARP-Inhibitortherapie assoziiert war [124]. Es stellt sich daher die Frage, ob PARP-Inhibitoren auch in Malignomen ohne BRCA-Mutation anwendbar sein könnten. In der vorliegenden Arbeit korrelierte interessanterweise sowohl die PARP1-mRNA- als auch die nukleäre PARP-Proteinexpression positiv zwischen Primär- und Rezidivtumoren der Patientinnen. Nicht bekannt ist, ob bei diesen Patientinnen eine BRCA-Mutation oder eine Platinresistenz vorliegt, jedoch könnte diese Subgruppe der PARP1-hochexprimierenden Ovarialkarzinomrezidive potentiell von einer PARP-Inhibitortherapie profitieren, was in weiteren prospektiven Studien geprüft werden müsste.

4.4 Limitationen der Arbeit

Im folgenden Abschnitt sollen die methodischen und konzeptionellen Einschränkungen dieser Arbeit diskutiert werden.

Die immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit erfolgten ausschließlich auf TMAs. Heterogene Verteilungen eines Markers innerhalb eines Tumors könnten somit teilweise nicht berücksichtigt worden sein. Außerdem kann keine Aussage zur Markerexpression in angrenzenden, gesunden Ovarstrukturen oder dem Tubenepithel der Patientinnen getroffen werden.

Die mRNA-Untersuchungen erfolgten an Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorstanzen und –großflächenschnitten. Obwohl Stanzen direkt aus dem Tumorgewebe entnommen und Großflächenschnitte mit mindestens 50% Tumoranteil verwendet wurden, enthalten die Extrakte auch Nukleinsäuren von nicht-Tumorzellen wie Stroma- oder Entzündungszellen, was Unterschiede in der prognostischen Aussagekraft zwischen mRNA- und Proteinexpression zum Teil erklären könnte. Bei ALDH1 dürfte die durchweg starke stromale Genexpression zu höheren Messwerten in der qRT-PCR im Vergleich zur Immunhistochemie geführt haben. Möchte man lediglich die tumorzelluläre ALDH1-mRNA-Expression erfassen, müssten Verfahren wie die Laser-Mikrodissektion zur Anwendung kommen.

Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Studie. Nicht zu allen Patienten waren aktuelle Überlebensdaten hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens vorhanden, weswegen eine Aussage des prognostischen Wertes der Marker bezüglich

des krankheitsfreien Überlebens nur eingeschränkt möglich ist. Außerdem können durch die retrospektive Erhebung der Ergebnisse zwar Hypothesen generiert werden, jedoch liefern sie keine direkten Beweise zu Kausalzusammenhängen. Eine prospektive Validierung der Ergebnisse zur ALDH1-/EGFR-Expression in einem unabhängigen Kollektiv ist in Planung.

4.5 Ausblick

Bei Ovarialkarzinomen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, für dessen Subgruppen zielgerichtete Therapien wünschenswert wären. Allerdings mangelt es immer noch an verlässlichen Biomarkern, welche Hinweise auf die Prognose oder das Therapieansprechen geben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Biomarker ALDH1(A1), TMSB15(A) und PARP1 hinsichtlich ihres prognostischen Wertes in Ovarialkarzinomen untersucht und die Ergebnisse könnten eine Grundlage für weitere Validierungsstudien darstellen.

Im Falle von PARP1 konnte in dieser Arbeit, im Gegensatz zu anderen Studien, kein Einfluss auf die Prognose von Patientinnen festgestellt werden. In mehreren klinischen Studien wird der Einsatz von PARP-Inhibitoren geprüft, allerdings mangelt es bisher an prädiktiven Markern für das Therapieansprechen. Patientinnen wurden bisher vor allem anhand des BRCA-Mutationsstatus für die Studien stratifiziert, allerdings ist fraglich, ob PARP-Inhibitoren nur in BRCA-defizienten Tumoren wirken. Deswegen könnte in weiteren Studien geprüft werden, ob die PARP1-Expression ein prädiktiver Biomarker für den Therapieerfolg von PARP-Inhibitoren ist.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass der potentielle Krebsstammzellmarker ALDH1 in Typ II Ovarialkarzinomen mit einer schlechten Prognose der Patientinnen verbunden war. Angesichts neuer Modellen zur Ovarialkarzinomentstehung wäre eine Untersuchung der ALDH1-Expression in möglichen Vorläuferläsionen des Ovarialkarzinoms, den serösen intraepithelialen Karzinomen der Tube, sinnvoll und daher ein interessanter Forschungsansatz für zukünftige Studien. Darüber hinaus liefert diese Arbeit Hinweise darauf, dass es sich bei ALDH1- und EGFR-exprimierenden Typ II Ovarialkarzinomen um eine besonders aggressive Subgruppe von Tumoren handelt, für die intensiviertere und alternative Therapien angezeigt sein könnten. Diese Ergebnisse müssten jedoch zunächst in unabhängigen Kohorten validiert werden. Der BRCA-

Mutationsstatus ist in der Patientenkohorte der vorliegenden Arbeit nicht bekannt, allerdings weisen mehrere Studien zum tripel negativen Mammakarzinom darauf hin, dass dieser Phänotyp der ALDH1- und EGFR-exprimierenden Zellen vor allem in BRCA1-defizienten Tumoren angereichert ist. Daher wäre es sinnvoll und hochinteressant diese Validierungsstudien in Kohorten mit bekanntem BRCA-Mutationsstatus durchzuführen.

Literaturverzeichnis

- 1 *Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Auflage*, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, Deutschland, 2012.
- 2 Lax S, Dietel M, Löning T, Böcker W. *Weibliche Geschlechtsorgane - Ovar*. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*, 3. Auflage. München, Deutschland: Elsevier GmbH, 2004:904-918.
- 3 Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls*. Lancet 2008;371(9609):303-14.
- 4 Prat J, Ribe A, Gallardo A. *Hereditary ovarian cancer*. Hum Pathol 2005;36(8):861-70.
- 5 Kurman RJ, Carcangiu, ML, Herrington, CS, Young, RH (Editors), *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*.4th Edition, Lyon, Frankreich: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press. 2014.
- 6 Silverberg SG. *Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal*. Int J Gynecol Pathol 2000;19(1):7-15.
- 7 McCluggage WG. *My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas*. J Clin Pathol 2008;61(2):152-63.
- 8 Kurman RJ, Shih le M. *Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications*. Int J Gynecol Pathol 2008;27(2):151-60.
- 9 Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih le M. *Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma*. J Natl Cancer Inst 2003;95(6):484-6.
- 10 Shih le M, Kurman RJ. *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol 2004;164(5):1511-8.
- 11 McCluggage WG. *Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis*. Pathology 2011;43(5):420-32.

- 12 Bast RC, Jr., Hennesy B, Mills GB. *The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation*. Nat Rev Cancer 2009;9(6):415-28.
- 13 Bell DA, Scully RE. *Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases*. Cancer 1994;73(7):1859-64.
- 14 Feeley KM, Wells M. *Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy*. Histopathology 2001;38(2):87-95.
- 15 Marquez RT, Baggerly KA, Patterson AP, Liu J, Broaddus R, Frumovitz M, Atkinson EN, Smith DI, Hartmann L, Fishman D, Berchuck A, Whitaker R, Gershenson DM, Mills GB, Bast RC, Jr., Lu KH. *Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon*. Clin Cancer Res 2005;11(17):6116-26.
- 16 Kurman RJ, Shih le M. *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol 2010;34(3):433-43.
- 17 Burges A, Schmalfeldt B. *Ovarian cancer: diagnosis and treatment*. Dtsch Arztebl Int 2011;108(38):635-41.
- 18 *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.0*, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (Hrsg.), 2013. AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL, (aufgerufen am 03.05.2014 auf <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>).
- 19 Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. *Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis*. J Clin Oncol 2002;20(5):1248-59.
- 20 Itamochi H, Kigawa J. *Clinical trials and future potential of targeted therapy for ovarian cancer*. Int J Clin Oncol 2012;17(5):430-40.
- 21 Banerjee S, Kaye SB. *New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential*. Clin Cancer Res 2013;19(5):961-8.
- 22 The Cancer Genome Atlas Network. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature 2012;490(7418):61-70.
- 23 Bell D, Berchuck A, Birrer M, J. C, Cramer DW, Dao F, Dhir R, DiSaia P. *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. Nature 2011;474(7353):609-15.

- 24 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature 2001;414(6859):105-11.
- 25 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature 1994;367(6464):645-8.
- 26 Bonnet D, Dick JE. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med 1997;3(7):730-7.
- 27 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res 2003;63(18):5821-8.
- 28 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(7):3983-8.
- 29 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature 2007;445(7123):111-5.
- 30 Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. Cell Stem Cell 2007;1(3):313-23.
- 31 Dean M, Fojo T, Bates S. *Tumour stem cells and drug resistance*. Nat Rev Cancer 2005;5(4):275-84.
- 32 Ozols RF. *Treatment goals in ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer 2005;15 Suppl 1:3-11.
- 33 Vasiliou V, Pappa A, Estey T. *Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism*. Drug Metab Rev 2004;36(2):279-99.
- 34 Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. *Human aldehyde dehydrogenase gene family*. Eur J Biochem 1998;251(3):549-57.
- 35 Duester G. *Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid*. Eur J Biochem 2000;267(14):4315-24.

- 36 Aebi S, Kroning R, Cenni B, Sharma A, Fink D, Los G, Weisman R, Howell SB, Christen RD. *all-trans retinoic acid enhances cisplatin-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma and in squamous head and neck cancer cells.* Clin Cancer Res 1997;3(11):2033-8.
- 37 Zhang D, Holmes WF, Wu S, Soprano DR, Soprano KJ. *Retinoids and ovarian cancer.* J Cell Physiol 2000;185(1):1-20.
- 38 Caliaro MJ, Marmouget C, Guichard S, Mazars P, Valette A, Moisand A, Bugat R, Jozan S. *Response of four human ovarian carcinoma cell lines to all-trans retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid receptor expression.* Int J Cancer 1994;56(5):743-8.
- 39 Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. *Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity.* Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(16):9118-23.
- 40 Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.* Cell Stem Cell 2007;1(5):555-67.
- 41 Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. *Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis.* Cancer Res 2009;69(8):3382-9.
- 42 Ucar D, Cogle CR, Zucali JR, Ostmark B, Scott EW, Zori R, Gray BA, Moreb JS. *Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer.* Chem Biol Interact 2009;178(1-3):48-55.
- 43 Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Butzow R, Coukos G, Zhang L. *Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers.* PLoS One 2010;5(4):e10277.

- 44 Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL. *Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer*. Mol Cancer Res 2009;7(3):330-8.
- 45 Moreb JS, Baker HV, Chang LJ, Amaya M, Lopez MC, Ostmark B, Chou W. *ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells*. Mol Cancer 2008;7:87.
- 46 Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, Chen DT, Tai LK, Yung MC, Chang SC, Ku HH, Chiou SH, Lo WL. *Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer*. Biochem Biophys Res Commun 2009;385(3):307-13.
- 47 Kahlert C, Bergmann F, Beck J, Welsch T, Mogler C, Herpel E, Dutta S, Niemietz T, Koch M, Weitz J. *Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer*. BMC Cancer 2011;11:275.
- 48 Wang YC, Yo YT, Lee HY, Liao YP, Chao TK, Su PH, Lai HC. *ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44 expression, drug resistance, and poor clinical outcome*. Am J Pathol 2012;180(3):1159-69.
- 49 Landen CN, Jr., Goodman B, Katre AA, Steg AD, Nick AM, Stone RL, Miller LD, Mejia PV, Jennings NB, Gershenson DM, Bast RC, Jr., Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK. *Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer*. Mol Cancer Ther 2010;9(12):3186-99.
- 50 Penumatsa K, Edassery SL, Barua A, Bradaric MJ, Luborsky JL. *Differential expression of aldehyde dehydrogenase 1a1 (ALDH1) in normal ovary and serous ovarian tumors*. J Ovarian Res 2010;3:28.
- 51 Chang B, Liu G, Xue F, Rosen DG, Xiao L, Wang X, Liu J. *ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers*. Mod Pathol 2009;22(6):817-23.
- 52 Burga LN, Tung NM, Troyan SL, Bostina M, Konstantinopoulos PA, Fountzilas H, Spentzos D, Miron A, Yassin YA, Lee BT, Wulf GM. *Altered proliferation and differentiation properties of primary mammary epithelial cells from BRCA1 mutation carriers*. Cancer Res 2009;69(4):1273-8.

- 53 Burga LN, Hu H, Juvekar A, Tung NM, Troyan SL, Hofstatter EW, Wulf GM. *Loss of BRCA1 leads to an increase in epidermal growth factor receptor expression in mammary epithelial cells, and epidermal growth factor receptor inhibition prevents estrogen receptor-negative cancers in BRCA1-mutant mice.* Breast Cancer Res 2011;13(2):R30.
- 54 Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA. *Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer.* Br J Cancer 2010;102(2):369-75.
- 55 Noske A, Schwabe M, Weichert W, Darb-Esfahani S, Buckendahl AC, Sehouli J, Braicu EI, Budczies J, Dietel M, Denkert C. *An intracellular targeted antibody detects EGFR as an independent prognostic factor in ovarian carcinomas.* BMC Cancer 2011;11:294.
- 56 Böcker W, Kleinhues P, Höfler HK, Lax S, Poremba C, Moll R. *Allgemeine Tumorpathologie - Invasion und Metastasierung.* In: Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*, 3. Auflage. München, Deutschland: Elsevier GmbH, 2004:196-199.
- 57 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Molekulare Motoren.* In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Stryer Biochemie*, 6. Auflage. München, Germany: Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, 2007:1096-1122.
- 58 Pollard TD, Borisy GG. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.* Cell 2003;112(4):453-65.
- 59 Mannherz HG, Hannappel E. *The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family.* Cell Motil Cytoskeleton 2009;66(10):839-51.
- 60 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Das Cytoskelett.* In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*, 3. Auflage. Weinheim, Deutschland: WILEY-VCH-Verlagsgesellschaft, 2005:607-648.
- 61 Chen C, Li M, Yang H, Chai H, Fisher W, Yao Q. *Roles of thymosins in cancers and other organ systems.* World J Surg 2005;29(3):264-70.
- 62 Sun HQ, Yin HL. *The beta-thymosin enigma.* Ann N Y Acad Sci 2007;1112:45-55.

- 63 Huff T, Muller CS, Otto AM, Netzker R, Hannappel E. *beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions*. Int J Biochem Cell Biol 2001;33(3):205-20.
- 64 Bao L, Loda M, Zetter BR. *Thymosin beta15 expression in tumor cell lines with varying metastatic potential*. Clin Exp Metastasis 1998;16(3):227-33.
- 65 Banyard J, Hutchinson LM, Zetter BR. *Thymosin beta-NB is the human isoform of rat thymosin beta15*. Ann N Y Acad Sci 2007;1112:286-96.
- 66 Bao L, Loda M, Janmey PA, Stewart R, Anand-Apte B, Zetter BR. *Thymosin beta 15: a novel regulator of tumor cell motility upregulated in metastatic prostate cancer*. Nat Med 1996;2(12):1322-8.
- 67 Gu YM, Li SY, Qiu XS, Wang EH. *Elevated thymosin beta15 expression is associated with progression and metastasis of non-small cell lung cancer*. Apms 2008;116(6):484-90.
- 68 Gold JS, Bao L, Ghossoub RA, Zetter BR, Rimm DL. *Localization and quantitation of expression of the cell motility-related protein thymosin beta15 in human breast tissue*. Mod Pathol 1997;10(11):1106-12.
- 69 Darb-Esfahani S, Kronenwett R, von Minckwitz G, Denkert C, Gehrman M, Rody A, Budczies J, Brase JC, Mehta MK, Bojar H, Ataseven B, Karn T, Weiss E, Zahm DM, Khandan F, Dietel M, Loibl S. *Thymosin beta 15A (TMSB15A) is a predictor of chemotherapy response in triple-negative breast cancer*. Br J Cancer 2012;107(11):1892-900.
- 70 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Replikation, Reparatur und Rekombination von DNA*. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle*, 5. Auflage. Weinheim, Deutschland: WILEY-VCH-Verlagsgesellschaft, 2011:293-365.
- 71 Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. *(ADP-ribose)n participates in DNA excision repair*. Nature 1980;283(5747):593-6.
- 72 Chambon P, Weill JD, Mandel P. *Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme*. Biochem Biophys Res Commun 1963;11:39-43.
- 73 Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. *The PARP superfamily*. Bioessays 2004;26(8):882-93.

- 74 Poirier GG, de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, Mandel P. *Poly(ADP-ribose)ylation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure*. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79(11):3423-7.
- 75 D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. *Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions*. Biochem J 1999;342 (Pt 2):249-68.
- 76 Burkle A. *Poly(ADP-ribose)ylation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability*. Cancer Lett 2001;163(1):1-5.
- 77 Fisher AE, Hochegger H, Takeda S, Caldecott KW. *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. Mol Cell Biol 2007;27(15):5597-605.
- 78 Pal T, Permeth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, LaPolla J, Hoffman M, Martino MA, Wakeley K, Wilbanks G, Nicosia S, Cantor A, Sutphen R. *BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases*. Cancer 2005;104(12):2807-16.
- 79 O'Donovan PJ, Livingston DM. *BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair*. Carcinogenesis 2010;31(6):961-7.
- 80 Lakhani SR, Manek S, Penault-Llorca F, Flanagan A, Arnout L, Merrett S, McGuffog L, Steele D, Devilee P, Klijn JG, Meijers-Heijboer H, Radice P, Pilotti S, Nevanlinna H, Butzow R, Sobol H, Jacquemier J, Lyonet DS, Neuhausen SL, Weber B, Wagner T, Winqvist R, Bignon YJ, Monti F, Schmitt F, Lenoir G, Seitz S, Hamman U, Pharoah P, Lane G, Ponder B, Bishop DT, Easton DF. *Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers*. Clin Cancer Res 2004;10(7):2473-81.
- 81 Soegaard M, Kjaer SK, Cox M, Wozniak E, Hogdall E, Hogdall C, Blaakaer J, Jacobs IJ, Gayther SA, Ramus SJ. *BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence and clinical characteristics of a population-based series of ovarian cancer cases from Denmark*. Clin Cancer Res 2008;14(12):3761-7.
- 82 Foulkes WD. *BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis*. Fam Cancer 2006;5(2):135-42.

- 83 Banerjee S, Kaye SB, Ashworth A. *Making the best of PARP inhibitors in ovarian cancer*. Nat Rev Clin Oncol 2010;7(9):508-19.
- 84 Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J. *Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial*. Lancet 2010;376(9737):235-44.
- 85 Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, De Greve J, Lubinski J, Shanley S, Messiou C, A'Hern R, Tutt A, Ashworth A, Stone J, Carmichael J, Schellens JH, de Bono JS, Kaye SB. *Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval*. J Clin Oncol 2010;28(15):2512-9.
- 86 Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N, Lu K, Schmutzler RK, Matulonis U, Wickens M, Tutt A. *Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial*. Lancet 2010;376(9737):245-51.
- 87 Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, Hirte H, Huntsman D, Clemons M, Gilks B, Yerushalmi R, Macpherson E, Carmichael J, Oza A. *Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study*. Lancet Oncol 2011;12(9):852-61.
- 88 Kaye SB, Lubinski J, Matulonis U, Ang JE, Gourley C, Karlan BY, Amnon A, Bell-McGuinn KM, Chen LM, Friedlander M, Safra T, Vergote I, Wickens M, Lowe ES, Carmichael J, Kaufman B. *Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer*. J Clin Oncol 2012;30(4):372-9.
- 89 Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott C, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Macpherson E, Watkins C, Carmichael J, Matulonis U. *Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer*. N Engl J Med 2012;366(15):1382-92.

- 90 Liu JF, Konstantinopoulos PA, Matulonis UA. *PARP inhibitors in ovarian cancer: Current status and future promise*. Gynecol Oncol 2014;133(2):362-369.
- 91 Tsao SW, Mok SC, Fey EG, Fletcher JA, Wan TS, Chew EC, Muto MG, Knapp RC, Berkowitz RS. *Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs)*. Exp Cell Res 1995;218(2):499-507.
- 92 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. *Real time quantitative PCR*. Genome Res 1996;6(10):986-94.
- 93 Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. Nucleic Acids Res 2005;33(20):e179.
- 94 Bohmann K, Hennig G, Rogel U, Poremba C, Mueller BM, Fritz P, Stoerkel S, Schaefer KL. *RNA extraction from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue: a comparison of manual, semiautomated, and fully automated purification methods*. Clin Chem 2009;55(9):1719-27.
- 95 Darb-Esfahani S, Sinn BV, Weichert W, Budczies J, Lehmann A, Noske A, Buckendahl AC, Muller BM, Sehouli J, Koensgen D, Gyorffy B, Dietel M, Denkert C. *Expression of classical NF-kappaB pathway effectors in human ovarian carcinoma*. Histopathology 2010;56(6):727-39.
- 96 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74(12):5463-7.
- 97 Swerdlow H, Gesteland R. *Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing*. Nucleic Acids Res 1990;18(6):1415-9.
- 98 Boenisch T. *Färbemethoden - Detektionssysteme*. In: Boenisch T. *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden*, 3. Auflage. Carpinteria, CA, USA: DakoCytomation Corp., 2003:34-42.
- 99 Remmele W, Stegner HE. *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*. Pathologe 1987;8(3):138-40.

- 100 Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C. *Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization*. PLoS One 2012;7(12):e51862.
- 101 Silva IA, Bai S, McLean K, Yang K, Griffith K, Thomas D, Ginestier C, Johnston C, Kueck A, Reynolds RK, Wicha MS, Buckanovich RJ. *Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival*. Cancer Res 2011;71(11):3991-4001.
- 102 Kryczek I, Liu S, Roh M, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Banerjee M, Mao Y, Kotarski J, Wicha MS, Liu R, Zou W. *Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells*. Int J Cancer 2012;130(1):29-39.
- 103 Steg AD, Bevis KS, Katre AA, Ziebarth A, Dobbin ZC, Alvarez RD, Zhang K, Conner M, Landen CN. *Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer*. Clin Cancer Res 2012;18(3):869-81.
- 104 Alnouti Y, Klaassen CD. *Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice*. Toxicol Sci 2008;101(1):51-64.
- 105 Liebscher CA, Prinzler J, Sinn BV, Budczies J, Denkert C, Noske A, Sehouli J, Braicu EI, Dietel M, Darb-Esfahani S. *Aldehyde dehydrogenase 1/epidermal growth factor receptor coexpression is characteristic of a highly aggressive, poor-prognosis subgroup of high-grade serous ovarian carcinoma*. Hum Pathol 2013;44(8):1465-71.
- 106 Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, Easton DF. *The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2*. J Clin Oncol 2002;20(9):2310-8.
- 107 Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Akslen LA. *Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer*. J Natl Cancer Inst 2003;95(19):1482-5.
- 108 Alsop K, Fereday S, Meldrum C, Defazio A, Emmanuel C, George J, Dobrovic A, Birrer MJ, Webb PM, Stewart C, Friedlander M, Fox S, Bowtell D, Mitchell G.

- 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(21):2654-63.
- 109 Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus SJ, Karlan BY, Lambrechts D, Despierre E, Barrowdale D, McGuffog L, Healey S, Easton DF, Sinilnikova O, Benitez J, Garcia MJ, Neuhausen S, Gail MH, Hartge P, Peock S, Frost D, Evans DG, Eeles R, Godwin AK, Daly MB, Kwong A, Ma ES, Lazaro C, Blanco I, Montagna M, D'Andrea E, Nicoletto MO, Johnatty SE, Kjaer SK, Jensen A, Hogdall E, Goode EL, Fridley BL, Loud JT, Greene MH, Mai PL, Chetrit A, Lubin F, Hirsh-Yechezkel G, Glendon G, Andrulis IL, Toland AE, Senter L, Gore ME, Gourley C, Michie CO, Song H, Tyrer J, Whittemore AS, McGuire V, Sieh W, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A, Levine DA, Steele L, Beattie MS, Chan S, Nussbaum RL, Moysich KB, Gross J, Cass I, Walsh C, Li AJ, Leuchter R, Gordon O, Garcia-Closas M, Gayther SA, Chanock SJ, Antoniou AC, Pharoah PD. *Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer.* Jama 2012;307(4):382-90.
- 110 Banyard J, Barrows C, Zetter BR. *Differential regulation of human thymosin beta 15 isoforms by transforming growth factor beta 1.* Genes Chromosomes Cancer 2009;48(6):502-9.
- 111 Chakravatri A, Zehr EM, Zietman AL, Shipley WU, Goggins WB, Finkelstein DM, Young RH, Chang EL, Wu CL. *Thymosin beta-15 predicts for distant failure in patients with clinically localized prostate cancer-results from a pilot study.* Urology 2000;55(5):635-8.
- 112 Hutchinson LM, Chang EL, Becker CM, Shih MC, Brice M, DeWolf WC, Gaston SM, Zetter BR. *Use of thymosin beta15 as a urinary biomarker in human prostate cancer.* Prostate 2005;64(2):116-27.
- 113 Hutchinson LM, Chang EL, Becker CM, Ushiyama N, Behonick D, Shih MC, DeWolf WC, Gaston SM, Zetter BR. *Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for thymosin beta15, a urinary biomarker of human prostate cancer.* Clin Biochem 2005;38(6):558-71.
- 114 Klauschen F, von Winterfeld M, Stenzinger A, Sinn BV, Budczies J, Kamphues C, Bahra M, Wittschieber D, Weichert W, Striefler J, Riess H, Dietel M, Denkert C.

- High nuclear poly-(ADP-ribose)-polymerase expression is prognostic of improved survival in pancreatic cancer.* Histopathology 2012;61(3):409-16.
- 115 von Minckwitz G, Muller BM, Loibl S, Budczies J, Hanusch C, Darb-Esfahani S, Hilfrich J, Weiss E, Huober J, Blohmer JU, du Bois A, Zahm DM, Khandan F, Hoffmann G, Gerber B, Eidtmann H, Fend F, Dietel M, Mehta K, Denkert C. *Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.* J Clin Oncol 2011;29(16):2150-7.
- 116 Klauke ML, Hoogerbrugge N, Budczies J, Bult P, Prinzler J, Radke C, van Krieken JH, Dietel M, Denkert C, Muller BM. *Higher cytoplasmic and nuclear poly(ADP-ribose) polymerase expression in familial than in sporadic breast cancer.* Virchows Arch 2012;461(4):425-31.
- 117 Ossovskaya V, Koo IC, Kaldjian EP, Alvares C, Sherman BM. *Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types.* Genes Cancer 2010;1(8):812-21.
- 118 Brustmann H. *Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression in serous ovarian carcinoma: correlation with p53, MIB-1, and outcome.* Int J Gynecol Pathol 2007;26(2):147-53.
- 119 Gan A, Green AR, Nolan CC, Martin S, Deen S. *Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression in BRCA-proficient ovarian high-grade serous carcinoma; association with patient survival.* Hum Pathol 2013;44(8):1638-47.
- 120 Godoy H, Mhawech-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Lele S, Odunsi K. *Expression of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase and p53 in epithelial ovarian cancer and their role in prognosis and disease outcome.* Int J Gynecol Pathol 2011;30(2):139-44.
- 121 Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.* Nature 2005;434(7035):917-21.
- 122 Kaelin WG, Jr. *The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy.* Nat Rev Cancer 2005;5(9):689-98.

- 123 Ashworth A. *A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair.* J Clin Oncol 2008;26(22):3785-90.
- 124 Michels J, Vitale I, Galluzzi L, Adam J, Olaussen KA, Kepp O, Senovilla L, Talhaoui I, Guegan J, Enot DP, Talbot M, Robin A, Girard P, Orear C, Lissa D, Sukkurwala AQ, Garcia P, Behnam-Motlagh P, Kohno K, Wu GS, Brenner C, Dessen P, Saparbaev M, Soria JC, Castedo M, Kroemer G. *Cisplatin resistance associated with PARP hyperactivation.* Cancer Res 2013;73(7):2271-80.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Catarina Alisa Kunze, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Aldehyddehydrogenase 1 A1, Thymosin-β15A und Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 als prognostische Marker im Ovarialkarzinom* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Catarina Alisa Kunze geb. Liebscher hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Liebscher CA, Prinzler J, Sinn BV, Budczies J, Denkert C, Noske A, Sehouli J, Braicu EI, Dietel M, Darb-Esfahani S. Aldehyde dehydrogenase 1/epidermal growth factor receptor coexpression is characteristic of a highly aggressive, poor-prognosis subgroup of high-grade serous ovarian carcinoma. Hum Pathol 2013;44(8):1465-71.

Impact Factor 2012: 2,843. Gesamtanteil der Promovendin: 80%

Beitrag im Einzelnen: Die immunhistochemischen Färbungen und Westernblots für ALDH1 wurden durch die Promovendin durchgeführt. Die erhobenen Daten zu ALDH1 sowie der kombinierten Expression von ALDH1 und EGFR wurden durch die Promovendin statistisch analysiert. Alle Abbildungen und Tabellen der Publikation wurden eigenständig durch die Promovendin angefertigt. Die Erstellung des Manuskriptes erfolgte durch die Promovendin.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin
(PD Dr. med. Silvia Darb-Esfahani)

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Originalarbeit

Liebscher CA, Prinzler J, Sinn BV, Budczies J, Denkert C, Noske A, Sehouli J, Braicu EI, Dietel M, Darb-Esfahani S. Aldehyde dehydrogenase 1/epidermal growth factor receptor coexpression is characteristic of a highly aggressive, poor-prognosis subgroup of high-grade serous ovarian carcinoma. Hum Pathol 2013;44(8):1465-71.

Kongressbeitrag (Vortrag)

C. Liebscher, B. V. Sinn, J. Prinzler, J. Budczies, C. Denkert, A. Noske, J. Sehouli, E. I. Braicu, M. Dietel, S. Darb-Esfahani. Die Ko-Expression der Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH1) und des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) kennzeichnet seröse high-grade Ovarialkarzinome mit sehr schlechter Prognose. 97. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. in Heidelberg, 23.-26.05.2013

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Silvia Darb-Esfahani für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas und die herausragende Betreuung und Unterstützung sowohl während sämtlicher Phasen der Dissertation als auch darüber hinaus.

Weiterhin gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe Translationale Tumorforschung: Insbesondere danke ich hier Herrn Prof. Dr. med. Carsten Denkert, der mir als Leiter der AG die Möglichkeit gab in einer angenehmen, gut strukturierten Forschungsgruppe zu promovieren. Ines Koch und Petra Wachs danke ich für die geduldige Einarbeitung in die verschiedenen Labormethoden und die unermüdliche Beantwortung meiner teils „komischen“ Fragen. Meiner Mitdoktorandin Judith Lindner danke ich sowohl für die vielen fachlichen Hinweise, als auch für die ständige Motivation und schöne Zeit im Doktorandenzimmer.

Herrn Prof. Dr. med. Manfred Dietel danke ich für das angenehme Forschungsumfeld, das er als Leiter des Instituts für Pathologie geschaffen hat.

Joanna, danke für das Korrekturlesen in letzter Sekunde und einfach dafür, dass Du da bist. Dir und Albi tausend Dank für alles und vor allem für die Freundschaft!

Markus, danke, dass Du mich immer unterstützt, mir Kraft gibst und mir wenn es sein musste den Rücken freigehalten hast. Mit den vielen kleinen aber nötigen Tritten hast Du dafür gesorgt, dass diese Arbeit fertig wurde!

Zuletzt möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken: Ich danke meinen Brüdern und meinen Eltern, die mich seit ich denken kann in allen Lebenslagen immer unterstützt, mir gleichzeitig den nötigen Freiraum gegeben haben und dadurch in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. Außerdem danke ich meinen Großeltern, insbesondere meinem Großvater Hans, der mein naturwissenschaftliches Interesse geweckt und gefördert und mein Studium immer unterstützt hat. Ihm sei diese Arbeit gewidmet.