

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Frauenklinik am Klinikum rechts der Isar  
Abteilung Gynäkologische Tumorgenetik  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. A. Meindl)

**Validierung prognostisch wichtiger Marker beim Ovarialkarzinom.**

Carl Joschka Moritz Aaron Becker – von Rose

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors für Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Meindl  
2. Priv.-Doz. Dr. A. Schnelzer

Die Dissertation wurde am 21.07.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.06.2016 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
2.1	Epidemiologie des Ovarialkarzinoms .....	6
2.2	Risikofaktoren .....	7
2.3	Symptome.....	7
2.4	Diagnostik .....	8
2.5	Stadieneinteilung .....	8
2.6	Therapie.....	9
2.7	Prognose .....	9
2.8	Biomarker als neue Hilfsmittel zur Prognoseabschätzung und Möglichkeit der personalisierten Therapie .....	10
2.9	Stand von Biomarkern beim Ovarialkarzinom .....	10
2.10	HOMER2 .....	11
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>Material &amp; Methoden.....</b>	<b>14</b>
4.1	Klinisch-pathologische Merkmale der Tumorproben, die für die qPCR verwendet wurden. ....	14
4.2	Klinisch-pathologische Merkmale der Tumorproben, die für die Herstellung des TMAs verwendet wurden. ....	15
4.3	qPCR .....	16
4.3.1	Prinzip der quantitativen PCR (qPCR) .....	17
4.3.2	Prinzip des relativen Verhältnisses der Proben zu einander .....	18
4.4	Immunhistochemie.....	18
4.4.1	Konstruktion eines Tissue Microarrays (TMA).....	19
4.4.2	Anfertigung von Schnitten .....	21
4.4.3	Vorbehandlung der Schnittpräparate .....	22
4.4.4	Antigendemaskierung (Antigenretrieval) .....	23
4.4.4.1	Methode 1 .....	23
4.4.4.2	Methode 2 und 3 .....	24
4.4.5	Immunhistochemische Färbung (Nachweis des HOMER2-Proteins mittels eines HOMER2-spezifischen Antikörpers und dem DAKO REAL Detection System).....	25
4.4.6	Kernfärbung, Dehydrierung und Einbettung.....	27
4.5	Statistische Auswertung.....	29

<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.6 HOMER2 mRNA Expressionsanalyse mittels qPCR .....	31
4.7 Korrelationsanalyse der Illumina-Chip-Daten mit den qPCR-Daten.....	32
4.8 Assoziation der <i>HOMER2</i> mRNA-Expression mit dem Gesamtüberleben und der Zeit bis zum Rezidiv mittels Kaplan-Meier-Analysen .....	33
4.9 Validierung der Assoziation zwischen der HOMER2-Expression und dem Überleben der Patientinnen an einem größeren, unabhängigen Kollektiv ..	35
4.10 Etablierung eines Tissue Micro Arrays (TMAs) .....	38
4.11 Identifizierung eines HOMER2-spezifischen Antikörpers.....	39
4.12 Assoziation der HOMER2-Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Merkmalen .....	42
4.13 Assoziation der HOMER2-Expression auf Proteinebene mit dem Gesamtüberleben und der Zeit bis zum Rezidiv mittels Kaplan-Meier- Analysen .....	45
4.14 Multivariable Cox-Regressions-Analysen bzgl. des Gesamtüberlebens auf Proteinebene .....	46
4.15 Multivariable Cox-Regressions-Analysen bzgl. des rezidivfreien Überleben auf Proteinebene .....	48
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>7 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>8 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
<b>10 Internetverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>11 Lebenslauf.....</b>	<b>81</b>
<b>12 Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>13 Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>83</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AK	Antikörper
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy DNA
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CTx	Chemotherapie
DR	Death-receptor
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
evtl.	eventuell
FIGO	Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique
H&E	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunhistochemie
dNTP(s)	deoxy-nucleotide-triphosphates (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
GFR	Growth Factor Receptors
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	didestilliertes Wasser
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
N	Normalität
n	Anzahl
ng	Nanogramm
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI3K-AKT	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Proteinkinase B
POX	Peroxidase
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
TNM	Facettenklassifikation aus T = Tumor, N = Lymphknoten, M = Metastasen
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
u	unit
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

## 2 Einleitung

### 2.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom entsteht durch verschiedene maligne Veränderungen. Ovarialkarzinome unterteilt man histologisch in epitheliale Tumoren (65-70 %), Keimzelltumoren (15-20 %), Keimstrang-Stroma-Tumoren (5-10 %) und Metastasen des Ovars (5 %) [28]. Die Inzidenz liegt für Nordeuropa bei 12 pro 100.000 und für Südeuropa bei 17 pro 100.000 Frauen [b]. Datenerhebungen haben ergeben, dass weltweit ca. 200.000 Frauen pro Jahr an einem bösartigen Ovarialtumor erkranken und ca. 125.000 versterben [64]. Nach Datenerhebungen der SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) sind 2013 in den USA ca. 22.240 Neuerkrankungen des Ovarialkarzinoms aufgetreten. Dies entspricht einem Anteil von 1,3 % aller neu aufgetretenen Tumorerkrankungen in den USA. Weiter geht die SEER für 2013 von 14.030 an einem Ovarialkarzinom verstorbenen Frauen aus. Dies bedeutet: 2,4 % aller an einem Tumor verstorbenen Frauen litten an einem Ovarialkarzinom [f]. Im Jahr 2008 waren in Deutschland 3,5 % aller Krebsneuerkrankungen der Frauen ein Ovarialkarzinom [a]. Deutschlandweit ist nach dem Brustkrebs, dem Lungenkrebs, dem Kolorektalkarzinom und dem Bauchspeicheldrüsenkrebs, das Ovarialkarzinom die fünfthäufigste Krebstodesursache [a]. Das Ovarialkarzinom ist der zweithäufigste bösartige Genitaltumor nach dem Endometriumkarzinom. Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms scheint jedoch in Deutschland in den vergangenen Jahren rückläufig zu sein. Während im Jahre 2006 noch 9.670 Frauen an einem Ovarialkarzinom erkrankt waren, waren es 2008 7.790 Frauen und nach dem Zentrum für Krebsregisterdaten waren es nur noch 7.200 Frauen im Jahre 2012 [24]. Dies bedeutet für 2012 einen Anteil von 5,6 % aller weiblichen Krebssterbefälle und einen Anteil von 3,5 % aller malignen Neubildungen in Deutschland. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren und die relative 5-Jahres-Überlebensrate eines Ovarialkarzinomes liegt bei unter 40 %, was verglichen zu anderen malignen Krebserkrankungen niedrig ist. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist u.a. deshalb schlechter, da die Diagnosen des Ovarialkarzinoms zu 70 % in einem fortgeschritten Stadium (FIGO IIB-IV) gestellt werden [12]. 60 % der Diagnosen werden erst im Stadium T3 gestellt, dagegen stehen nur 29 %, die im Stadium T1 diagnostiziert

werden [d]. Die Tatsache, dass die Diagnosen in der Mehrzahl der Fälle erst im Stadium T3 und T4 gestellt werden und die schlechten Überlebensraten des Ovarialkarzinoms gegenüber anderen malignen Tumorerkrankungen machen die Suche nach prognostischen Markern sinnvoll und wichtig.

## 2.2 Risikofaktoren

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Zu den bekanntesten Risikofaktoren gehören Adipositas (Übergewicht), Nulliparität (Geburtslosigkeit), Infertilität (Unfruchtbarkeit), eine frühe Menarche (erste Regelblutung) und eine späte Menopause (letzte spontane Menstruation einer Frau), ein aktiver ovulatorischer Zyklus und somit auch Erkrankungen, wie polyzystische Ovarien (PCOS) [24]. Obwohl Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparate das Risiko senken [16, 54], tragen Frauen, die eine Hormonersatztherapie durchführen, ein leicht erhöhtes Risiko [55].

Genetische Veränderungen spielen bei ca. 10 % der Ovarialkarzinome eine Rolle. Hier haben Frauen mit Verwandten ersten Grades mit einem Brust- oder Eierstockkrebs oder Frauen, die schon an einem Brust-, Darm- oder Gebärmutterhalskrebs erkrankt sind oder waren ein erhöhtes Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Eine deutliche Steigerung wird auch bei Patientinnen mit Mutationen in den Genen *BRCA1*, *BRCA2* und *RAD51C* (*BRCA3*) oder bei den Trägern von Mutationen in den Mismatch-Repair-Genen *MLH1* und *MSH2* beobachtet. Mit einer *BRCA1*-Mutation hat eine Frau bis zu ihrem 80. Lebensjahr ein Erkrankungsrisiko von 60 bis 65 %. Für *BRCA2*-Mutationsträgerinnen liegt das Erkrankungsrisiko bis zum 80. Lebensjahr bei 30 bis 37 %, wobei es für die Normalbevölkerung bei 1 % liegt [26].

## 2.3 Symptome

Während der frühen Stadien sind die Patientinnen oft symptomlos. 70 % aller Frauen mit einem Ovarialkarzinom werden erst in den Stadien FIGO IIB und IV diagnostiziert [12]. Dies liegt einerseits an der langen Zeit der Symptomlosigkeit und andererseits an den unspezifischen Symptomen mit denen sich das Ovarialkarzinom häufig präsentiert: Stuhlveränderungen, Miktionsbeschwerden, Harndrang, Meteorismus

(hohe Ansammlung von Darmgas), Völlegefühl, Aszites (Wassereinlagerungen in der Bauchhöhle), Zyklusstörungen, Dysmenorrhoe (Schmerzzustände während der Menstruation), postmenopausale Blutungen, Gewichtsverlust und Leistungsminderung, Kachexie (pathologischer Gewichtsverlust) und Facies ovarica (eingefallenes Gesicht). Das späte Auftreten der Symptome gepaart mit ihrer häufigen Unspezifität, macht die Früherkennung des Ovarialkarzinoms so schwierig. Bis heute wurde noch keine Methode für ein Screening-Verfahren bzw. für die Früherkennung des Ovarialkarzinoms gefunden, welches zufriedenstellende Ergebnisse geliefert hätte [12]. Umso wichtiger ist es somit, nach später Diagnosefindung eine anschließend gut auf die Patientinnen abgestimmte Therapie anbieten zu können, um die Mortalität senken und das Überleben verlängern zu können.

## **2.4 Diagnostik**

Bei der Abklärung eines möglichen Ovarialkarzinoms werden folgende bildgebende Verfahren hauptsächlich eingesetzt: Transvaginalsonographie (TVS), CT und MRT. Allerdings kann kein bildgebendes Verfahren das operative Staging ersetzen [67]. Als Verlaufsmarker dienen CA 125, CA 19-9 und CA72-4 [12], [71].

## **2.5 Stadieneinteilung**

Beim Ovarialkarzinom gibt es die TNM-Klassifikation (Classification of malignant tumours) und die FIGO-Klassifikation (Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique). Die einzelnen Stadien lassen sich weiter in drei Untergruppen aufteilen.

- T1 (FIGO I): Tumor hat nur die Ovarien befallen
- T2 (FIGO II): Tumor breitet sich im Becken aus
- T3 (FIGO III): Tumor breitet sich außerhalb des Beckens aus und/oder er hat Lymphknotenmetastasen
- M1 (FIGO IV): Fernmetastasen

Wie im Folgenden beschrieben, richten sich sowohl die Wahl der Therapie als auch die Überlebensrate der Patientinnen stark nach dem Stadium, in dem das Ovarialkarzinom diagnostiziert wird.

## **2.6 Therapie**

Die Therapie besteht in den meisten Fällen aus der Kombination einer primären Operation mit einer adjuvanten Chemotherapie und richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung. Die komplette Tumorreduktion ist der wichtigste prognostische Marker beim Ovarialkarzinom. Daher ist die maximale Tumorreduktion mittels einer Operation vorrangig [23]. Die Chemotherapie besteht in der Regel aus einer platin- und taxanbeinhaltenden Behandlung. Am häufigsten wird Paclitaxel und Cis/Carboplatin verwendet. Hinzu kommen weitere Medikamente wie z.B. die neueren molekularbiologischen Ansätze, z.B. VEGF-Inhibitoren (Bevazizumab, Pazopanib) oder PARP-Inhibitoren bei Patientinnen mit einer Keimbahnmutation im BRCA-Gen [27, 28, 50].

## **2.7 Prognose**

Die Prognose der einzelnen Patientinnen hängt vom Tumorstadium, Alter, Allgemeinzustand und vor allem vom Tumorrest nach der Operation ab. In den frühen Stadien FIGO I und II haben die Patientinnen eine gute 5-Jahres-Überlebensrate, für FIGO I von 80 % und für FIGO II von 60 %. Für FIGO III liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 23 %, für FIGO IV bei 14 %. Insgesamt liegt die 5-Jahres-Überlebensrate unter 40 % [d]. Die niedrige 5-Jahres-Überlebensrate macht abermals deutlich, wie essentiell es für die Patientinnen ist, eine lebensverlängernde und personalisierte Therapie zu bekommen.

## **2.8 Biomarker als neue Hilfsmittel zur Prognoseabschätzung und Möglichkeit der personalisierten Therapie**

Allgemein werden Biomarker definiert als Merkmale, welche objektiv messbar und bewertbar sind. Des Weiteren sollen Biomarker auf einen pathologischen oder biologischen Vorgang hindeuten und Hinweise auf das Ansprechen einer Therapie und für das Überleben geben [7, 8].

Weltweit forschen Naturwissenschaftler nach relevanten Biomarkern bei Tumorerkrankungen; bis heute leider nur mit wenigen Erfolgen beim Ovarialkarzinom. Die Suche der heutigen Medizin nach personalisierten und risikoarmen Therapien hat in vielen Bereichen schon zu einem verbesserten Verständnis und zu höheren Überlebensraten geführt. Schon lange etablierte diagnostische Biomarker sind z.B. der Rheumafaktorenachweis und der Nachweis von Antikörpern gegen citrullinierte Proteine, den sog. ACPAs bei der rheumatoiden Arthritis. Diese ermöglichen eine schnelle Diagnose und eine bessere Beurteilung der Schwere der Erkrankung und helfen somit dem Arzt bei Therapieentscheidung [49, 78]. Neuere Biomarker werden mit Verfahren der Genomsequenzierung, Proteomics und DNA/RNA-Mikroarrays erforscht [32].

## **2.9 Stand von Biomarkern beim Ovarialkarzinom**

Beim Ovarialkarzinom gibt es bis heute noch keine verlässlichen Biomarker. Es gibt allerdings Tumormarker, die während der Erkrankung herangezogen werden. Hier spielt das Glykoprotein CA-125 (cancer antigen 125 / MUC16) die wichtigste Rolle. Da allerdings 20 % aller Ovarialkarzinome wenig oder gar keine Expression von CA-125 zeigen, eignet sich CA-125 nicht immer als Verlaufsparemeter [3]. Weiter werden Ansätze für Biomarker des Ovarialkarzinoms in Kombination mit CA-125 gesucht [3]. Hier seien exemplarisch fünf der „neuen“ Biomarkerkandidaten genannt: HE4 (human epididymis protein 4), Mesothelin, Folat-Rezeptor alpha, Osteopontin und Kallikreine [3, 71]. Hinzu kommen z.B. interessante mögliche Marker wie Tp53 und HER2/neu [19].

Dies alles darf jedoch nicht darüber hinweg täuschen, dass es beim Ovarialkarzinom bisher keine effektive Früherkennung gibt. Die Prognose für die Patientinnen bleibt schlecht, insbesondere, wenn nach der Operation ein Tumorrest verbleibt.

## 2.10 HOMER2

Die in dieser Arbeit später gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass das Gen bzw. das Protein HOMER2 als prognostischer und u. U. als prädiktiver Biomarker beim Ovarialkarzinom verwendet werden könnte. Damit ist es denkbar, dass HOMER2 zukünftig eine Rolle bei der Personalisierung der Therapie einnimmt. Das Gen *HOMER2* [Homer homolog 2 (Drosophila)] liegt auf dem langen Arm von Chromosom 15 (15q24.3) und kodiert ein Mitglied aus der HOMER-Familie dendritischer Proteine. HOMER2 ist auch bekannt unter den Namen CPD; ACPD; VESL-2 [c].

Voraussetzung dieser Hypothese waren in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Meindl zuvor erhobene, microarray-basierte mRNA-Expressionsdaten von 103 Ovarialkarzinomen. Ziel dieser Analyse war die Identifizierung neuer molekularer Biomarker für das fortgeschrittene sporadische Ovarialkarzinom. Die Zusammenstellung des untersuchten Kollektivs erfolgte unter Berücksichtigung folgender klinischer Merkmale: postoperativer Tumorrest (0 oder > 0 cm und < 1 cm), fortgeschrittenes FIGO-Stadium (III oder IV), hohe histopathologische Graduierung (Grading von 2 oder 3) und eine platin-basierte adjuvante Chemotherapie [87]. Die Auswertung dieser Daten erbrachte sowohl in uni- als auch in multivariablen Analysen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von *HOMER2* und dem Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben der Patientinnen.

In der Literatur wird zum jetzigen Zeitpunkt HOMER2 hauptsächlich in Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen beschrieben. Hier ein kurzer Überblick:

In der Arbeit von Gould et al., konnte gezeigt werden, dass durch Kokainkonsum eine Störung des Gleichgewichtes zwischen der relativen Expression und der konstitutiven Expression von HOMER2 und HOMER1 im präfrontalen Cortex stattfand und dies einen molekularer Trigger für einen Drogenkonsumrückfall darstellen könnte [31].

In der Arbeit von Cozzoli et al., erschienen 2009, wird HOMER2 im Zusammenhang mit Alkoholismus gesehen [17] und nach Gilks et al. wurde eine mögliche Beziehung zwischen HOMER2 und der Ätiologie von Schizophrenie aufgezeigt [30].

Weiter wird HOMER2 nach Parisiadou et al. in einem Kontext mit der Reduzierung von dem Amyloid-Precursor-Proteinen (APP) gesehen, welche mit der Entstehung der Erkrankung Alzheimer in Verbindung gebracht werden [62].

In der Muskulatur und in der Neuromuskulatur spielt die HOMER-Protein-Familie eine Rolle in der Differenzierung, Entwicklung und Adaptation [67].

Interessanterweise weist eine Arbeit von Ajima et al. aus dem Jahr 2007 aber auch auf einen Zusammenhang zwischen HOMER2 und der Tumorsuppression hin. In dieser Arbeit wurde HOMER2 als Bindepartner eines putativen Tumorsuppressors (MYO18B) identifiziert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression von HOMER2 die wachstumshemmenden Fähigkeiten von MYO18B in Lungenkarzinomzelllinien erhöhte. Die Autoren schlossen daraus, dass HOMER2 und MYO18B in der Tumorsuppression kooperieren [1].

### 3 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der hier vorgelegten medizinischen Doktorarbeit sollten bereits vorliegende microarray-basierte mRNA-Expressionsdaten ( $n = 103$ ) bzgl. des Gens *HOMER2* und dessen potentielle prognostische Relevanz validiert werden. Hierzu sollten:

- 1) die Ergebnisse des mRNA-microarrays mittels einer unabhängigen mRNA-Analysetechnik, der quantitativen PCR (qPCR) überprüft werden.
- 2) die mRNA-Ergebnisse in einem größeren, unabhängigen Kollektiv validiert werden. Hierzu sollten online-verfügbare, microarray-basierte mRNA-Expressionsdaten bzgl. *HOMER2* über die Plattform „KM-Plotter“ ([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com)) ausgewertet werden.
- 3) die *HOMER2*-Expression auf Proteinebene untersucht werden. Dazu sollte zuerst ein *tissue-microarray* (TMA) hergestellt und ein für *HOMER2* spezifischer Antikörper identifiziert werden. Nach Identifizierung und anschließenden immunhistochemischen Färbungen des TMAs sollte überprüft werden, inwieweit auch die *HOMER2*-Proteinexpression mit dem Überleben der Patientinnen assoziiert ist.

## 4 Material & Methoden

### 4.1 Klinisch-pathologische Merkmale der Tumorproben, die für die qPCR verwendet wurden.

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die klinisch-pathologischen Merkmale der Tumorproben, die für die qPCR verwendet wurden mit ihren prozentualen und absoluten Häufigkeiten aufgelistet.

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Merkmale der Tumorproben, die für die qPCR verwendet wurden.

		(n)	(%)
<b>Alter bei Diagnose</b>	<b>≥ 60</b>	<b>27</b>	<b>66 %</b>
	<b>&lt; 60</b>	<b>14</b>	<b>34 %</b>
<b>Medianes Alter</b>	<b>64</b>		
<b>Histologischer Typ</b>	<b>serös</b>	<b>29</b>	<b>71 %</b>
	<b>muzinös</b>	<b>2</b>	<b>5 %</b>
	<b>endometroid</b>	<b>5</b>	<b>12 %</b>
	<b>klarzellig</b>	<b>1</b>	<b>2,5 %</b>
	<b>undifferenziert</b>	<b>3</b>	<b>7 %</b>
	<b>niedrig differenziert</b>	<b>1</b>	<b>2,5 %</b>
<b>Nodalstatus</b>	<b>N0</b>	<b>12</b>	<b>29 %</b>
	<b>N+</b>	<b>19</b>	<b>47 %</b>
	<b>Nx</b>	<b>10</b>	<b>24 %</b>
<b>Histopathologische Graduierung (Grading)</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>15 %</b>
	<b>3</b>	<b>34</b>	<b>83 %</b>
	<b>keine Angabe</b>	<b>1</b>	<b>2 %</b>
<b>Postoperativer Tumorrest</b>	<b>0 cm</b>	<b>23</b>	<b>56 %</b>
	<b>&gt; 0 und &lt;1 cm</b>	<b>18</b>	<b>44 %</b>
<b>FIGO Status</b>	<b>III</b>	<b>32</b>	<b>78 %</b>
	<b>IV</b>	<b>9</b>	<b>22 %</b>
<b>Aszitesvolumen</b>	<b>&lt; 500 ml</b>	<b>29</b>	<b>71 %</b>
	<b>≥ 500 ml</b>	<b>12</b>	<b>29 %</b>
<b>Adjuvante Chemotherapie</b>	<b>Platinum</b>	<b>18</b>	<b>44 %</b>
	<b>Platinum-Taxan</b>	<b>23</b>	<b>56 %</b>

## 4.2 Klinisch-pathologische Merkmale der Tumorproben, die für die Herstellung des TMAs verwendet wurden.

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die klinisch-pathologischen Merkmale der Tumorproben, die für den TMA verwendet wurden mit ihren prozentualen und absoluten Häufigkeiten aufgelistet.

Tabelle 2: Klinisch-pathologische Merkmale der Tumorproben, die für die Herstellung des TMAs verwendet wurden.

		(n)	(%)
<b>Alter bei Diagnose</b>	<b>≥ 60</b>	<b>27</b>	<b>59 %</b>
	<b>&lt; 60</b>	<b>19</b>	<b>41 %</b>
<b>Medianes Alter</b>	<b>64</b>		
<b>Histologischer Typ</b>	<b>serös</b>	<b>34</b>	<b>74 %</b>
	<b>muzinös</b>	<b>1</b>	<b>2 %</b>
	<b>endometroid</b>	<b>4</b>	<b>9 %</b>
	<b>klarzellig</b>	<b>1</b>	<b>2 %</b>
	<b>undifferenziert</b>	<b>2</b>	<b>4 %</b>
	<b>niedrig differenziert</b>	<b>1</b>	<b>2 %</b>
	<b>keine Angabe</b>	<b>3</b>	<b>7 %</b>
<b>Nodalstatus</b>	<b>N0</b>	<b>14</b>	<b>30 %</b>
	<b>N+</b>	<b>20</b>	<b>44 %</b>
	<b>Nx</b>	<b>11</b>	<b>24 %</b>
	<b>keine Angabe</b>	<b>1</b>	<b>2 %</b>
<b>Histopathologische Graduierung (Grading)</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>11 %</b>
	<b>3</b>	<b>41</b>	<b>89 %</b>
<b>Postoperativer Tumorrest</b>	<b>0 cm</b>	<b>23</b>	<b>50 %</b>
	<b>&gt; 0 und &lt;1 cm</b>	<b>22</b>	<b>48 %</b>
	<b>keine Angabe</b>	<b>1</b>	<b>2 %</b>
<b>FIGO Status</b>	<b>III</b>	<b>36</b>	<b>78 %</b>
	<b>IV</b>	<b>10</b>	<b>22 %</b>
<b>Aszitesvolumen</b>	<b>&lt; 500 ml</b>	<b>27</b>	<b>59 %</b>
	<b>≥ 500 ml</b>	<b>18</b>	<b>39 %</b>
	<b>keine Angabe</b>	<b>1</b>	<b>2 %</b>
<b>Adjuvante Chemotherapie</b>	<b>Platinum</b>	<b>14</b>	<b>30,4 %</b>
	<b>Platinum-Taxan</b>	<b>31</b>	<b>67,4 %</b>
	<b>keine Angabe</b>	<b>1</b>	<b>2,2 %</b>

## 4.3 qPCR

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien der qPCR.

Reagenz	Inhalt
TaqMan Gene Expression Mastermix (2x konzentriert, Applied Biosystems):	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hot Start AmpliTaq Gold DNA Polymerase</li><li>• dNTPs</li><li>• Puffer Komponenten für optimale PCR Bedingungen</li></ul>
HOMER2 spezifischer TaqMan-Assay (20 x konzentriert, Assaynummer: Hs01561578_m1, Applied Biosystems):	<ul style="list-style-type: none"><li>• zwei nicht markierte, genspezifische, exonüberspannende Primer (Konzentration: 18 µM pro Primer entspricht einer Endkonzentration von 900 nM pro Primer)</li><li>• 6-FAM markierte HOMER2-spezifische Sonde (Konzentration 5 µM entspricht 250nM pro Reaktion)</li></ul>
TaqMan-Assays für endogene Kontrollgene ( <i>ALAS1</i> und <i>18S</i> ) (20 x konzentriert, Assaynummern: Hs00963534_m1 ( <i>ALAS1</i> ), Hs99999901_s1 ( <i>18S</i> ), Applied Biosystems)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Jeweils genspezifische Primerpaare (Konzentration s.o.) und 6-FAM markierte genspezifische Sonden (Konzentration s.o.)</li></ul>

Die in dieser Arbeit für die qPCR verwendete cDNA wurde freundlicherweise von Frau Juliane Volkmann bzw. der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Alfons Meindl zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der cDNA war aus dem Tumorgewebe die RNA isoliert und mit Hilfe des *First-strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Amersham Bioscience (Produkt-Code:27-9261-01) in cDNA umgeschrieben worden.

Vor der eigentlichen qPCR-Analyse mit dem TaqMan-Gerät wurde die cDNA mit den für die qPCR nötigen Reagenzien in die jeweiligen Vertiefungen (wells) der verwendeten Microtiterplatte pipettiert. Dies geschah nach einem vorweg

ausgearbeiteten Pipettierplan, wobei jede cDNA Probe in zwei unabhängigen Reaktionen analysiert wurde, um eventuelle Pipettierungenauigkeiten identifizieren zu können. Die für die qPCR benötigten Reagenzien sind in Tabelle 3 aufgeführt. Das Endvolumen jedes Reaktionsansatzes betrug 30 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 15 µl des zweifach konzentrierten Mastermixes, 1,5 µl des 20-fach konzentrierten TaqMan-Assays, 10,5 µl autoklaviertes, RNase freies Wasser und 3 µl der cDNA der jeweiligen Probe. Die Konzentration der cDNA war zuvor so eingestellt worden, dass pro Reaktionsansatz jeweils 500 ng eingesetzt wurden. Pipettiert wurde nach folgendem Schema: zuerst wurde in jedes well die 3 µl cDNA pipettiert, um nachfolgend in jedes well die 27 µl der Lösung mit dem Mastermix, dem TaqMan-Assay und dem autoklavierten, RNase freien Wasser zu pipettieren. Die 3 µl cDNA wurden vorweg in die wells pipettiert, um über eine Blickkontrolle sicher zu stellen, dass jedes well 3 µl cDNA enthielt.

#### **4.3.1 Prinzip der quantitativen PCR (qPCR)**

Das Prinzip der qPCR in dieser Arbeit wurde verwendet, um Genexpressionsdaten verschiedener Tumorproben von unterschiedlichen Patientinnen darstellen und vergleichen zu können. Hierbei wurden Echtzeit-Fluoreszenz-Messungen zur Quantifizierung benutzt. Für diese Messungen wurde eine *HOMER2*-spezifische Sonde, mit jeweils einem Reporter an ihrem 5'-Ende und einem Quencher an ihrem 3'-Ende eingesetzt. Der Quencher unterdrückte die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes. Das Fluoreszenzsignal entstand, wenn die Polymerase in 5'-3' Richtung auf der cDNA über den Abschnitt der *HOMER2*-spezifischen Sonde „fuhr“ und so der an die Sonde gebundene Reporter infolge von Hydrolyse durch die Polymerase räumlich vom Quencher distanziert wurde. Somit kam es beim jeweiligen Duplizieren des cDNA-Abschnittes zu einem Fluoreszenzsignal, welches gemessen wurde. Mit der Zunahme der Amplifikate nahm die Fluoreszenz zu. Die Quantifizierung der Menge der Transkripte der cDNA für das *HOMER2*-Gen wurde in der exponentiellen Phase eines PCR-Laufes durchgeführt [e]. Das Temperaturprofil der durchgeführten PCR-Läufe ist in nachfolgender Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Temperaturprofil eines TaqMan-Laufs.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	10 min	1 x
Denaturierung	95 °C	15 s	40 x
Primer Anlagerung (Annealing) & Elongation	60 °C	1 min	40 x

#### 4.3.2 Prinzip des relativen Verhältnisses der Proben zu einander

Für die relative Vergleichbarkeit der cDNA-Proben unterschiedlicher Patientinnen, wurde zuerst die Formel  $\Delta Ct = Ct \text{ HOMER2-Gen} - Ct \text{ House Keeper}$  verwendet, wobei als House-Keepergene *ALAS1* und *18S* dienten. Mit der nachfolgend genannten Formel wurden die Proben zueinander unter Berücksichtigung eines Kalibrators ins Verhältnis gesetzt:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{HOMER2-Gen} - \text{House Keeper}) - \Delta Ct$  des Kalibrators. Der so gewonnene  $\Delta\Delta Ct$ -Wert wurde in die Gleichung der n-fachen Expression  $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$  eingesetzt und der daraus resultierende Wert mit einem  $10\log$  verrechnet [e].

#### 4.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, mit deren Hilfe sich u.a. Proteine mittels Antikörpern in Geweben bzw. Zellkompartimenten nachweisen lassen. Hierbei nutzt man die spezifische Affinität der Antikörper zu bestimmten Molekülabschnitten (Epitope) der nachzuweisenden Antigene [58]. In der vorliegenden Arbeit sollte das menschliche HOMER2-Protein mittels dieser Methode in 46 Ovarialkarzinomgeweben nachgewiesen werden.

#### 4.4.1 Konstruktion eines Tissue Microarrays (TMA)

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien zur Herstellung der TMAs.

Material	Hersteller / Händler	Bestellnummer/Bemerkungen
Paraffin	Merck KGaA	4501270125

Zum Nachweis des HOMER2-Proteins wurden in einem ersten Schritt zwei TMAs hergestellt. Die TMA-Technik wurde für die gleichzeitige Analyse von bis zu tausend histologischen Präparaten auf einem Schnitt von Konon et al. im Jahre 1998 entwickelt [42]. Ein TMA besteht aus ausgestanzten Gewebezylindern und einem Paraffinblock. Mittels der in dieser Arbeit verwendeten in-situ-Methoden der Immunhistochemie (IHC) ließen sich so verschiedene Gewebeproben verschiedener Patientinnen auf Proteinebene gleichzeitig untersuchen [11].

Vor der Herstellung des TMAs wurde ein genauer Belegungsplan (Raster) erarbeitet. Hierbei wurde besonders auf eine asymmetrische Anordnung der Kontrollgewebe geachtet, da diese die Orientierung auf dem TMA (oben/unten; rechts/links) bei der späteren Auswertung wesentlich erleichterte (siehe unten Abb.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
a	xxx	xxx	xxx	yyy	yyy	yyy	zzz	zzz		zzz				
b														
c														
d														
e														
f														
g														
h														
i														

Abbildung 1: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Rasters. Blaue Kästen: Stanzen aus Gewebe, welches gut vom zu untersuchendem Gewebe zu unterscheiden war; in dieser Arbeit wurde hierfür lymphatisches Gewebe aus Tonsillen verwendet; Weiße Kästen: Gewebeproben.

Bevor nun die Herstellung des TMAs beginnen konnte, musste noch zu jedem Gewebeblock jeder einzelnen Patientinnenprobe ein Großflächenschnitt hergestellt

werden, auf dem die/der Pathologin/e die zu stanzenden Areale markierte, damit gesichert war, dass tumoröses Gewebe auf dem späteren TMA vorhanden war. Danach wurde ein Empfängerblock mit den Maßen 3,7 x 2,5 x 0,5 cm aus flüssigem Paraffin in einer Form gegossen. Zur Festigung musste der Paraffinblock 15 Minuten abkühlen und war dann für die weitere Verwendung verfügbar. Dieser Empfängerblock wurde in die Halteeinrichtung des Stanzgerätes der Firma Beecher Instruments gespannt. Daraufhin wurden zwei spezielle Hohladeln, der sog. Donator und der Rezeptor, montiert (siehe unten Abb.2 B). Der Donator stantzt im Durchmesser 0,6 mm Gewebezylinder aus dem zu untersuchenden Gewebe. Der Rezeptor stantzt für die Gewebeproben passende hohle Zylinder in den Paraffinblock. Nach dem Positionieren des Rezeptors an die Feinjustierung mit den x- und y-Mikrometerstellschrauben (siehe unten Abb.2 C) wurde der Rezeptor mechanisch über eine vertikal verschiebbare Achse (siehe unten Abb.2 A) in den Paraffinblock eingeführt und wieder entfernt, sodass ein hohler Zylinder im Paraffinblock entstand. Daraufhin wurde die Stanze vom Rezeptor auf den Donator über eine Klappvorrichtung umgestellt. Die zu stanzende Gewebeprobe wurde auf eine sogenannte Bank (Block bridge) gestellt. Der markierte Hämatoxylin-Eosin-(H&E) gefärbte Grossflächenschnitt wurde auf die zu ihm gehörende Gewebeprobe gelegt und der zu stanzende Gewebeblock zusammen mit der Bank so positioniert, dass die auf den H&E Grossflächenschnitten markierten Stellen unter dem Donator lagen. Über eine vertikal verschiebbare Achse (siehe Abb.2A) wurde dann mit Hilfe des Donators aus dem Gewebeblock ein Zylinder mechanisch gestantzt. Die Bank mit dem Gewebeblock wurde entfernt, und der Gewebezylinder wurde mit zwei Pinzetten manuell in den Hohlzylinder des Paraffinblocks eingeführt. Nun wurde der Rezeptor über die x- und y-Mikrometerstellschrauben zur nächsten gewollten Position verschoben und der ganze Vorgang mit einer anderen Gewebeprobe wiederholt, bis das angelegte Raster abgearbeitet bzw. abgestantzt war. In der vorliegenden Arbeit wurden pro Gewebe jeweils drei Gewebezylinder aus unterschiedlichen Arealen entnommen, um eine eventuelle Heterogenität des Tumorgewebes zu berücksichtigen. Der Abstand zwischen den einzelnen Gewebeproben auf dem TMA betrug 1–2 mm. Nachdem der TMA fertig gestellt war, wurde er für 10 Minuten bei 60 °C in einem Brutschrank inkubiert, damit das Paraffin des Empfängerblocks mit dem Paraffin des Gewebezylinders und den Proben verschmelzen konnte. Somit wurde eine höhere Stabilität des TMA-Blocks für das spätere Schneiden erreicht [70].

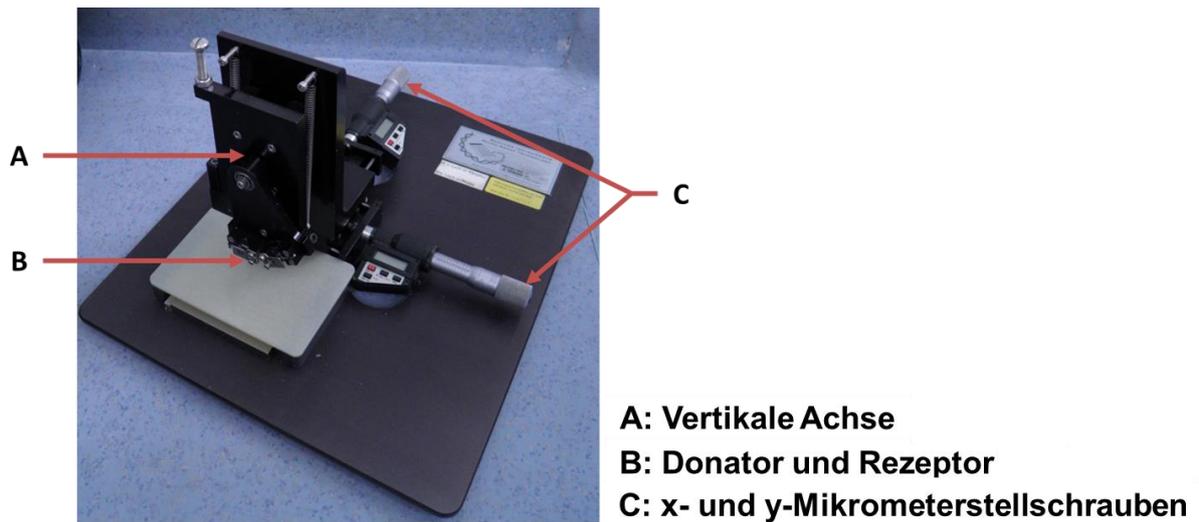


Abbildung 2: Seitenansicht des Tissue-Micro-Arrayers der Firma Beecher Instruments.

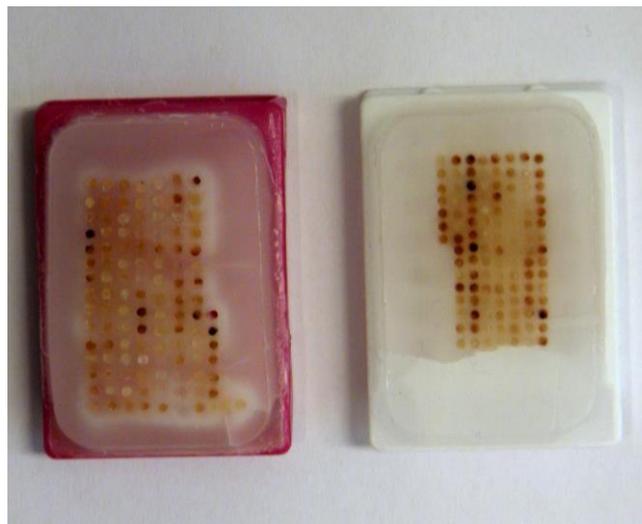


Abbildung 3: Fertiggestellte TMAs, die die gleichzeitige Untersuchung von 46 Ovarialkarzinomen erlauben.

#### 4.4.2 Anfertigung von Schnitten

Zur Anfertigung der Schnitte wurden die TMAs zuerst gekühlt, um daraufhin in ein Mikrotom der Firma Thermo Scientific (HM3555) eingespannt zu werden. Die Dicke der Schnitte wurde auf 2  $\mu\text{m}$  eingestellt. Nach dem Schneiden kamen die Schnitte zur Glättung in ein Wasserbad und wurden dann auf einen Objektträger überführt.

### 4.4.3 Vorbehandlung der Schnittpräparate

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien zur Vorbehandlung der Schnittpräparate.

<b>Material</b>	<b>Hersteller / Händler</b>
<b>Xylol</b>	<b>Staub &amp; Co Chemiehandelsgesellschaft GmbH</b>
<b>Isopropanol</b>	<b>Staub &amp; Co Chemiehandelsgesellschaft GmbH</b>
<b>Ethanol 96%</b>	<b>Staub &amp; Co Chemiehandelsgesellschaft GmbH</b>
<b>Ethanol 70 %</b>	<b>Staub &amp; Co Chemiehandelsgesellschaft GmbH</b>
<b>Trizma Base</b>	<b>Sigma</b>

Um die Schnitte für die Antigendemaskierung (siehe nachfolgender Abschnitt 4.4.4) vorzubereiten, mussten die Schnitte zuerst getrocknet, entparaffiniert und rehydriert werden.

Die zu behandelnden Schnitte wurden, um sie zu entparaffinieren, über Nacht bei 60 °C in einem Brutschrank belassen. Hierbei war darauf zu achten, dass die Temperatur von 60 °C nicht überschritten wurde, da es sonst zu einer Antigenzerstörung hätte kommen können [58]. Anschließend wurden die Schnitte in einem Metall-Halter zentral positioniert und die freien Stellen mit Leerobjekträgern besetzt, sodass der Halter als Ganzes symmetrisch bestückt war und jede Probe dieselben Inkubationsbedingungen hatte. Darauf folgte die Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkohol-Reihe, bei der die Schnitte nacheinander mehrfach für jeweils zwei bis drei Sekunden in nachfolgende Lösungen getaucht wurden: 9 x in Xylol, 9 x in Isopropanol, 6 x in Ethanol 96 %, 3 x in Ethanol 70 %. Bis zur zügigen Weiterbehandlung wurden die Schnitte in 70 % Ethanol belassen. Bei längerer Standzeit wurden die Schnitte in 10 mM Tris-Lösung aufbewahrt.

#### 4.4.4 Antigendemaskierung (Antigenretrieval)

Die weitere Behandlung der Schnitte bestand in der hitzeinduzierten Antigendemaskierung, die eine Vorbehandlung für die Antikörperbehandlung darstellte. Diese Demaskierung macht es für die Antikörper möglich, Epitope zu binden, die zuvor aufgrund z.B. von Aldehydvernetzungen nicht zugänglich sind [58]. Durch diese Vorbehandlung, der sogenannten Antigendemaskierung (Antigenretrieval) wurde das Antigen, welches zu untersuchen war, freigelegt. Hierfür existieren verschiedene Verfahren, von denen drei in der vorliegenden Arbeit, jeweils in Kombination mit den zu untersuchenden Antikörpern, ausgetestet werden.

##### 4.4.4.1 Methode 1

Tabelle 7: Verwendete Reagenzien für die Methode 1.

Verwendete Reagenzien	Hersteller / Händler	Bestellnummer/Bemerkungen
Citronensäuremonohydrat	Merck KGaA	1.00244.100
Trizma Base	Sigma	T1503-1kg
Salzsäure (HCl) 1 & 5 N	Merck KGaA	1.09063.100
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA	1.06404.1000
<b>Bidest</b>		
5N & 1N NaOH	Krankenhausapotheke des Rechts der Isar	Ch.B.: 210813

Die erste Methode beruht auf der Hitzedemaskierung unter Zuhilfenahme eines Dampfdruckkochtopfs und eines 10 mM Citratpuffers mit einem pH-Wert von 6,0. In einem ersten Schritt wurden 2 Liter Citratpuffer auf einer zuvor auf 260 °C vorgeheizten Kochplatte erhitzt. Nach dem Sichtbarwerden des zweiten Druckrings wurde der Topf von der Platte genommen und in einer Spüle vorsichtig abgedampft. Nach dem Öffnen des Deckels wurde der Dampfdruckkochtopf wieder auf die Kochplatte gestellt und der Probenhalter mit den zu untersuchenden Schnitten zentral in den Dampfdruckkochtopf platziert. Nach dem Verschließen des Deckels und der Druckverriegelung wurden die Schnittpräparate für 7 Minuten im Citratpuffer

erhitzt. Als nächstes wurde der Dampfdruckkochtopf in der Spüle, vorsichtig unter kaltem Wasser abgekühlt, und die Schnitte wurden unter destilliertem Wasser dreimal in einer Glasküvette gespült. Die Schnitte wurden zur weiteren Behandlung in eine Glasküvette gestellt, welche mit destilliertem Wasser oder einer 10 mM Tris-Lösung gegen die Austrocknung gefüllt war.

#### 4.4.4.2 Methode 2 und 3

Tabelle 8: Verwendete Reagenzien für die Methode 2 und 3.

<b>Material</b>	<b>Hersteller / Händler</b>	<b>Bestellnummer/Bemerkungen</b>
<b>Target Retrieval Solution (pH 6,0)</b>	<b>DAKO</b>	<b>S1699</b>
<b>Target Retrieval Solution (pH 9,0)</b>	<b>DAKO</b>	<b>S2367</b>
<b>Trizma base</b>	<b>Sigma</b>	<b>T1503-1kg</b>
<b>Salzsäure (HCl) 1 &amp; 5 N</b>	<b>Merck KGaA</b>	<b>1.09063.100</b>
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	<b>Merck KGaA</b>	<b>1.06404.1000</b>
<b>5N Natronlauge</b>	<b>Krankenhausapotheke des Rechts der Isar</b>	<b>Ch.B.: 210813</b>
<b>1N Natronlauge</b>	<b>Merck KGaA</b>	<b>1.09137.1000</b>
<b>Bidest</b>		

Die zweite und dritte Methode, bei der die Hitzedemaskierung mittels einer Mikrowelle erreicht wurde, beruht auf Lösungen des Herstellers DAKO. Diese entsprechen zwei vom Hersteller speziell modifizierte Citratpuffer. Die zwei Methoden unterschieden sich nur in der jeweiligen Lösung (Target Retrieval Solution pH 6,0 und Target Retrieval Solution pH 9,0). Ansonsten waren alle Schritte der Vorbehandlung beider Methoden gleich. Zuerst musste aus der 10-fach konzentrierten Target Retrieval Solution pH 6,0, beziehungsweise pH 9,0 eine 1-fach konzentrierte Arbeitslösung hergestellt werden (z.B. 20 ml Konzentrat plus 180 ml Bidest). Als nächstes wurde die Plastiküvette mit der Lösung gefüllt und

symmetrisch mit Schnitten bestückt. Eventuell mussten die Plastikküvetten mit Leerobjektträgern ausgeglichen werden, sodass für alle Schnitte die gleichen Bedingungen herrschten. Der Flüssigkeitspegel in der Plastikküvette wurde mit einem Bleistift markiert. Der Deckel wurde leicht schräg aufgesetzt, damit nicht zu viel Flüssigkeit verdampfen konnte und gleichzeitig der Druck, wegen der möglichen Explosionsgefahr, nicht zu sehr anstieg. Diese Küvette wurde nun zentral in einer Mikrowelle positioniert und bei 900 Watt für 10 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der 10 Minuten wurde der Flüssigkeitspegel kontrolliert und gegebenenfalls mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Wichtig war, immer darauf zu achten, dass die Schnitte bzw. der Teil der Schnitte, welcher das histologisch zu untersuchende Präparat enthält, immer mit Flüssigkeit umgeben war, sodass es zu keiner Austrocknung kommen konnte. Nun wurde diese Küvette ein weiteres Mal bei 900 Watt für 10 Minuten inkubiert und nach Ablauf der Zeit sofort in destilliertes Wasser überführt und mit destilliertem Wasser dreimal in einer Glasküvette gespült. Die Schnitte wurden zur weiteren Behandlung in eine Glasküvette gestellt, welche mit destilliertem Wasser oder einer 10 mM Tris-Lösung gegen die Austrocknung gefüllt war.

#### **4.4.5 Immunhistochemische Färbung (Nachweis des HOMER2-Proteins mittels eines HOMER2-spezifischen Antikörpers und dem DAKO REAL Detection System)**

Tabelle 9: Verwendete Reagenzien für die immunhistochemische Färbung.

<b>Verwendete Reagenzien</b>	<b>Hersteller / Händler</b>	<b>Bestellnummer/Bemerkungen</b>
<b>REAL Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse</b>	<b>DAKO</b>	<b>K5001</b>
<b>Antibody Diluent</b>	<b>DAKO</b>	<b>S0809</b>

Nachdem die Schnitte getrocknet, entparaffiniert, rehydriert und einer Antigendemaskierung unterzogen worden waren, erfolgte der Nachweis des HOMER2-Proteins mit einem HOMER2-spezifischen Antikörper und dem DAKO REAL Detection System.

Zuerst wurde der Primärantikörper mit einer speziellen Verdünnungslösung (DAKO Antibody Diluent) entsprechend verdünnt. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Verdünnungen ausgetestet (siehe unten Tabelle 11).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine sogenannte indirekte Detektionsmethode mit Primär- und Sekundärantikörpern angewendet. Hierbei wurde das zu untersuchende Gewebe zuerst mit einem spezifischen Primärantikörper, der gegen das menschliche HOMER2-Protein gerichtet war, inkubiert. Danach folgte die Behandlung mit einem biotinierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Über eine Biotin-Streptavidin Bindung erfolgte anschließend die Konjugation mit einer Peroxidase. Durch die anschließende Inkubation mit einem spezifischen Chromogen (Diaminobenzidin) und einem wasserstoffperoxidhaltigen Substrat-Puffer konnte dann an den Orten des Zielantigens (HOMER2-Protein) ein braunes Endprodukt nachgewiesen werden.

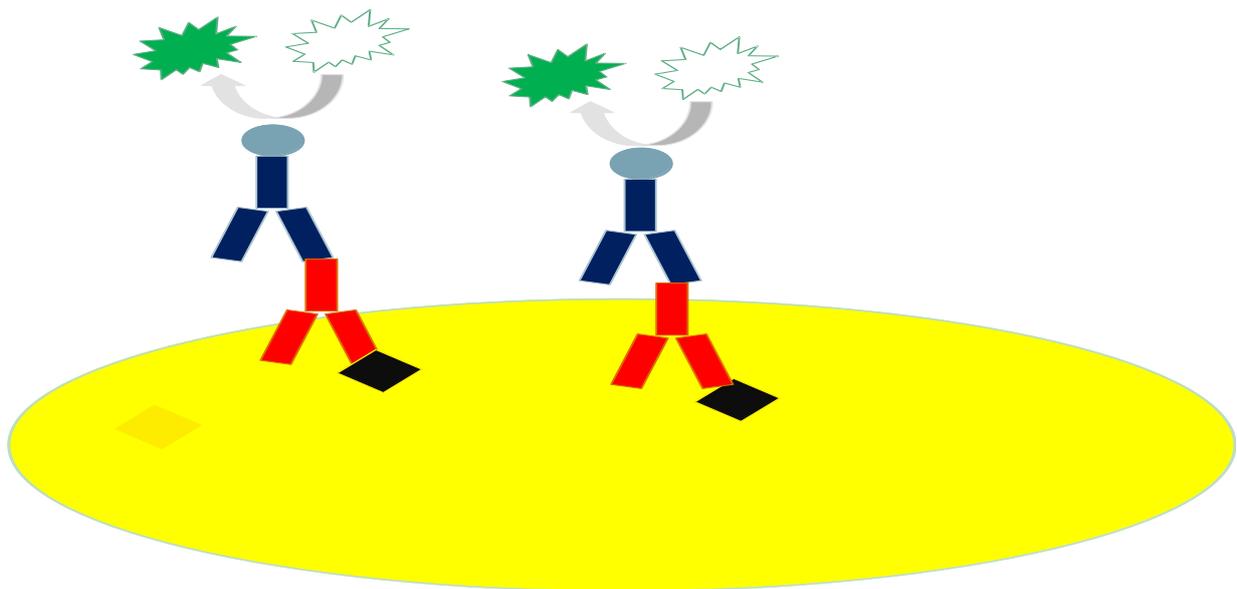


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Nachweises des HOMER2-Proteins mit Hilfe von HOMER2-spezifischen Antikörpern und dem DAKO REAL Detection System. Gelb: Zelle; Schwarz: HOMER2-Protein; Rot: Primärantikörper; Blau: Zweitantikörper = Dako REAL Biotinylated Secondary Antibodies; Weiß: Tertiärssubstrat = Dako REAL Streptavidin Peroxidase; Weiß zu grün: Farbreaktion unter der Zugabe von DAB+Chromogen = Dako REAL DAB + Chromogen und Substratlösung = Dako REAL HRP Substrate Buffer.

## 4.4.6 Kernfärbung, Dehydrierung und Einbettung

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien für die Kernfärbung und die Einbettung.

Verwendete Reagenzien	Hersteller / Händler	Bestellnummer/Bemerkungen
Hämatoxylin	Sigma	GHS316-500ML
Pertex (Eindeckmittel)	Medite	41-4010-00

Nach der immunhistochemische Färbung erfolgte die Gegenfärbung bzw. Kernfärbung mittels Hämatoxylin. Im Anschluss wurden die Schnitte dehydriert. Die Dehydrierung wurde mittels einer aufsteigenden Alkohol-Reihe durchgeführt, bei der die Schnitte nacheinander mehrfach für jeweils zwei bis drei Sekunden in nachfolgende Lösungen getaucht wurden: 3 x in 70 % Ethanol, 6 x in 96 % Ethanol, 9 x in Isopropanol, 9 x in Xylol. Als Letztes wurden die Schnitte mit Pertex, ein Einbettmedium behandelt und mit einem Deckglas versehen, sodass sie für eine pathologische bzw. histologische Beurteilung fertig gestellt waren.

In der nachfolgender Tabelle 11 sind die ausgetesteten Antikörper mit ihrer jeweiligen Verdünnung, dem Hersteller und der Art der Antigendemaskierung angegeben.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper, Hersteller, Bestellnummer, jeweilige Verdünnung, Art der Antigendemaskierung, Art des Antikörpers/ Zusatzinformation. Gelb markiert ist diejenige Bedingung, die eine HOMER2 spezifische Färbung ohne Hintergrundfärbung erbrachte.

Antikörper	Hersteller / Bestellnummer	Jeweilige Verdünnung	Art des Antigenretrievals	Art des Antikörpers / Zusatzinformation
HOMER2	Antibodies-online GmbH / ABIN349996	1 / 300	Dampfkochtopf-methode + Citratpuffer	polyklonal
HOMER2	Antibodies-online GmbH / ABIN349996	1 / 600	Dampfkochtopf-methode + Citratpuffer	polyklonal
HOMER2	Antibodies-online GmbH / ABIN349996	1 / 1200	Dampfkochtopf-methode + Citratpuffer	polyklonal

Antikörper	Hersteller / Bestellnummer	Jeweilige Verdünnung	Art des Antigenretrievals	Art des Antikörpers / Zusatzinformation
HOMER2	Antibodies- online GmbH / ABIN349996	1 / 3000	Dampfkochtopf- methode + Citratpuffer	polyklonal
HOMER2	Antibodies- online GmbH / ABIN349996	1 / 300	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Antibodies- online GmbH / ABIN349996	1 / 600	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Antibodies- online GmbH / ABIN349996	1 / 300	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Antibodies- online GmbH / ABIN349996	1 / 600	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Antibodies- online GmbH / ABIN349996	1 / 100	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Antibodies- online GmbH / ABIN349996	1 / 100	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Abcam / ab75037	1 / 300	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Abcam / ab75037	1 / 300	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Abcam / ab75037	1 / 600	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Abcam / ab75037	1 / 600	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Abcam / ab75037	1 / 1200	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Abcam / ab75037	1 / 1200	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Abcam / ab75037	1/ 2400	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal

Antikörper	Hersteller / Bestellnummer	Jeweilige Verdünnung	Art des Antigenretrievals	Art des Antikörpers / Zusatzinformation
HOMER2	Abcam / ab75037	1 / 2400	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Santa Cruz sc-8924	1 / 100	Dampfkochtopf- methode + Citratpuffer	polyklonal / Verwendeter Zweitantikörper: Sigma 1 / 500
HOMER2	Santa Cruz sc-8924	1 / 200	Dampfkochtopf- methode + Citratpuffer	polyklonal / Verwendeter Zweitantikörper: Sigma 1 / 500
HOMER2	Sigma Produkt- Nr.:HPA 040134	1 / 200	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Sigma Produkt- Nr.:HPA 040134	1 / 200	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Sigma Produkt- Nr.:HPA 040134	1 / 400	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Sigma Produkt- Nr.:HPA 040134	1 / 400	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal
HOMER2	Sigma Produkt- Nr.:HPA 040134	1 / 800	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 6,0	polyklonal
HOMER2	Sigma Produkt- Nr.:HPA 040134	1 / 800	DAKO Target Retrieval Solution pH-Wert 9,0	polyklonal

## 4.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Datenauswertung wurde das Computerprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 21) verwendet. Zur Untersuchung möglicher Assoziationen zwischen klinisch-pathologischen Merkmalen und der HOMER2-Expression wurde der exakte Test nach Fischer bzw. Chi-Quadrat Tests durchgeführt. Um das bivariate Verhältnis von quantitativen Daten abzuschätzen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Die Überlebenskurven für das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mit dem Log-

Rang-Test verglichen. Optimale cut-off Werte, die eine hohe bzw. eine niedrige HOMER2-Expression definierten, wurden mittels ROC (receiver-operating-characteristics)-Analysen abgeleitet. Während das Gesamtüberleben definiert war als die Zeit zwischen der primären Operation und dem Tod der Patientinnen, war das rezidivfreie Überleben definiert als die Zeit zwischen primärer OP und einem Rezidiv. Multivariable Cox-Regressionsmodelle wurden eingesetzt, um den potentiellen prognostischen Wert einzelner Parameter abzuschätzen. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % festgesetzt [87].

# Ergebnisse

## 4.6 HOMER2 mRNA Expressionsanalyse mittels qPCR

Um die bereits vorliegenden microarray-basierten mRNA-Daten zu *HOMER2* mit einer unabhängigen Methode zu verifizieren, wurde die Expression von  $n = 41$  Tumorproben mit der Methode der quantitativen PCR (qPCR) untersucht. Anhand des in Abbildung 5 (siehe unten) dargestellten Säulendiagrammes ist die Expressionspannbreite des Gens *HOMER2* in den Tumoren der untersuchten Patientinnen zueinander anhand der qPCR-Daten zu sehen. Das Säulendiagramm stellt die relativen Expressionsstärken der untersuchten Proben zueinander über eine relative Quantifizierung unter der Verwendung eines Logarithmus von 10 dar.

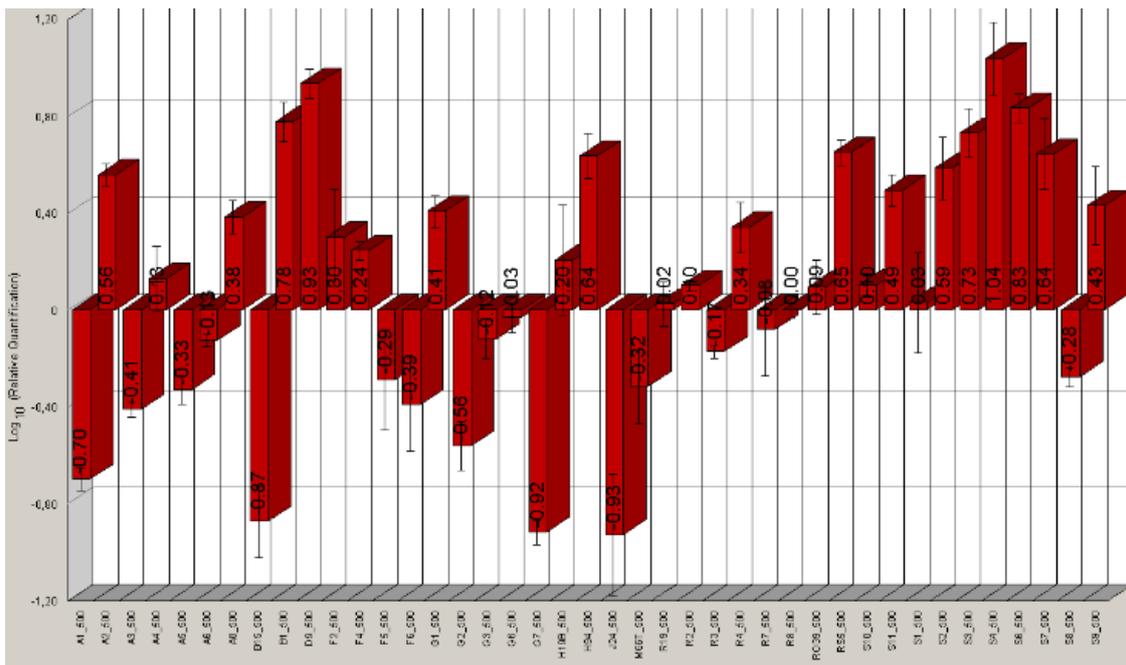


Abbildung 5: qPCR Säulendiagramm zur Darstellung der relativen Expressionsstärken der untersuchten Proben zueinander über eine relative Quantifizierung unter Verwendung eines Logarithmus von 10. Die in dieser Abbildung dargestellten qPCR-Daten wurden mit dem Referenzgen ALAS1 normalisiert.

## 4.7 Korrelationsanalyse der Illumina-Chip-Daten mit den qPCR-Daten

Anschließend wurde eine Korrelationsanalyse mit den qPCR und den array-basierten Expressionsdaten durchgeführt, um die array-basierten Chip-Daten zu verifizieren.

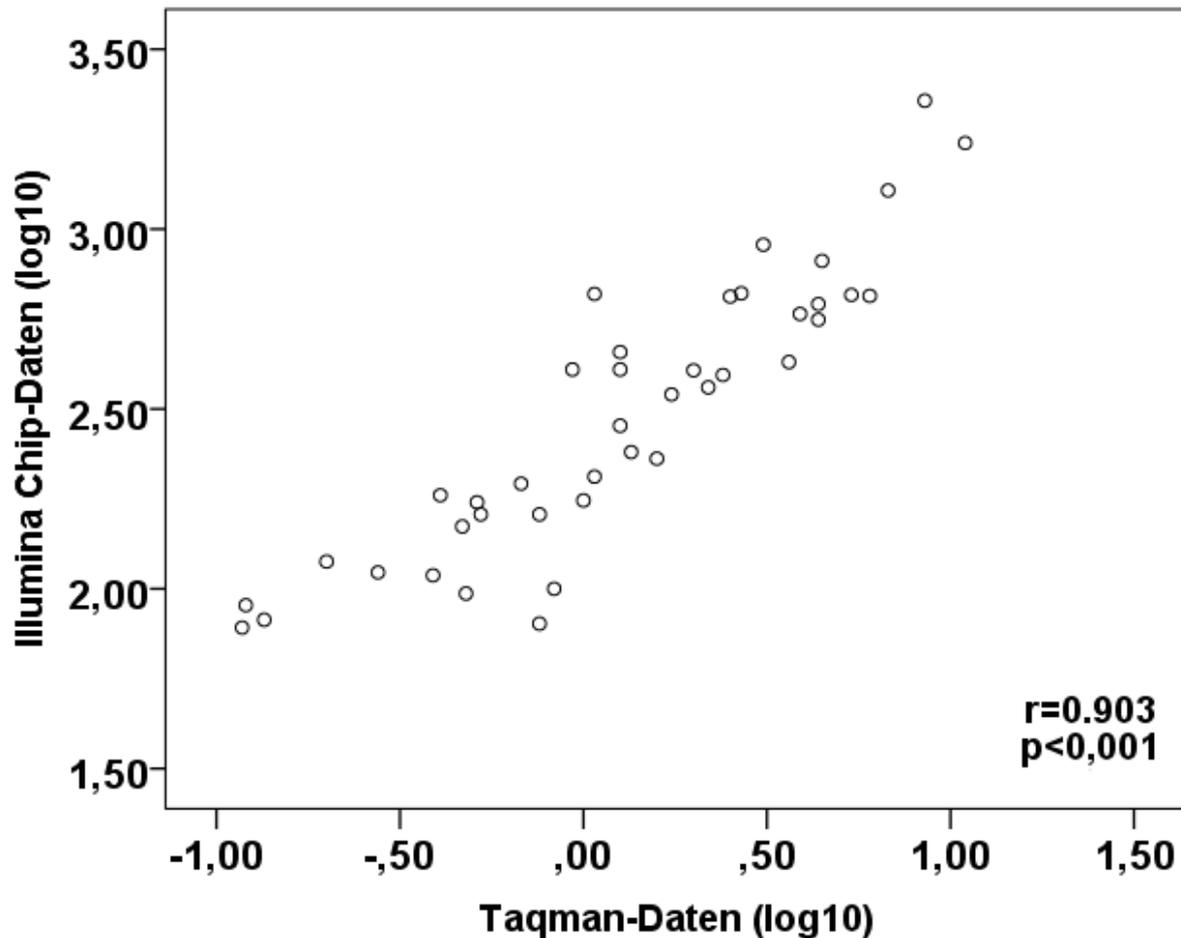


Abbildung 6: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen den array-basierten Chip-Daten und den qPCR-Daten.

In Abb. 6 (siehe oben) ist die Korrelation der qPCR-Daten ( $n = 41$ ), hier normalisiert mit dem Referenzgen *ALAS1*, mit den entsprechenden Illumina-Chip-Daten anhand eines Streudiagramms dargestellt. Das Streudiagramm verdeutlicht eine hoch signifikante ( $p < 0,001$ ), starke positive Korrelation ( $r = 0,903$ ) zwischen den Illumina-Chip-Daten und den Daten der qPCR. Dies bedeutet, dass die mittels Chip generierten Expressionsdaten mit Hilfe einer unabhängigen Methode bestätigt werden konnten.

## 4.8 Assoziation der *HOMER2* mRNA-Expression mit dem Gesamtüberleben und der Zeit bis zum Rezidiv mittels Kaplan-Meier-Analysen

Nachdem die array-basierten Expressionsdaten mittels qPCR bestätigt werden konnten (siehe vorheriges Kapitel 4.7), sollte in einem nächsten Schritt die Assoziation der qPCR-basierten *HOMER2* mRNA-Expression mit dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben untersucht werden. Die hierzu verwendeten qPCR-Daten wurden sowohl mit *ALAS1* als auch mit *18S* als Referenzgene normalisiert.

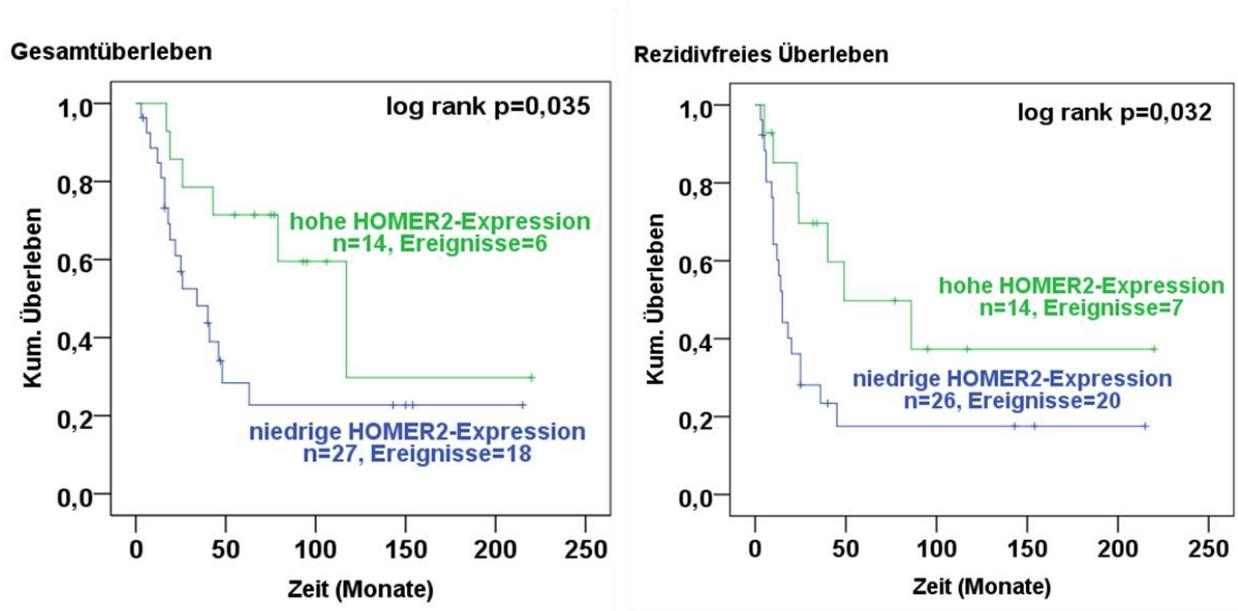


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Assoziation der *HOMER2* mRNA-Expression mit dem Gesamt- bzw. dem rezidivfreien Überleben bei insgesamt 41 bzw. 40 Ovarialkarzinompatientinnen. Die hierzu verwendeten qPCR-Daten wurden mit dem Referenzgen *ALAS1* normalisiert.

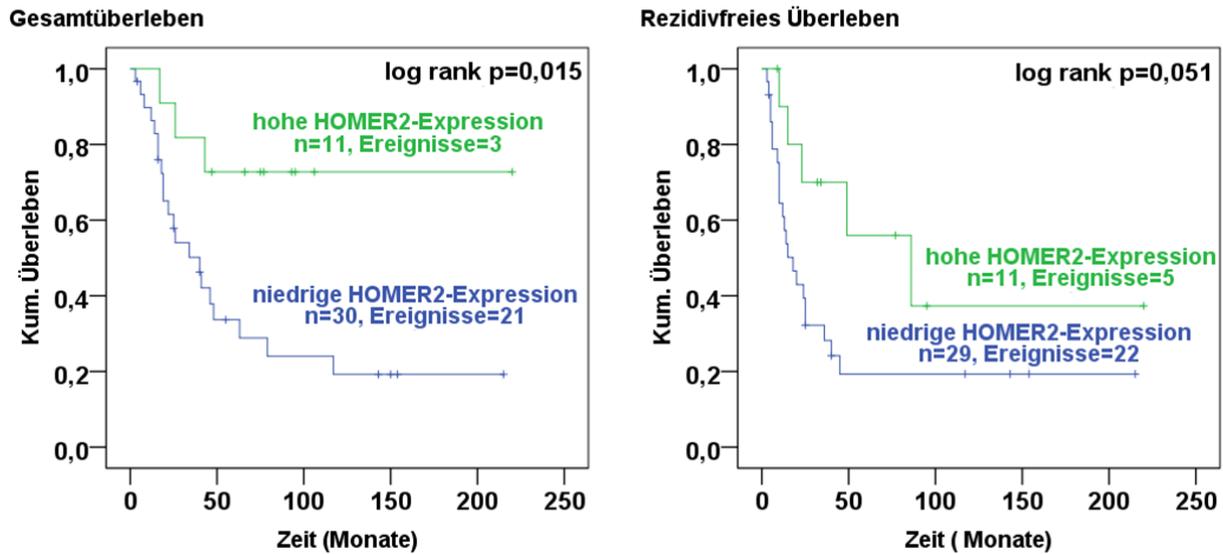


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Assoziation der *HOMER2* mRNA-Expression und dem Gesamt- bzw. dem rezidivfreien Überleben bei insgesamt 41 bzw. 40 Ovarialkarzinompatientinnen. Die hierzu verwendeten qPCR-Daten wurden hier mit dem Referenzgen 18S normalisiert.

Die anhand der qPCR-Daten erhobenen Kaplan-Meier-Kurven, sowohl für das Gesamt- als auch für das rezidivfreie Überleben, jeweils mit zwei Referenzgenen (*ALAS1* und *18S*) normalisiert, zeigten einen deutlichen Vorteil für die Patientinnen mit einer hohen *HOMER2*-Expression. Während das mediane Gesamtüberleben unter der Normalisierung mit dem Referenzgen *ALAS1* (siehe oben Abb. 7) für die Patientinnen mit einer hohen *HOMER2*-Expression bei 117 Monaten lag, lag das mediane Gesamtüberleben für die Patientinnen mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression bei nur 34 Monaten. Dies bedeutete einen Unterschied von 83 Monaten (6,9 Jahre). Der bei dieser Assoziation erhobene P-Wert lag bei  $p = 0,035$  und zeigte somit eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen *HOMER2*-Expression und einem längeren Gesamtüberleben, sowie zwischen einer niedrigen *HOMER2*-Expression und einem kürzeren Gesamtüberleben. Für das rezidivfreie Überleben mit *ALAS1* als House-Keeper galten dieselben Tendenzen. Während das mediane rezidivfreie Überleben für die Patientinnen mit einer hohen *HOMER2*-Expression bei 49 Monaten lag, lag es für Patientinnen mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression bei 15 Monaten. Der erhobene P-Wert lag hier bei  $p = 0,032$  und zeigte eine signifikante Assoziation zwischen der *HOMER2*-Expression und einem verlängerten rezidivfreien Überleben.

Für die Kaplan-Meier-Kurven unter Normalisierung mit dem Referenzgen *18S* (siehe oben Abb. 8) lag der P-Wert für das Gesamtüberleben bei  $p = 0,015$  und zeigte somit für das Gesamtüberleben eine signifikante Assoziation zwischen der *HOMER2*-Expression und dem Gesamtüberleben. Für das rezidivfreie Überleben konnte eine deutliche Tendenz mit einem P-Wert von  $p = 0,051$  festgestellt werden. Das mediane rezidivfreie Überleben bei den Patientinnen mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression dauerte 18 Monate, wohingegen es ganze 86 Monate bei den Patientinnen mit einer hohen *HOMER2*-Expression andauerte. Dies machte einen Unterschied der beiden Gruppen von 68 Monaten (5,6 Jahre) aus.

#### **4.9 Validierung der Assoziation zwischen der *HOMER2*-Expression und dem Überleben der Patientinnen an einem größeren, unabhängigen Kollektiv**

Nachdem signifikante Assoziationen zwischen den qPCR-basierten *HOMER2*-Expressionsdaten und dem Überleben gezeigt werden konnten (siehe Kapitel 4.7) sollte in einem nächsten Schritt diese Assoziation in einem größeren, unabhängigen Kollektiv verifiziert werden.

Die nachfolgenden Kaplan-Meier-Kurven wurden mit online verfügbaren, microarray-basierten mRNA-Expressionsdaten bzgl. *HOMER2* über die Plattform „KM-Plotter“ (<http://kmplot.com>) erstellt. Zur Auswahl der untersuchten Tumore wurden nachfolgende klinisch-pathologische Merkmale herangezogen: Die Patientinnen sollten alle einen Tumorrest  $\leq 1$  cm haben und mit einer Platin enthaltenden postoperativen Chemotherapie behandelt worden sein. Für das Gesamtüberleben wurden insgesamt 690, für das rezidivfreie Überleben 590 Patientinnen untersucht.

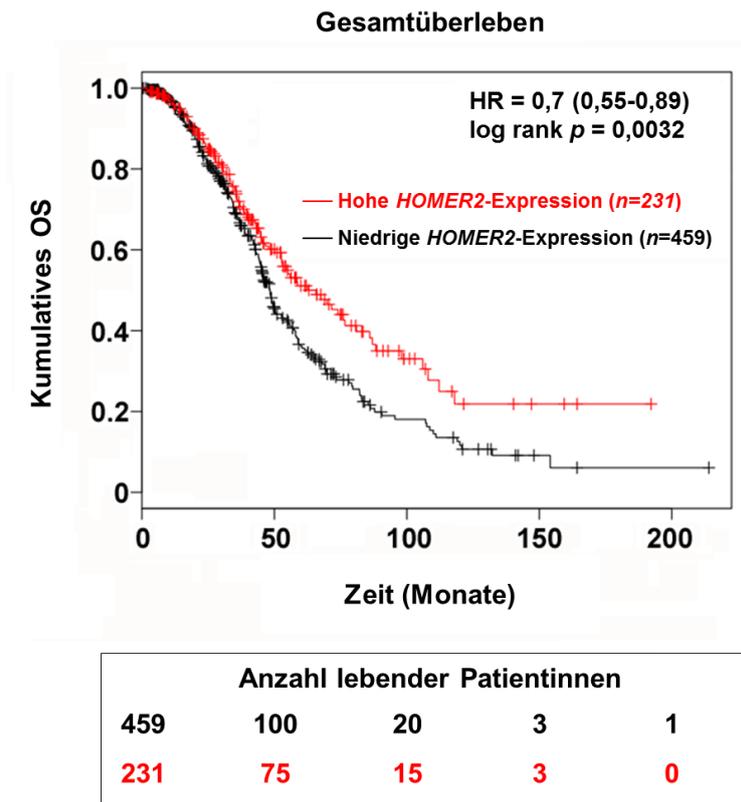
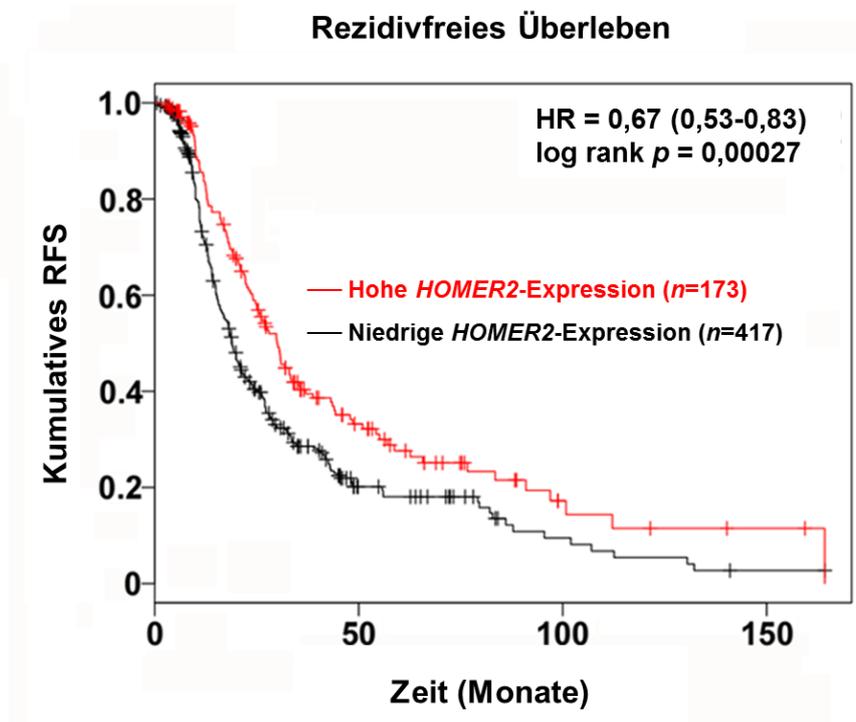


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Assoziation zwischen der *HOMER2*-Expression und dem Gesamtüberleben von  $n = 690$  Patientinnen anhand des „KM-Plotters“: <http://kmplot.com>, (*HOMER2* Affymetrix ID: 217080\_s\_at), Stand: 23.02.2015. Cut-off Werte, die eine hohe bzw. eine niedrige *HOMER2*-Expression festlegten, wurden hier durch den Median definiert.

In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass das Kollektiv der Patientinnen, welches eine hohe *HOMER2*-Expression zeigte einen Vorteil in Bezug auf das Gesamtüberleben hatte. Dabei lag die Hazard-Ratio bei 0,7. Dies sagt Folgendes für den beobachteten Zeitraum aus: die Wahrscheinlichkeit an dem Ovarialkarzinom zu sterben war für das Kollektiv an Patientinnen mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression um 30 % höher, als für das Patientinnenkollektiv mit einer hohen *HOMER2*-Expression. Der P-Wert war mit  $p = 0,0032$  signifikant. Anhand der Anzahl lebender Patientinnen waren die Patientinnenzahlen mit einer hohen *HOMER2*-Expression (rot) und mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression (schwarz) zum Zeitpunkt von 0, 50, 100, 150, 200 Monaten zu sehen. Durch diese Zahlen war ein weiteres Mal belegt, welchen Vorteil eine hohe *HOMER2*-Expression gegenüber einer niedrigen *HOMER2*-Expression hatte. Von 459 Patientinnen mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression lebten nach 50 Monaten noch 100 Patientinnen. Dies machte einen Anteil von 22 Prozent aus. Bei der Gruppe von Patientinnen mit einer hohen *HOMER2*-Expression waren zu Beginn

231 Patientinnen am Leben. Nach 50 Monaten waren es noch 75 Patientinnen. Die 75 Patientinnen machten einen Anteil von 33 Prozent aus. Dies bedeutet, dass nach 50 Monaten 11 % weniger Patientinnen des Kollektivs mit einer hohen *HOMER2*-Expression gestorben waren.



Anzahl rezidivfreier Patientinnen			
417	30	7	1
173	33	6	2

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Assoziation zwischen der *HOMER2*-Expression und dem rezidivfreien Überleben von  $n = 590$  Patientinnen anhand des „KM-Plotters“: <http://kmplot.com>, (*HOMER2* Affymetrix ID: 217080\_s\_at), Stand: 23.02.2015. Cut-off Werte, die eine hohe bzw. eine niedrige *HOMER2*-Expression festlegten, wurden hier durch den Median definiert.

Betrachtet man nun die Daten des KM-Plotters, unter den gleichen Modifikationen wie für das Gesamtüberleben, für das rezidivfreie Überleben an 590 Patientinnen, so zeigte sich beim rezidivfreien Überleben, wie es sich schon beim Gesamtüberleben zeigte, für das Kollektiv der Patientinnen mit einer hohen *HOMER2*-Expression ein Vorteil gegenüber dem Kollektiv der Patientinnen mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression. Die Hazard-Ratio betrug hier 0,67, bei einem signifikanten P-Wert von  $p = 0,00027$ .

Die größeren Kollektive von Expressionsdaten des KM-Plotters mit 690 und 590 Ovarialkarzinompatientinnen zeigten deutlich den Überlebensvorteil der Patientinnenkollektive mit einer hohen *HOMER2*-Expression gegenüber den Patientinnenkollektiven mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression. Anhand der Anzahl rezidivfreier Patientinnen konnte man sehen, dass nach 50 Monaten noch 30 von 417 Patientinnen der Gruppe mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression ein rezidivfreies Leben führten, gegenüber 33 von 173 Patientinnen der Gruppe mit einer hohen *HOMER2*-Expression. Die 30 Patientinnen der 417 der Gruppe der Patientinnen mit einer niedrigen *HOMER2*-Expression machten 7 Prozent aus; verglichen mit den 33 Patientinnen der 173 Patientinnen mit einer hohen *HOMER2*-Expression war der Wert niedrig, da die 33 Patientinnen einen Anteil von 19 Prozent ausmachten. Dies bedeutet prozentual nach 50 Monaten, dass 12 % weniger Patientinnen unter dem Kollektiv mit einer hohen *HOMER2*-Expression ein Rezidiv bekommen hatten.

#### 4.10 Etablierung eines Tissue Micro Arrays (TMAs)

Nachdem die Assoziation der *HOMER2*-mRNA Expression mit dem Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen anhand eines größeren, unabhängigen Kollektivs bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 4.8), sollte in einem weiteren Schritt die *HOMER2*-Expression auf Proteinebene untersucht werden.

Hierzu wurden in einem ersten Schritt zwei TMAs mit insgesamt  $n = 46$  Tumoren hergestellt, die jeweils mit drei Stanzten pro Tumor vertreten waren.

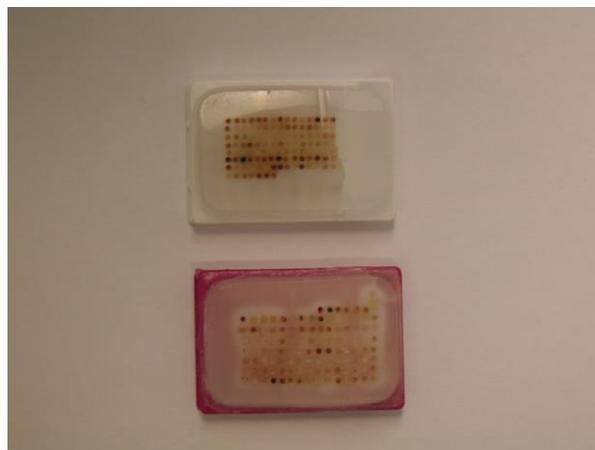


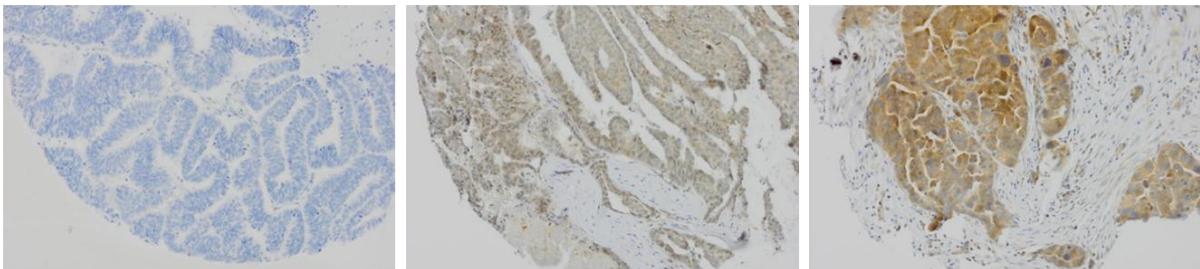
Abbildung 11: Fertiggestellte TMAs, die die gleichzeitige Untersuchung von 46 Ovarialkarzinomen erlaubten.

## 4.11 Identifizierung eines HOMER2-spezifischen Antikörpers

Zur Identifizierung eines HOMER2-spezifischen Antikörpers wurden verschiedene Verfahren zur Antigendemaskierung, verschiedene Konzentrationen von Antikörpern und verschiedene Antikörper ausgetestet (siehe Kapitel Material und Methoden, Tabelle 11, Seiten 28-30). Mit den polyklonalen Antikörpern der Firmen Antibodies-online GmbH, Abcam und Santa Cruz konnten auch nach Austestung verschiedener Antigendemaskierungsmethoden und Antikörperkonzentrationen keine spezifischen Färbungen erzielt werden.

Mit dem polyklonalen Antikörper des Herstellers Sigma (Produkt-Nr.:HPA 040134) unter der Verwendung des Verfahrens der Antigendemaskierung mit der DAKO Target Retrieval Solution (pH-Wert 6,0) bei einer Verdünnung von 1/200 konnte dagegen eine spezifische Färbung ohne Hintergrundfärbung erzielt werden (siehe Abbildung 12).

**20-fach vergrößert:**



**63-fach vergrößert:**

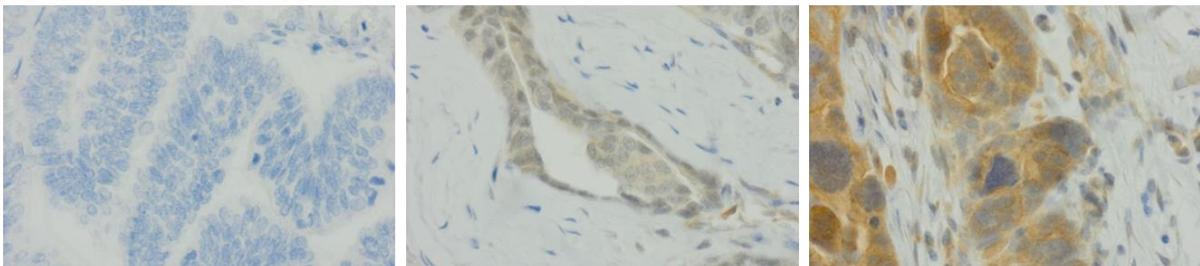


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen zum spezifischen Nachweis der HOMER2-Expression in Ovarialkarzinomgeweben mit 24 negativ (links), 13 schwach positiv (Mitte) und 9 stark positiv (rechts).

Die auf Messungen der mRNA beruhenden Daten zeigten an verschiedenen Kollektiven und mit verschiedenen Methoden, dass *HOMER2* und seine Expression ein möglicher Marker für das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben ist (siehe Kapitel 4.6-4.8). Nachfolgend sollte daher untersucht werden, ob auch die *HOMER2*-Expression auf Proteinebene eine Relevanz für das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben zeigt.

Mit Hilfe der hergestellten TMAs war es möglich, die *HOMER2*-Expression der Gewebeproben, die zuvor auf mRNA-Ebene ermittelt worden war, auf Proteinebene mit Hilfe der Immunhistochemie zu untersuchen. Die Beurteilung der gefärbten TMA-Schnitte wurde unter dem Mikroskop vorgenommen. Wie in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt, konnte eine zytoplasmatische Färbung unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden.

Um die unterschiedlichen Färbungen der einzelnen Proben beschreiben und miteinander vergleichen zu können, wurde ein semiquantitativer Score mit einer dreifachen Aufteilung angewendet: negativ (0) = keine Färbung, schwach positiv (+1) = schwache Färbung und stark positiv (+2) = starke Färbung. Abbildung 12 zeigt exemplarisch die verschiedenen Graduierungen des semiquantitativen Scores anhand von Aufnahmen in 20- und 63-facher Vergrößerung. Die Stärke der Färbung ging mit der Intensität der Braunfärbung einher. Eindeutig war auf den linken beiden histologischen Aufnahmen in Abbildung 12 keine Färbung zu sehen. Dies bedeutete: gegenüber den mittleren und den rechten Bildern konnte bei diesem Gewebe auf Proteinebene kein *HOMER2* nachgewiesen werden; somit war dieses Gewebe als negativ zu bewerten. Die Aufnahmen in der Mitte und Rechts zeigten eine Braunfärbung, welche mit dem Nachweis von *HOMER2* auf Proteinebene einherging. Zu sehen war, dass diese Anfärbungen v.a. zytoplasmatische Anfärbungen waren. Der Unterschied zwischen den mittleren und den rechten Aufnahmen der Abbildung 12 war in der Intensität der Braunfärbung zu suchen, die mit einem Unterschied in der Expression von *HOMER2* einherging.

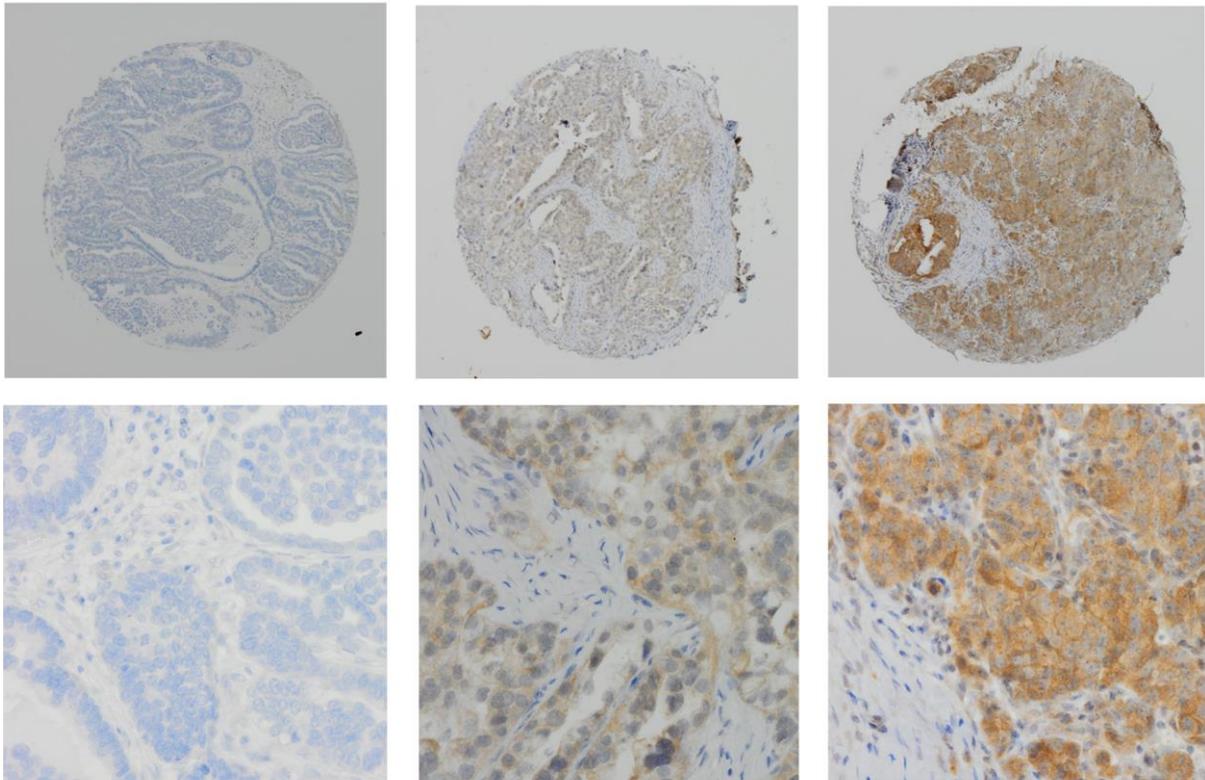


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbungen zum spezifischen Nachweis der HOMER2-Expression in Ovarialkarzinomgeweben mit 24 negativen (links), 13 schwach positiven (Mitte) und 9 stark positiven Tumoren (rechts). Die oberen Aufnahmen sind mit einer 10-fachen und die unteren Aufnahmen mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die Korrelation zwischen den erhobenen qPCR-Daten mit den ermittelten Expressionswerten auf Proteinebene zeigte keine Signifikanz (Pearson Chi-Quadrat-Test  $p=0.4$ )(siehe Abb.14).

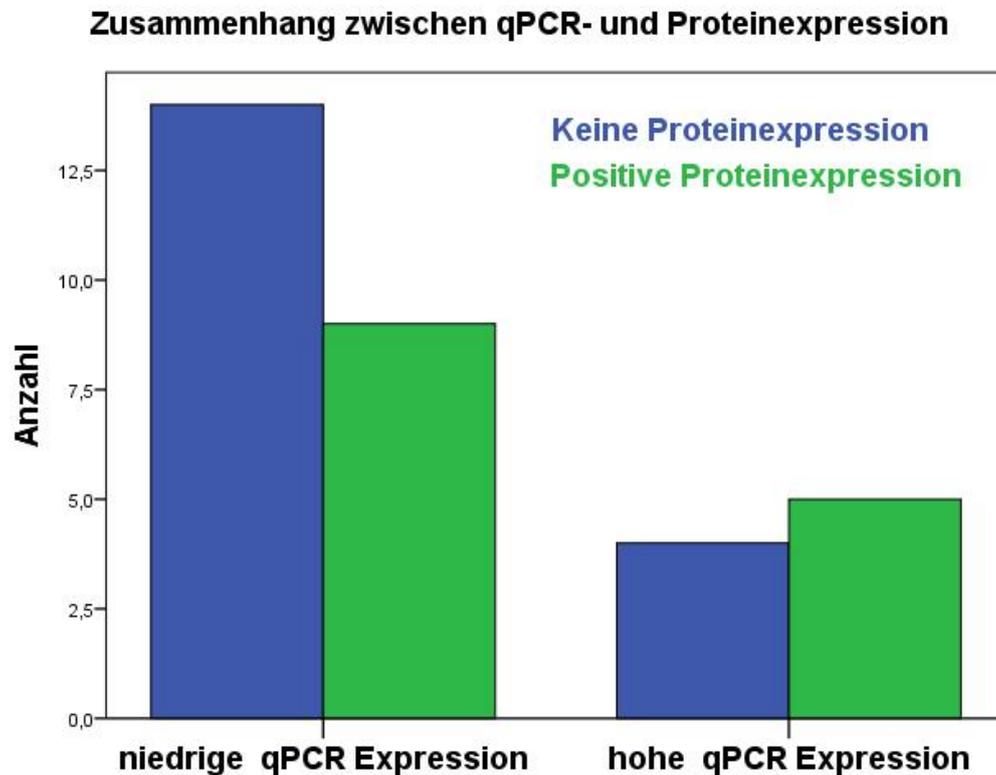


Abbildung 14: Balkendiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen den erhobenen qPCR-Daten und den ermittelten Proteinexpressionswerten.

#### **4.12 Assoziation der HOMER2-Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Merkmalen**

Um eine mögliche Assoziation zwischen der HOMER2-Proteinexpression und verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen der Tumore herauszuarbeiten, wurde das vorliegende Kollektiv in zwei Gruppen unterteilt: die Gewebe der einen Gruppe zeigten keine HOMER2-Expression (Score 0), die Gewebe der anderen Gruppe zeigten eine positive Expression (1+ oder 2+), wobei nicht weiter zwischen schwacher und starker Expression unterschieden wurde.

Tabelle 12: Assoziation zwischen verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen und der HOMER2-Proteinexpression (keine versus positive Expression). Signifikante Assoziationen sind mit einem \* markiert. Die entsprechenden Signifikanzwerte wurden mit dem exakten Test nach Fischer<sup>1</sup> bzw. dem Chi-Quadrat-Test<sup>2</sup> berechnet.

	Positive HOMER2-Expression	Keine HOMER2-Expression	P-Wert
<b>Karzinome (n = 46)</b>	<b>22 (48 %)</b>	<b>24 (52 %)</b>	
<b>Alter bei Diagnose</b>			<b>0,543<sup>1</sup></b>
< 60 Jahre	7 (33 %)	11 (46 %)	
≥ 60 Jahre	14 (67 %)	13 (54 %)	
<b>Histologischer Typ</b>			<b>0,477<sup>1</sup></b>
Serös	16 (84 %)	17 (74 %)	
Nicht serös	3 (16 %)	6 (26 %)	
<b>Nodalstatus</b>			<b>0,907<sup>2</sup></b>
N0	6 (28,6 %)	8 (35 %)	
N1	10 (47,6 %)	10 (43 %)	
Nx	5 (23,8 %)	5 (22 %)	
<b>Histopathologische Graduierung (Grading)</b>			<b>0,017*<sup>1</sup></b>
2	5 (24 %)	0 (0 %)	
3	16 (76 %)	24 (100 %)	
<b>Postoperativer Tumorrest</b>			<b>1,0<sup>1</sup></b>
0 cm Tumorfrei	11 (52 %)	12 (52 %)	
> 0 und <1 cm	10 (48 %)	11(48 %)	
<b>FIGO Stadium</b>			<b>0,151<sup>1</sup></b>
III	14 (67 %)	21 (87,5 %)	
IV	7 (33 %)	3 (12,5 %)	
<b>Aszitesvolumen</b>			<b>0,359<sup>1</sup></b>
< 500 ml	14 (70 %)	13 (54 %)	
≥ 500 ml	6 (30 %)	11 (46 %)	

	Positive HOMER2-Expression	Keine HOMER2-Expression	P-Wert
<b>Art der Chemotherapie</b>			<b>0,521<sup>1</sup></b>
Platin	8 (38 %)	6 (26 %)	
Platin-Taxane	13 (62 %)	17 (74 %)	

Die Ergebnisse der in Tabelle 12 dargestellten Analyse der Assoziation zwischen der HOMER2-Proteinexpression und verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen zeigten weder für das Alter bei Diagnose, den histologischen Typ, den Nodalstatus, den postoperativen Tumorrest, das FIGO-Stadium noch für das Aszitesvolumen eine signifikante Assoziation. Interessanterweise konnte aber bei der histopathologischen Graduierung (Grading) eine signifikante Assoziation mit  $p = 0,017$  nachgewiesen werden. Die Gruppe, die keine HOMER2-Expression aufwies ( $n = 24$ ), hatte zu 100% die histopathologische Graduierung 3. Während die Gruppe mit der positiven HOMER2-Expression sich aufteilte in 24 % ( $n = 5$ ), die eine histopathologische Graduierung 2 und 76 % ( $n = 16$ ), die eine histopathologische Graduierung 3 hatten.

**Verteilung der histopathologischen Graduierung (Grading)**

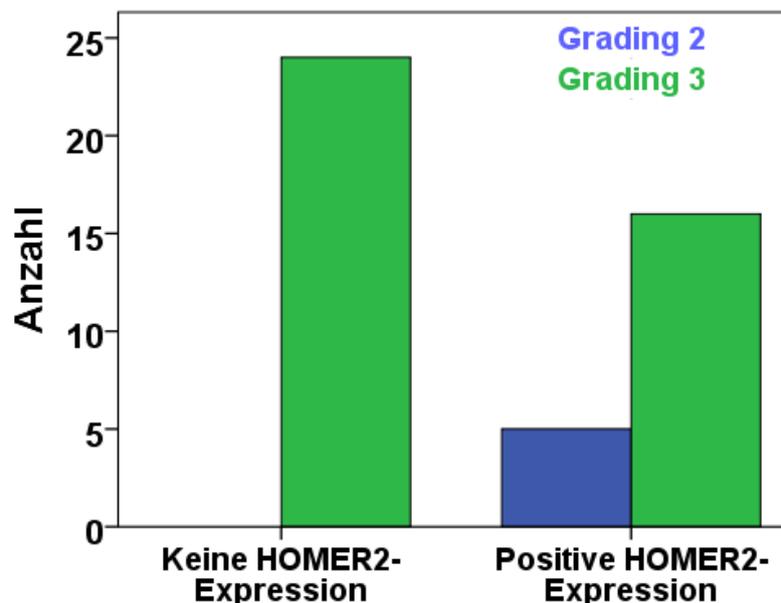


Abbildung 15: Balkendiagramm zur Darstellung der Assoziation zwischen Grading und HOMER2-Proteinexpression.

#### 4.13 Assoziation der HOMER2-Expression auf Proteinebene mit dem Gesamtüberleben und der Zeit bis zum Rezidiv mittels Kaplan-Meier-Analysen

Um zu untersuchen, ob das Überleben der Patientinnen auch mit der HOMER2 Protein-Expression assoziiert ist, wurde das untersuchte Kollektiv wiederum in die beiden oben beschriebenen Gruppen unterteilt: die Gewebe der einen Gruppe zeigten keine HOMER2-Expression (Score 0), die Gewebe der anderen Gruppe zeigten eine Expression (1+ oder 2+), wobei nicht weiter zwischen schwacher und starker Expression unterschieden wurde. Die nachfolgende Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analysen bzgl. des Gesamt- und des rezidivfreien Überlebens. Wichtig zu erwähnen ist außerdem, dass das Verhältnis zwischen den Proben mit negativer HOMER2-Expression mit  $n = 24$  und den Proben mit einer positiven HOMER2-Expression mit  $n = 22$  recht ausgeglichen war, sodass sich die beiden Gruppen in den Fallzahlen nicht wesentlich unterschieden.

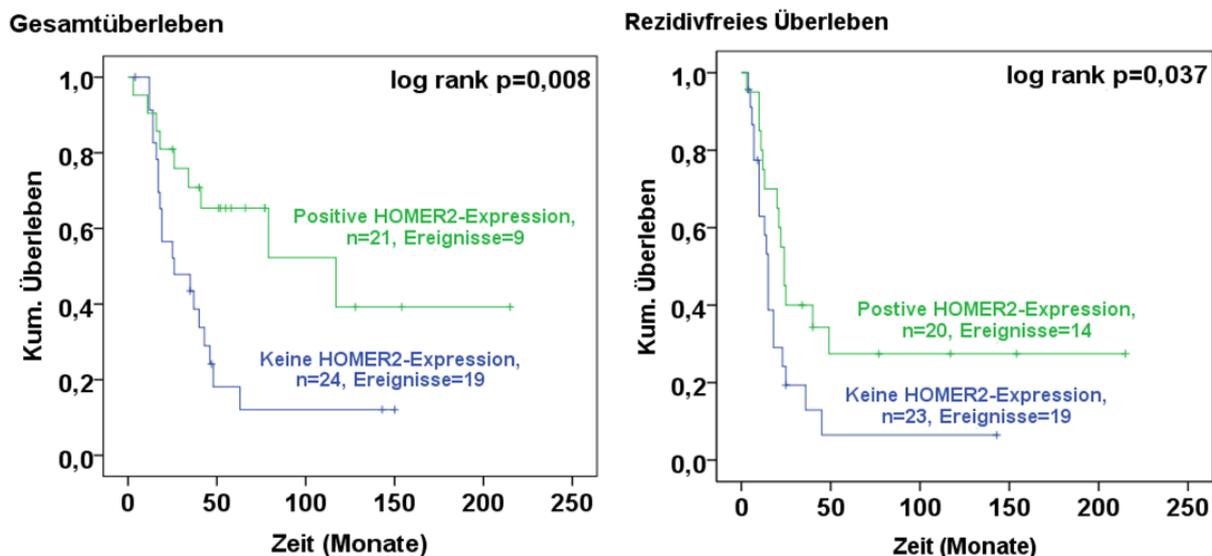


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Assoziation der HOMER2-Proteinexpression und dem Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben bei insgesamt 45 bzw. 43 Ovarialkarzinompatientinnen.

Sowohl für das Gesamt-, wie auch für das rezidivfreie Überleben zeigten die P-Werte mit  $p = 0,008$  und  $p = 0,037$  eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen HOMER2-Expression auf Proteinebene und einem verlängerten Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben. Beim rezidivfreien Überleben hatten die Patientinnen mit

einer niedrigen HOMER2-Expression im Median 15 Monate ohne Diagnose eines Rezidivs gelebt, wobei die Patientinnen mit einer hohen HOMER2-Expression 24 Monate im Median zeigten. Dies bedeutete einen Unterschied von 9 Monaten. Noch deutlicher war der Unterschied beim medianen Gesamtüberleben. Für das Kollektiv an Patientinnen mit einer niedrigen HOMER2-Expression lag das mediane Gesamtüberleben bei 26 Monaten und für das Patientinnenkollektiv mit einer hohen HOMER2-Expression bei 117 Monaten. Dies war ein Unterschied von 91 Monaten (7,58 Jahre). Somit konnte die Assoziation zwischen der HOMER2-Expression und dem Gesamtüberleben und/oder rezidivfreien Überleben der Ovarialkarzinompatientinnen nicht nur auf mRNA, sondern auch auf Proteinebene gezeigt werden.

#### **4.14 Multivariable Cox-Regressions-Analysen bzgl. des Gesamtüberlebens auf Proteinebene**

Nachdem mittels Kaplan-Meier-Analysen signifikante univariable Assoziationen zwischen der HOMER2-Proteinexpression und dem Überleben der Ovarialkarzinompatientinnen gezeigt werden konnten (siehe Kapitel 4.13), sollten in einem nächsten Schritt multivariable Cox-Regressionsanalysen durchgeführt werden, die neben der HOMER2-Expression weitere relevante klinisch-pathologische Faktoren berücksichtigen. Aufgrund der vergleichsweise geringen Ereigniszahlen ( $n = 28$  für das Gesamtüberleben und  $n = 33$  für das rezidivfreie Überleben) wurden jeweils zwei separate Regressionsmodelle berechnet. Im ersten Modell (Modell I) wurden neben der HOMER2-Expression (nicht vorhanden versus vorhanden) der postoperative Tumorrest (0 cm versus  $>0$  cm und  $<1$  cm) und das FIGO-Stadium (III versus IV) berücksichtigt. Im zweiten Modell (Modell II) wurden dann neben der HOMER2-Expression der Nodalstatus (N0 versus N1 versus Nx) und die histopathologische Graduierung (Grading) (2 versus 3) mit einbezogen.

Tabelle 13: Multivariable Cox-Regressionsanalyse bzgl. des Gesamtüberlebens (Modell I).

Variable	HR	CI	P
<b>HOMER2-Expression</b>			<b>0,017*</b>
Nicht vorhanden	1		
Vorhanden	0,355	(0,152-0,830)	
<b>Tumorrest</b>			<b>0,050</b>
0 cm	1		
> 0 cm und < 1 cm	1,179	(1,00-1,390)	
<b>FIGO</b>			<b>0,448</b>
III	1		
IV	0,649	(0,212-1,983)	

HR = Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI); FIGO, Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique. \*Statistisch signifikant ab  $p < 0,05$ .

Tabelle 14: Multivariable Cox-Regressionsanalysen bzgl. des Gesamtüberlebens (Modell II).

Variable	HR	CI	P
<b>HOMER2-Expression</b>			<b>0,018*</b>
Nicht vorhanden	1		
Vorhanden	0,325	(0,127-0,827)	
<b>Nodalstatus</b>			<b>0,035*</b>
N0	1		
N1	1,477	(0,552-3,954)	
Nx	3,764	(1,294-10,953)	

Variable	HR	CI	P
<b>Histopathologische Graduierung (Grading)</b>			<b>0,215</b>
<b>2</b>	1		
<b>3</b>	0,400	(0,094-1,705)	

HR = Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI); FIGO, Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique. \*Statistisch signifikant ab  $p < 0,05$ .

Für das Gesamtüberleben hatte sich in den Modellen I und II der multivariablen Cox-Regression HOMER2 mit  $p = 0,017$  und  $p = 0,018$  als signifikant gezeigt. Weiter war für das Gesamtüberleben der Nodalstatus (N0 versus N1 versus Nx) signifikant. Der postoperative Tumorrest verfehlte mit  $p = 0,05$  nur knapp die Signifikanzschwelle. Die histopathologische Graduierung (Grading) (2 versus 3), und das FIGO-Stadium (III versus IV) waren nicht signifikant. Dass die histopathologische Graduierung und das FIGO-Stadium nicht signifikant waren, lag möglicherweise daran, dass im vorliegenden Kollektiv nur fortgeschrittene Tumore untersucht wurden. Die Hazard-Ratio lag für die HOMER2-Expression bei 0,355 und 0,325 und bedeutete, dass die Wahrscheinlichkeit für das Ereignis des Todes für die Patientinnen mit vorhandener HOMER2-Expression um ca. 65 % niedriger war, als für die Vergleichsgruppe bei der keine HOMER2-Expression vorhanden war. Dies verdeutlicht abermals das Potenzial von HOMER2 als prognostischen Marker.

#### **4.15 Multivariable Cox-Regressions-Analysen bzgl. des rezidivfreien Überleben auf Proteinebene**

Wie auch schon für das Gesamtüberleben wurde in einem nächsten Schritt die HOMER2-Proteinexpression zusammen mit klinisch-pathologischen Faktoren in zwei multivariablen Cox-Regressionsmodellen für das rezidivfreie Überleben analysiert. Auch hier wurden aufgrund der vergleichsweise geringen Ereigniszahlen ( $n = 28$  für das Gesamtüberleben und  $n = 33$  für das rezidivfreie Überleben) jeweils zwei separate Regressionsmodelle berechnet. Im ersten Modell wurden die Faktoren der HOMER2-Expression (vorhanden versus nicht vorhanden), der Tumorrest (0 cm versus  $> 0$  cm und  $< 1$  cm) und das FIGO-Stadium (III versus IV) berechnet. Im

zweiten Modell wurden die HOMER2-Expression, der Nodalstatus (N0 versus N1 versus Nx) und die histopathologische Graduierung (Grading) (2 versus 3) berechnet.

Tabelle 15: Multivariable Cox-Regressionsanalyse bzgl. des rezidivfreien Überlebens (Modell I).

Variable	HR	CL	P
<b>HOMER2-Expression</b>			<b>0,018*</b>
Nicht vorhanden	1		
Vorhanden	0,383	(0,173-0,847)	
<b>Tumorrest</b>			<b>0,001*</b>
0 cm	1		
> 0 cm und < 1 cm	1,298	(1,110-1,517)	
<b>FIGO</b>			<b>0,940</b>
III	1		
IV	0,965	(0,379-2,452)	

HR = Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI); FIGO, Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique. \*Statistisch signifikant ab  $p < 0,05$ .

Tabelle 16: Multivariable Cox-Regressionsanalyse bzgl. des rezidivfreien Überlebens (Modell II).

Variable	HR	CI	P
<b>HOMER2-Expression</b>			<b>0,039*</b>
Nicht vorhanden	1		
Vorhanden	0,443	(0,204-0,961)	
<b>Nodalstatus</b>			<b>0,013*</b>
N0	1		
N1	1,394	(0,580-3,347)	
Nx	4,439	(1,540-12,798)	

Variable	HR	CI	P
<b>Histopathologische Graduierung (Grading)</b>			<b>0,504</b>
2	1		
3	0,627	(0,159-2,469)	

HR = Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI); FIGO, Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique. Statistisch signifikant ab  $p < 0,05$ .

Für das rezidivfreie Überleben war die Expression von HOMER2 im Modell I und II der multivariablen Cox-Regression mit  $p = 0,018$  und  $p = 0,039$  signifikant. Weiter war im Modell I der Tumorrest (0 cm versus  $> 0$  cm und  $< 1$  cm) mit  $p = 0,001$  und in Modell II der Nodalstatus (N0 versus N1 versus Nx) mit  $p = 0,013$  signifikant. Die histopathologische Graduierung (Grading) (2 versus 3) und das FIGO-Stadium (III versus IV) waren, wie schon beim Gesamtüberleben nicht signifikant. Die Hazard-Ratio lag für die HOMER2-Expression bei 0,383 und 0,443.

## 5 Diskussion

Ziel der hier vorgestellten medizinischen Doktorarbeit war die Validierung array-basierter mRNA-Daten ( $n = 103$ ) bzgl. des Gens *HOMER2* und dessen Potential als überlebensassoziierter Biomarker für das sporadische Ovarialkarzinom. Hierzu wurden die microarray-basierten mRNA-Expressionsdaten bzgl. des Gens *HOMER2* mit einer unabhängigen Analysetechnik, der qPCR, überprüft und nachfolgend ihre Assoziation mit dem Überleben an einem größeren, unabhängigen Kollektiv mit Hilfe des „KM-Plotters“ ([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com)) validiert. Anschließend wurde die *HOMER2*-Expression auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurden zwei TMAs angefertigt, ein für *HOMER2* spezifischer Antikörper identifiziert und anhand von immunhistochemischen Färbungen die prognostische Relevanz der *HOMER2*-Proteinexpression analysiert.

### *1. Validierung der array-basierten mRNA-Expressionsdaten mittels qPCR*

Im ersten Teil der hier vorgelegten Arbeit sollten array-basierte mRNA-Expressionsdaten zu *HOMER2* mit einer unabhängigen Technik bestätigt werden. Hierzu sollte ein repräsentatives Kollektiv ( $n = 41$ ) an Tumoren mittels qPCR untersucht und die erzielten Ergebnisse mit den array-basierten Daten verglichen werden. Die qPCR sollte verwendet werden, da diese Technik, im Gegensatz zur microarray-basierten Analyse, keine zuvor linear amplifizierte RNA einsetzt. Die Hybridisierung linear amplifizierter RNA auf microarrays hat zwar den Vorteil, dass mit einer sehr geringen RNA-Menge (ca. 500 ng Ausgangsmaterial) mehrere tausend Gene gleichzeitig untersucht werden können - sie birgt aber unter Umständen die Gefahr einer möglichen Verschiebung der ursprünglichen Transkriptkonzentrationsverhältnisse - die zu verfälschten Ergebnissen führen könnte [47]. Die qPCR benötigt zwar mehr Ausgangsmaterial - in dieser Arbeit wurden 500 ng cDNA pro Reaktion eingesetzt - die oben beschriebene Gefahr ist jedoch hier nicht gegeben, da die RNA vorab nicht linear amplifiziert wird. Das Ergebnis des Vergleichs war mit einer signifikanten ( $p < 0,001$ ), positiven Korrelation ( $r = 0,903$ ) zwischen den Illumina-Chip-Daten und den Daten der qPCR deutlich. Dies bedeutet, dass die mittels array generierten Expressionsdaten mit Hilfe einer unabhängigen Methode bestätigt werden konnten.

## *2. Validierung der Assoziation der mRNA-Expressionsdaten mit dem Überleben an einem unabhängigen Kollektiv*

Im nächsten Schritt wurde die Assoziation der mRNA-Expressionsdaten der array-basierten Daten und der qPCR-Daten mit dem Überleben an einem größeren, unabhängigen Kollektiv überprüft. Hierzu wurde ein unabhängiges Kollektiv des „KM-Plotters“ ([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com)) verwendet. Für das rezidivfreie Überleben waren Fremddaten der mRNA-Expression von 590 und für das Gesamtüberleben Fremddaten von 690 Patientinnen vorhanden. Sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das rezidivfreie Überleben zeigte sich die Assoziation einer hohen *HOMER2*-Expression mit einem verlängerten Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben. Dabei war die Assoziation mit einem P-Wert von  $p = 0,0032$  und  $0,00027$  signifikant und bestätigte die mRNA-Daten des Illumina-Chips und die der qPCR eindeutig. Die Überprüfung der Daten des Illumina-Chips und der qPCR war aus den Fallzahlen mit  $n = 103$  für den Illumina-Chip und  $n = 41$  für die qPCR wichtig, da sich mögliche Verzerrungen aus den relativ kleinen Fallzahlen hätten ergeben können.

## *3. Untersuchung der HOMER2-Proteinexpression*

Um nun die Expression von *HOMER2* auf Proteinebene zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei TMAs hergestellt und anschließend immunhistochemische Färbungen mit einem *HOMER2*-spezifischen Antikörper durchgeführt. Der Vorteil der TMAs gegenüber den Großflächenschnitten lag in der Möglichkeit, verschiedene Proben von mehreren Patientinnen unter denselben und nicht, wie zuvor bei den Großflächenschnitten, unter den gleichen Bedingungen testen zu können. Dem möglichen Nachteil, dass die Stanzen nur 0,6 mm Durchmesser hatten und so der zu stanzende Abschnitt aufgrund der Heterogenität der Tumoren nicht repräsentativ für das zu untersuchende Gewebe wäre, wurde durch dreimaliges Stanzen jeder Probe an jeweils unterschiedlichen Stellen des Gewebes entgegengewirkt. Hinzu kommt, dass in Validierungsstudien, die TMAs mit ihren Großflächenschnitten verglichen haben, diese möglichen Bedenken widerlegt wurden, da die Übereinstimmung der vergleichsweise kleinen Proben auf dem TMA mit ihren Großflächenschnitten bei Entnahme dreier Stanzen aus jedem Gewebe repräsentativ war [4, 29]. Die immunhistochemischen Färbungen der TMAs mit  $n = 46$  Tumorproben wurde mit einem Antikörper der Firma Sigma bei einer Verdünnung von 1/200 unter der Methode der Antigendemaskierung mittels des DAKO Target Retrieval Solution Kit

pH 6,0 durchgeführt. Die immunhistochemische Färbung bestätigte HOMER2, wie schon zuvor durch verschiedene Verfahren und Kollektive auf mRNA-Ebene, auf Proteinebene als prognostischen Marker. Sowohl für das Gesamt- als auch für das rezidivfreie Überleben konnte eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen HOMER2-Expression und einem verlängerten Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben gezeigt werden. Für das Gesamtüberleben in der univariablen Kaplan Meier Analyse lag der P-Wert bei  $p = 0,008$  und für das rezidivfreie Überleben bei  $p = 0,037$ . Die Expression von HOMER2 wurde somit im Zusammenhang mit einem verlängerten Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben über die immunhistochemische Färbung anhand eines semiquantitativen Scores auf Proteinebene bestätigt. Auch in den nachfolgend durchgeführten multivariablen Cox-Regressionsanalysen, in die neben der HOMER2 Expression sowohl der postoperative Tumorrest, das FIGO-Stadium, der Nodalstatus und die histopathologische Graduierung einfließen, konnte die HOMER2 Expression als unabhängiger Faktor bestätigt werden (siehe Kapitel Kapitel 4.14 und 4.15). Bei diesen Analysen ist zu beachten, dass der Tumorrest und das FIGO-Stadium als die entscheidenden klinischen Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom gewertet werden. Darüber hinaus ist der Nodalstatus ein abhängiger Faktor, da nur eine Lymphadenektomie bei Tumorrest 0, bzw.  $< 1\text{cm}$  vorgenommen wird.

#### *4. Biomarker und prognostische Faktoren beim Ovarialkarzinom*

Die klassischen klinisch-pathologischen Faktoren, die für Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom zur Prognoseabschätzung verwendet werden, umfassen das Tumorstadium, das Alter der Patientinnen, den Allgemeinzustand, den histologischen Typ, die histopathologische Graduierung (Grading), die Metastasen, den Tumorrest nach OP und das Ansprechen auf die Chemotherapie [23]. Allerdings sind diese prognostischen Faktoren keine ausreichenden Prädiktoren für das Gesamtüberleben und/oder das rezidivfreie Überleben. Hinzu kommt, dass sie keine biologischen Erklärungen für das Verhalten von Tumoren geben [18]. Eine biologische Erklärung für die Entstehung bzw. das Verhalten von Tumoren ist allerdings für das Verständnis und die daraus möglicherweise entstehende Therapie wichtig. Das gezielte Eingreifen in z. B. Signalwege mittels sog. „target therapies“ wäre ohne die Entdeckung der dazugehörigen Zielstrukturen nicht möglich. Die hier vorgestellte Arbeit soll im Sinne der Grundlagenforschung einen Beitrag dazu leisten.

Diese Arbeit hat HOMER2 als prognostischen Marker validiert. Die im Ergebnissteil dargelegte Beobachtung, dass eine hohe Expression von HOMER2, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene, signifikant mit einem längeren Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben, assoziiert war, bestätigte HOMER2 als prognostischen Marker. Denkbar wäre also, die HOMER2-Expression zur besseren Abschätzung des Gesamt- und rezidivfreien Überlebens heranzuziehen. Weitere in der Literatur noch besprochene prognostische Marker beim Ovarialkarzinom sind z.B. das Tumorsuppressorgen Tp53, die GFRs, EGFR und HER2/neu. Eine Metaanalyse ergab, dass bei aberranten Werten dieser Marker die Patientinnen eine schlechtere 5-Jahresüberlebensrate hatten, als Patientinnen mit Normwerten [19], [18]. Hinzu kommen Ansätze für Biomarker des Ovarialkarzinoms in Kombination mit CA-125 [3]. „Neue“ Biomarkerkandidaten, die in der Literatur genannt werden sind: HE4 (human epididymis protein 4), Mesothelin, Folat-Rezeptor alpha, Osteopontin und Kallikreine [3, 34, 53, 57, 61, 68, 71].

Dass HOMER2 auch ein prädiktiver Marker sein könnte, möchte ich im folgenden Absatz kurz erläutern. HOMER2 könnte prognostizieren, ob und wie die jeweiligen Patientinnen auf die Chemotherapie vermutlich ansprechen werden. Aus der Beobachtung, dass eine hohe Expression von HOMER2 auf mRNA- und Proteinebene mit einem signifikant längeren Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben nach dem Erhalt einer Chemotherapie assoziiert war, könnte geschlossen werden, dass diejenigen Patientinnen mit einer hohen HOMER2-Expression besser auf die Chemotherapie ansprechen. Somit könnte die Expression von HOMER2, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene, eine Unterteilung der Patientinnen in zwei Gruppen je nach Ansprechen auf die Chemotherapie erlauben und so Einfluss auf Intensität und Dauer der Therapie nehmen.

##### *5. Biomarker unter besonderer Berücksichtigung von HOMER2 im biologischen Kontext*

Biomarker sollten aus verschiedenen Gründen im biologischen Kontext betrachtet werden. Für die Analyse von Erkrankungen ist es unerlässlich, dass wir pathophysiologische Zusammenhänge erforschen und verstehen. Gerade bei malignen Prozessen, wie Tumoren, kann das Wissen über Veränderungen molekularer Zielstrukturen bzw. gestörte Signalwege das Verständnis für die

Entstehung und Behandlung steigern. Ein Beispiel dafür, dass die Kenntnis molekularer Strukturen zu einer zielgerichteten Therapie der Patientinnen geführt hat, ist die Entschlüsselung der molekularen Signalwege der chronisch myeloischen Leukämie (CML) und die daraus resultierende Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib [52].

HOMER2 war zuvor v.a. aus neuronalen Zusammenhängen bekannt. In verschiedenen Arbeiten wurde HOMER2 in Bezug mit Krankheiten wie Alkoholismus, Kokainabhängigkeit, Schizophrenie und Alzheimer gesetzt [17, 30, 31, 62]. In der Arbeit von Parisiadou et al. konnte gezeigt werden, dass HOMER2 und HOMER3 mit Amyloid Precursor Protein (APP) interagieren und so möglicherweise die A $\beta$ -Produktion reduziert wird [62]. In der Arbeit von Gould et al. wurde die Beziehung zwischen einer Cocain verursachten Imbalance zwischen HOMER2 versus HOMER1 und der Kokainabhängigkeit dargelegt [31]. In der Arbeit von Gilks et al. wurde das Gen *HOMER2* mit der Anfälligkeit für Schizophrenie in Verbindung gebracht [30].

Nachfolgend sollen nun zwei Hypothesen vorgestellt werden, die HOMER2 mit zwei Signalwegen in Verbindung bringt, die bei der Entstehung und Proliferation von Tumoren eine wichtige Rolle spielen.

### **Hypothese I**

Hypothese I basiert auf der in mehreren Arbeiten gezeigten Bindung von HOMER2 an die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 und 5 (mGluR1/5) [9, 39, 79] und den in weiteren Arbeiten gezeigten Zusammenhang zwischen mGluR und dem Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-AKT-Signalweges [35, 84]. In einer Arbeit von Lin et al. konnte die Aktivierung der PI3K durch die mGluR an motorischen Nervenendigungen und an Zellen des Zentralnervensystem gezeigt werden [44]. Glutamatrezeptoren sind Transmembranproteine, die v.a. aus neuronalen Strukturen bekannt sind und Glutamat binden. Besonders häufig kommen sie in postsynaptischen Membranen glutamaterger Synapsen vor. Bei den Glutamatrezeptoren gibt es die GluD2-, die ionotropen (iGluR) und metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR). Die iGluR werden unterteilt in: AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren. Die mGluR sind Transmembranproteine, die mit G-Proteinen gekoppelt sind. Sie werden in drei Gruppen aufgeteilt: Gruppe I: mGluR1 und 5, Gruppe II: mGluR2 und 3, Gruppe III: mGluR4, 6, 7 und 8 [84]. Die Gruppe I der mGluR aktivieren Second Messenger-Signalwege, wie die Phospholipase C und die

Phosphatidylinositol-3-Kinase. Weiter konnte gezeigt werden, dass bestimmte Glutamatrezeptoren über verschiedene Signalwege für das Wachstum, die Migration und die Invasion von Karzinomen verantwortlich sind [48, 75, 77, 84]. Der PI3K-AKT Signalweg ist einer der wichtigen Signalwege von Zellen in Bezug auf das zelluläre Überleben, das Zellwachstum und die Zellteilung. PI3K ist nach Vogelstein et al. einer der 12 Signalwege, denen man alle sog. „Drivergene“ zuordnen kann, die den Zellen, wenn sie aktiviert sind, einen selektiven Wachstumsvorteil verschaffen [86]. PI3K kann durch verschiedene Stimuli, wie z.B. durch die Aktivierung von Growth Faktor Rezeptoren, durch verschiedene Interleukine, Stress oder durch ein Ras-Protein aktiviert werden [13, 41, 45, 74]. Das aktive PI3K wiederum kann AKT mittels eines Second Messenger aktivieren. AKT ist auch unter dem Namen Protein-Kinase B bekannt und hat drei Isoformen, AKT1, AKT2 und AKT3 [2]. AKT fördert das zelluläre Überleben über verschiedene Wege und über die Inaktivierung von proapoptotischen Proteinen [6, 10, 14, 21]. AKT kann außerdem über die Inaktivierung von PTEN aktiviert werden [86]. Weiter ist AKT über den negativen Regulator von p53 MDM2 an dem Rückgang von p53 beteiligt [51, 89]. Über den Transkriptionsfaktor NF-kappa B wird die Genexpression von AKT für das Überleben gefördert [40, 65]. Auf den Zellmetabolismus nimmt AKT durch die Aktivierung von Proteinkinasen Einfluss [56, 72]. Die Zellproliferation wird von AKT über Mediatoren des Zellzyklus mit gesteuert [18, 82, 89].

Weiter spielt bei Ovarialkarzinomen die Dysregulation verschiedener Komponenten des AKT-Pfades eine Rolle. Veränderungen der Tumor-Suppressor-Phosphatase PTEN, welche für die Inaktivierung des AKT-aktivierenden Second Messenger zuständig ist, wurden in Ovarialkarzinomen gefunden [43, 59, 66, 69]. Hinzukommen erhöhte Spiegel von AKT1 und erhöhte Isoformen des AKT2, die in Ovarialkarzinomen entdeckt wurden [5, 45, 76]. Veränderungen von Untereinheiten der PI3K wurden als Onkogene beim Ovarialkarzinom beschrieben [63, 73].

Hypothese I postuliert, dass HOMER2 eine hemmende Funktion auf den metabotropen Glutamatrezeptorsignalweg ausübt, was wiederum eine Hemmung des PI3K-AKT-Signalwegs zur Folge hat. Durch die Hemmung dieses Signalwegs können die Tumorzellen entsprechend unter Chemotherapie schneller in die Apoptose übergehen. Dies würde das verlängerte Gesamtüberleben und auch das verlängerte rezidivfreie Überleben der Patientinnen erklären.

## **Hypothese II**

In der Literatur sind folgende Zusammenhänge beschrieben, die für das Verständnis der zweiten Hypothese wichtig sind. Die DNA-Reparatur hat vier wesentliche Reparaturmechanismen: die Umkehr des DNA-Schadens, die Exzisionsreparatur, die unterschieden wird in die Mismatch-Reparatur, Basen-Exzisionsreparatur und Nukleotid-Exzision und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen [83]. Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wird wieder unterschieden in die Nicht-Homologe End-Joining-Reparatur und die Reparatur durch die Homologe Rekombination [60]. Bei der Homologen Rekombination werden Doppelstrangbrüche durch die Vorlage des gesunden Chromatids unter Bildung einer Holliday-Struktur repariert [83]. BRCA1 ist u.a. für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA mittels Homologer Rekombination verantwortlich [81]. Genau diese Homologe Rekombination und dessen eventuelle Hemmung ist für die zweite Hypothese von Bedeutung. Beschrieben wurde von Ishibashi et al., dass HOMER2 an UBXN1 (UBX Domain Protein 1) bindet [38]. Wu-Baer und Kollegen wiederum konnten 2010 zeigen, daß UBXN1 seinerseits mit einem ubiquitin-assoziierten UBA-Motiv, autoubiquiniertes BRCA1 erkennt und die E3-Ligase-Aktivität von BRCA1/BARD1 hemmt [85]. Wobei die einzige bekannte enzymatische Funktion von BRCA1 die der E3-Ligase Aktivität ist [15, 33, 46, 88]. Aus diesen Zusammenhängen lässt sich die zweite Hypothese generieren:

Durch die Bindung von HOMER2 an UBXN1 verstärkt HOMER2 den hemmenden Effekt von UBXN1 auf die E3-Ligase Aktivität von BRCA1. Diese Hemmung beeinflusst möglicherweise die DNA-Reparatur negativ und fördert damit bei Patientinnen, die eine Chemotherapie erhalten haben, die Überführung von Krebszellen in die Apoptose. Dies könnte die verbesserte Prognose der Patientinnen bei hoher HOMER2-Expression erklären.

Der Zusammenhang zwischen einem gestörten DNA-Reparatursystem und einem verbesserten Ansprechen auf Chemotherapeutika wurde auch in der Literatur zuvor schon beschrieben. Bekannt ist z.B., dass diejenigen Zellen, die ein gestörtes DNA-Reparatursystem aufgrund von Mutationen in BRCA1 und BRCA2 haben, sensibler auf Chemotherapeutika reagierten und weiter ein gutes Ansprechen auf Poly-ADP-Ribose-Polymerase(PARP)-Inhibitoren zeigten [27, 37, 86]. PARP-Inhibitoren hemmen, aus einer Familie von Enzymen entweder PARP-1 oder PARP-1 und 2, wodurch die DNA-Reparation gehemmt und die Zytotoxizität von Chemotherapeutika gesteigert wird [20].

Betrachtet man nun die molekularen Veränderungen, die für maligne Transformationen in Ovarialkarzinomen entscheidend sind, so muss man davon ausgehen, dass es nicht einen alleinigen neoplastischen Entstehungsweg gibt. Deshalb ist es auch unwahrscheinlich, dass die Therapie des Ovarialkarzinoms Erfolg hat, wenn man nur eine Stufe der Karzinogenese angreift. Um die Tumortherapie zu verbessern, sollte man versuchen, in verschiedene Signalwege einzugreifen [18]. Hilfreich dabei wäre es, die Patientinnenkollektive in klinisch-pathologische Untergruppen in Bezug auf die Prognose und dem Ansprechen der Chemotherapeutika differenzieren zu können. Dazu waren Bemühungen, wie die des Human Genome Projekt wichtig, da sie es u.a. möglich gemacht haben, Tumoren auf molekulargenetischer Ebene sowie auf Proteinebene zu untersuchen [36]. Zur Differenzierung der Patientinnen in klinisch-pathologische Gruppen für die Prognose könnte HOMER2 einen Beitrag leisten; sicherlich nicht als einziger Marker, aber kombiniert mit z.B. den anderen oben genannten möglichen prognostischen Markern (siehe Seite 11-12, Punkt 2.9).

##### *5. Ausblick*

Im nächsten Abschnitt sollen mögliche Folgearbeiten und Anwendungen der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse erörtert werden.

Auf molekularer Ebene sollte die Funktion von HOMER2 weiter untersucht werden. Z.B. könnte über ein Zellsystem ermittelt werden, ob eine Steigerung der HOMER2-Expression zu einer Hemmung der E3-Ligase von BRCA1 oder dem mGluR führen würde, wie dies in den Hypothesen postuliert wurde.

Hinzu kommt, dass die in dieser Arbeit gezeigten Zusammenhänge an einem größeren Kollektiv von Patientinnen validiert werden sollten. Ferner wäre die Untersuchung der HOMER2-Expression und deren Assoziation mit dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben für Patientinnen mit einem Mammakarzinom sicherlich interessant.

Möglicherweise wäre es sinnvoll, den Zusammenhang von HOMER2 und PARP-Inhibitoren an BRCA-Mutationsträgerinnen zu untersuchen. PARP-Inhibitoren wurden besonders für BRCA-Mutationsträgerinnen als Hoffnung auf einen neuen Therapieansatz gesehen [2, 37, 80, 86]. Im Oktober 2014 erteilte die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) dem PARP-Inhibitor Olaparib für BRCA-Keimbahnmutationsträgerinnen mit einem Platin-sensitiven Ovarialkarzinom-rezidiv die Zulassung [25]. HOMER2 könnte eventuell die BRCA-Mutationsträgerinnen

weiter in Subgruppen in Bezug auf das Ansprechen unterteilen. Die Patientinnen mit einer hohen HOMER2-Expression, entsprechend der zweiten in dieser Arbeit vorgestellten Hypothese, hätten eine neben der BRCA-Mutation, zweite Hemmung der DNA-Reparatur. Zusammen mit den PARP-Inhibitoren hätten sie eine dreifache Hemmung der Reparatur der DNA-Schäden, die durch Chemotherapeutika verursacht wurden. Somit sollten die Tumorzellen, wie gewünscht, in Apoptose gehen. Dies könnte anhand der Daten der SOLO2-Studie mit Olaparib bei Patientinnen mit platinsensitiven Ovarialkarzinomrezidiven und BRCA-Mutation retrospektiv mittels Einteilung der Patientinnen in eine Gruppe mit nicht vorhandener HOMER-Expression und einer Gruppe mit vorhandener HOMER-Expression mit Hilfe der Immunhistochemie anhand von Gewebeproben der Patientinnen relativ kostensparsam mit dem semiquantitativen Score untersucht werden.

Wenn weitere Untersuchungen HOMER2 als prognostischen Marker bestätigen, wäre HOMER2 sicherlich ein sehr interessanter und aussagekräftiger Marker zur Unterteilung von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom in klinisch-pathologische Gruppen in Bezug auf die Prognose. Zusammen z.B. mit dem Tumorsuppressorgen Tp53, dem HE4, dem Mesothelin, dem Folat-Rezeptor alpha, dem Osteopontin und den Kallikreinen, wäre die Expression von HOMER2 ein wichtiges Indiz sowohl für das Gesamt- als auch für das rezidivfreie Überleben. Die Unterteilung anhand der HOMER2-Expression könnte direkt anschließen an den nach der OP bzw. während der OP stattfindenden Schnellschnitt und mit der Immunhistochemie und einem semiquantitativen Score recht einfach und schnell realisierbar sein; sie würde den behandelnden Ärzten eine differenziertere Prognose ermöglichen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der Doktorarbeit war die Validierung vorliegender array-basierter mRNA-Daten ( $n = 103$ ) bzgl. des Gens *HOMER2* und deren Potential als prognostischer Biomarker für das sporadische Ovarialkarzinom. Hierzu wurden die microarray-basierten mRNA-Expressionsdaten mit einer unabhängigen Analysetechnik, der qPCR, bei  $n = 41$  Tumoren überprüft und nachfolgend ihre Assoziation mit dem Überleben an einem größeren und unabhängigen Kollektiv mit Hilfe des „KM-Plotters“ ([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com)) validiert. Anschließend wurde die *HOMER2*-Expression auf Proteinebene untersucht. Die Beobachtung, dass eine hohe Expression von *HOMER2*, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene, signifikant mit einem längeren Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben, assoziiert war, bestätigt *HOMER2* als prognostischen Marker. Das Ergebnis der Korrelationsanalyse war mit einer hohen signifikanten ( $p < 0,001$ ), stark positiven Korrelation ( $r = 0,903$ ) zwischen den Illumina-Chip-Daten und den Daten der qPCR deutlich. Als nächster Schritt wurde die Assoziation der mRNA-Expressionsdaten der array-basierten Daten und der qPCR-Daten mit dem Überleben an einem größeren Kollektiv mittels KM-Plotter überprüft. Dazu standen Expressionsdaten für das rezidivfreie Überleben von 590 und für das Gesamtüberleben von 690 Patientinnen zur Verfügung. Sowohl für das Gesamt- als auch für das rezidivfreie Überleben zeigte sich der Zusammenhang einer hohen *HOMER2*-Expression mit einem verlängerten Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben. Dabei war die Assoziation mit einem P-Wert von  $p = 0,0032$  und  $0,00027$  hochsignifikant und bestätigte die mRNA-Daten des Illumina-Chips und die der qPCR eindeutig. Um nun die Expression von *HOMER2* auf Proteinebene zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen der TMAs von  $n = 46$  Tumorproben mit einem Antikörper der Firma Sigma bei einer Verdünnung von 1/200 unter der Methode der Antigendemaskierung mittels des DAKO Target Retrieval Solution Kit pH 6,0 durchgeführt. Auch hier zeigte sich sowohl für das Gesamt- als auch für das rezidivfreie Überleben eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen *HOMER2*-Expression und einem verlängerten Gesamtüberleben mit  $p = 0,008$  bzw. rezidivfreien Überleben mit  $p = 0,0037$ . Durch die TMAs wurde *HOMER2* somit auf Proteinebene als prognostischer Marker validiert, sodass eine klare Ausarbeitung von *HOMER2* als prognostischer Marker für das Ovarialkarzinom vorliegt. Denkbar

wäre also, die HOMER2-Expression zur besseren Abschätzung des Gesamt- und rezidivfreien Überlebens heranzuziehen.

Folgende zwei Hypothesen geben eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit dargestellte Assoziation der HOMER2-Expression und dem Überleben.

Durch den in der ersten Hypothese vorgestellten Zusammenhang zwischen mGluR, HOMER2 und PI3K wird die Aktivität von PI3K möglicherweise gehemmt und so der PI3K-AKT-Signalweg unterdrückt, sodass die Zellen schneller nach der Gabe der Chemotherapie in die Apoptose übergehen.

In der zweiten Hypothese wird durch die Bindung von HOMER2 an UBXN1, der hemmende Effekt von UBXN1 auf die E3-Ligase Aktivität von BRCA1 durch HOMER2 verstärkt. Diese Hemmung beeinflusst möglicherweise die DNA-Reparatur negativ und fördert damit bei Patientinnen, die eine Chemotherapie erhalten haben, die Überführung von Krebszellen in die Apoptose. Diese beiden Hypothesen würden das verlängerte Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben erklären.

Als mögliche Folgearbeiten sollte die Funktion von HOMER2 auf molekularer Ebene weiter untersucht werden. Hinzu kommt, dass die in dieser Arbeit gezeigten Zusammenhänge an einem noch größeren Kollektiv von Patientinnen validiert werden sollten. Ferner wäre die Untersuchung der HOMER2-Expression und deren Assoziation mit dem Überleben für Patientinnen mit einem Mammakarzinom sicherlich interessant. Möglicherweise wäre es auch sinnvoll, den Zusammenhang von HOMER2 und PARP-Inhibitoren an BRCA-Mutationsträgerinnen zu untersuchen. HOMER2 könnte möglicherweise die BRCA-Mutationsträgerinnen in für die Therapie geeignete und nicht geeignete Subgruppen unterteilen. Die Patientinnen mit einer hohen HOMER2-Expression, entsprechend der zweiten in dieser Arbeit vorgestellten Hypothese, hätten eine neben der BRCA-Mutation, zweite Hemmung der DNA-Reparatur. Zusammen mit den PARP-Inhibitoren hätten sie eine dreifache Hemmung der Reparatur der DNA-Schäden, die durch Chemotherapeutika verursacht werden. Somit sollten die Tumorzellen, wie gewünscht, in Apoptose gehen. Dies könnte anhand der momentan laufenden Phase III Studie SOLO2 mit Olaparib bei Patientinnen mit platinsensitiven Ovarialkarzinomrezidiven und BRCA-Mutation retrospektiv mittels Einteilung der Patientinnen in eine Gruppe mit nicht vorhandener HOMER-Expression und einer Gruppe mit vorhandener HOMER-Expression mit Hilfe der Immunhistochemie anhand von Gewebeproben der Patientinnen relativ kostensparsam anhand des semiquantitativen Scores untersucht werden.

Wenn weitere Untersuchungen HOMER2 als prognostischen Marker bestätigen, wäre HOMER2 sicherlich ein sehr interessanter und aussagekräftiger Marker zur Unterteilung von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom in klinisch-pathologische Gruppen in Bezug auf die Prognose. Zusammen z.B. mit dem HE4, dem Mesothelin, dem Folat-Rezeptor alpha, dem Osteopontin und den Kallikreinen, könnte die Expression von HOMER2 ein wichtiges prognostisches Indiz für das Gesamt- als auch für das rezidivfreie Überleben sein.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Rasters. Blaue Kästen: Stanzen aus Gewebe, welches gut vom zu untersuchendem Gewebe zu unterscheiden war; in dieser Arbeit wurde hierfür lymphatisches Gewebe aus Tonsillen verwendet; Weiße Kästen: Gewebeproben.....	19
Abbildung 2: Seitenansicht des Tissue-Micro-Arrayers der Firma Beecher Instruments.....	21
Abbildung 3: Fertiggestellte TMAs, die die gleichzeitige Untersuchung von 46 Ovarialkarzinomen erlauben.....	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Nachweises des HOMER2-Proteins mit Hilfe von HOMER2-spezifischen Antikörpern und dem DAKO REAL Detection System. Gelb: Zelle; Schwarz: HOMER2-Protein; Rot: Primärantikörper; Blau: Zweitantikörper = Dako REAL Biotinylated Secondary Antibodies; Weiß: Tertiärs substrat = Dako REAL Streptavidin Peroxidase; Weiß zu grün: Farbreaktion unter der Zugabe von DAB+Chromogen = Dako REAL DAB + Chromogen und Substratlösung = Dako REAL HRP Substrate Buffer.....	26
Abbildung 5: qPCR Säulendiagramm zur Darstellung der relativen Expressionsstärken der untersuchten Proben zueinander über eine relative Quantifizierung unter Verwendung eines Logarithmus von 10. Die in dieser Abbildung dargestellten qPCR-Daten wurden mit dem Referenzgen ALAS1 normalisiert. ....	31
Abbildung 6: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen den array-basierten Chip-Daten und den qPCR-Daten.....	32
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Assoziation der HOMER2 mRNA-Expression mit dem Gesamt- bzw. dem rezidivfreien Überleben bei insgesamt 41 bzw. 40 Ovarialkarzinompatientinnen. Die hierzu verwendeten qPCR-Daten wurden mit dem Referenzgen ALAS1 normalisiert. ....	33
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Assoziation der HOMER2 mRNA-Expression und dem Gesamt- bzw. dem rezidivfreien Überleben bei insgesamt 41 bzw. 40 Ovarialkarzinompatientinnen. Die hierzu verwendeten qPCR-Daten wurden hier mit dem Referenzgen 18S normalisiert. ....	34
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Assoziation zwischen der HOMER2-Expression und dem Gesamtüberleben von n = 690 Patientinnen anhand des „KM-Plotters“: <a href="http://kmplot.com">http://kmplot.com</a> , (HOMER2 Affymetrix ID: 217080_s_at), Stand: 23.02.2015. Cut-off Werte, die eine hohe bzw. eine niedrige HOMER2-Expression festlegten, wurden hier durch den Median definiert. ....	36

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurven zur Darstellung der Assoziation zwischen der HOMER2-Expression und dem rezidivfreien Überleben von n = 590 Patientinnen anhand des „KM-Plotters“: <a href="http://kmplot.com">http://kmplot.com</a> , (HOMER2 Affymetrix ID: 217080_s_at), Stand: 23.02.2015. Cut-off Werte, die eine hohe bzw. eine niedrige HOMER2-Expression festlegten, wurden hier durch den Median definiert. ....	37
Abbildung 11: Fertiggestellte TMAs, die die gleichzeitige Untersuchung von 46 Ovarialkarzinomen erlaubten.....	38
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen zum spezifischen Nachweis der HOMER2-Expression in Ovarialkarzinomgeweben mit 24 negativ (links), 13 schwach positiv (Mitte) und 9 stark positiv (rechts). ....	39
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbungen zum spezifischen Nachweis der HOMER2-Expression in Ovarialkarzinomgeweben mit 24 negativen (links), 13 schwach positiven (Mitte) und 9 stark positiven Tumoren (rechts). Die oberen Aufnahmen sind mit einer 10-fachen und die unteren Aufnahmen mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen.....	41
Abbildung 14: Balkendiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen den erhobenen qPCR-Daten und den ermittelten Proteinexpressionswerten. ....	42
Abbildung 15: Balkendiagramm zur Darstellung der Assoziation zwischen Grading und HOMER2-Proteinexpression. ....	44
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Assoziation der HOMER2-Proteinexpression und dem Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben bei insgesamt 45 bzw. 43 Ovarialkarzinompatientinnen.....	45

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Merkmale der Tumorproben, die für die qPCR verwendet wurden. ....	14
Tabelle 2: Klinisch-pathologische Merkmale der Tumorproben, die für die Herstellung des TMAs verwendet wurden. ....	15
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien der qPCR. ....	16
Tabelle 4: Temperaturprofil eines TaqMan-Laufs. ....	18
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien zur Herstellung der TMAs. ....	19
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien zur Vorbehandlung der Schnittpräparate. ....	22
Tabelle 7: Verwendete Reagenzien für die Methode 1. ....	23
Tabelle 8: Verwendete Reagenzien für die Methode 2 und 3. ....	24
Tabelle 9: Verwendete Reagenzien für die immunhistochemische Färbung. ....	25
Tabelle 10: Verwendete Reagenzien für die Kernfärbung und die Einbettung. ....	27
Tabelle 11: Verwendete Antikörper, Hersteller, Bestellnummer, jeweilige Verdünnung, Art der Antigendemaskierung, Art des Antikörpers/ Zusatzinformation. Gelb markiert ist diejenige Bedingung, die eine HOMER2 spezifische Färbung ohne Hintergrundfärbung erbrachte. ....	27
Tabelle 12: Assoziation zwischen verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen und der HOMER2-Proteinexpression (keine versus positive Expression). Signifikante Assoziationen sind mit einem * markiert. Die entsprechenden Signifikanzwerte wurden mit dem exakten Test nach Fischer <sup>1</sup> bzw. dem Chi-Quadrat-Test <sup>2</sup> berechnet. ....	43
Tabelle 13: Multivariable Cox-Regressionsanalyse bzgl. des Gesamtüberlebens (Modell I). ....	47
Tabelle 14: Multivariable Cox-Regressionsanalysen bzgl. des Gesamtüberlebens (Modell II). ....	47
Tabelle 15: Multivariable Cox-Regressionsanalyse bzgl. des rezidivfreien Überlebens (Modell I). ....	49
Tabelle 16: Multivariable Cox-Regressionsanalyse bzgl. des rezidivfreien Überlebens (Modell II). ....	49

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] Ajima R, Kajiya K, Inoue T, Tani M, Shiraishi-Yamaguchi Y, Maeda M, Segawa T, Furuichi T, Sutoh K, Yokota J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 May 18;356(4):851-6.
- [2] 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 Jul 24;376(9737):245-51.
- [3] Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer.* 2005 Nov-Dec;15 Suppl 3:274-81.
- [4] Batistatou A, Televantou D, Bobos M, Eleftheraki AG, Kouvaras E, Chrisafi S, Koukoulis GK, Malamou-Mitsi V, Fountzilas G. Evaluation of current prognostic and predictive markers in breast cancer: a validation study of tissue microarrays. *Anticancer Res.* 2013 May;33(5):2139-45.
- [5] Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Benedetti Panici P, Mancuso S, Neri G, Testa JR. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 1995;64:280–5.

- [6] Biggs WH, III, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7421–6.
- [7] Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2001; 69: 89-95.
- [8] Bracht K.: Biomarker: Indikatoren für Diagnose und Therapie. *Pharmazeutische Zeitung* 2009; 154: 16-25.
- [9] Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 1997 Mar 20;386(6622):284-8.
- [10] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857–68.
- [11] Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001; 195:72-9.
- [12] Burges A., Anthuber C., Schelling M., Stieber P. Maligne Ovarialkarzinome. Empfehlungen zur Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität; W. Zuckschwerdt Verlag; München, 9.Auflage, 2010.
- [13] Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995;376:599–602.

- [14] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318–21.
- [15] Chen, A., F. E. Kleiman, J. L. Manley, T. Ouchi, and Z. Q. Pan. 2002. Auto-ubiquitination of the BRCA1/BARD1 RING ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 277:22085-22092.
- [16] Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 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): 303–14.
- [17] Cozzoli DK, Goulding SP, Zhang PW, Xiao B, Hu JH, Ary AW, Obara I, Rahn A, Abou-Ziab H, Tyrrel B, Marini C, Yoneyama N, Metten P, Snelling C, Dehoff MH, Crabbe JC, Finn DA, Klugmann M, Worley PF, Szumlinski KK. Binge drinking upregulates accumbens mGluR5-Homer2-PI3K signaling: functional implications for alcoholism. *J Neurosci.* 2009 Jul 8;29(27).
- [18] Crijns AP, Duiker EW, de Jong S, Willemse PH, van der Zee AG, de Vries EG. Molecular prognostic markers in ovarian cancer: toward patient-tailored therapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Jan-Feb;16 Suppl 1:152-65.
- [19] Crijns A.P.G, Boezen H.M., Schouten J.P., Arts H.J.G., Hofstra R.M.W., P.H.B. Willemse P., de Vries E.G.E., van der Zee A..G.J.. Prognostic factors in ovarian cancer: current evidence and future prospects. *The ECCO 12 Educational Book Eur J Cancer* 2003;1(Suppl):127–45.
- [20] Curtin N. PARP inhibitors for anticancer therapy. *Biochem Soc Trans.* 2014 Feb;42(1):82-8.

- [21] Datta SR<sup>1</sup>, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME.. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231–41.
- [22] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13:2905–27.
- [23] du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J.. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d 'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009; 115(6): 1234–44.
- [24] J. Engel, Epidemiologie, Maligne Tumoren, Maligne Ovarialkarzinome. Empfehlungen zur Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität; W. Zuckschwerdt Verlag; München, 9.Auflage, 2010.
- [25] European Medicines Agency, Lynparza recommended for approval in Ovarian Cancer, EMA/648393/2014
- [26] Evans DG, Shenton A, Woodward E, Lalloo F, Howell A, Maher ER. Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family. *BMC Cancer*. 2008 May 30;8:155.
- [27] 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 Apr 14;434(7035):917-21.

- [28] Feige A., Rempen A., Würfel W., Jawny J., Rohde A., Frauenheilkunde, Fortpflanzungsmedizin Geburtsmedizin Onkologie Psychosomatik, URBAN & FISCHER, München + Jena, 2005, 3. Auflage, S.744.
- [29] Fons G, Hasibuan SM, van der Velden J, ten Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium. *J Clin Pathol.* 2007 May;60(5):500-3.
- [30] Gilks WP, Allott EH, Donohoe G, Cummings E; International Schizophrenia Consortium, Gill M, Corvin AP, Morris DW. Replicated genetic evidence supports a role for HOMER2 in schizophrenia. *Neurosci Lett.* 2010 Jan 14;468(3):229-33.
- [31] Gould AT, Sacramento AD, Wroten MG, Miller BW, von Jonquieres G, Klugmann M, Ben-Shahar O, Szumlinski KK. Cocaine-elicited imbalances in ventromedial prefrontal cortex Homer1 versus Homer2 expression: implications for relapse. *Addict Biol.* 2013 Sep 30. doi: 10.1111/adb.12088.
- [32] Gudenus, R. and Granzer, U.: Biomarker und Surrogatendpunkte. In: *transkript.* 7, 2010, S. 31-32.
- [33] Hashizume, R., M. Fukuda, I. Maeda, H. Nishikawa, D. Oyake, Y. Yabuki, H. Ogata, and T. Ohta. 2001. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J. Biol. Chem.* 276:14537-14540.
- [34] Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Drescher C, Urban N, Hellström KE. (2003) The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 63(13): 3695–3700.

- [35] Hou L, Klann E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci*. 2004 Jul 14;24(28):6352-61.
- [36] International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431:931–45.
- [37] Irshad S, Ashworth A, Tutt A. Therapeutic potential of PARP inhibitors for metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011 Aug;11(8):1243-51.
- [38] Ishibashi T, Ogawa S, Hashiguchi Y, Inoue Y, Udo H, Ohzono H, Kato A, Minakami R, Sugiyama H. A novel protein specifically interacting with Homer2 regulates ubiquitin-proteasome systems. *J Biochem*. 2005 May;137(5):617-23.
- [39] Kammermeier PJ. Endogenous homer proteins regulate metabotropic glutamate receptor signaling in neurons. *J Neurosci*. 2008 Aug 20;28(34):8560-7.
- [40] Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappa B by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999;9:601–4.
- [41] Khwaja A, Rodriguez-Viciano P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 1997;16:2783–93.
- [42] Kononen J<sup>1</sup>, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP.. Tissue microarrays for high- throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4:844–7.

- [43] Kurose K, Zhou XP, Araki T, Cannistra SA, Maher ER, Eng C. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 2001;158:2097–106.
- [44] Chun-Jen Lin C, Summerville JB, Howlett E, Stern M. The metabotropic glutamate receptor activates the lipid kinase PI3K in *Drosophila* motor neurons through the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and the nonreceptor tyrosine protein kinase Dfak. *Genetics*. 2011 Jul;188(3):601-13.
- [45] Liu AX, Testa JR, Hamilton TC, Jove R, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:2973–7.
- [46] Mallery, D. L., C. J. Vandenberg, and K. Hiom. 2002. Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *EMBO J*. 21:6755-6762.

- [47] MAQC Consortium, Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY, Luo Y, Sun YA, Willey JC, Setterquist RA, Fischer GM, Tong W, Dragan YP, Dix DJ, Frueh FW, Goodsaid FM, Herman D, Jensen RV, Johnson CD, Lobenhofer EK, Puri RK, Schrf U, Thierry-Mieg J, Wang C, Wilson M, Wolber PK, Zhang L, Amur S, Bao W, Barbacioru CC, Lucas AB, Bertholet V, Boysen C, Bromley B, Brown D, Brunner A, Canales R, Cao XM, Cebula TA, Chen JJ, Cheng J, Chu TM, Chudin E, Corson J, Corton JC, Croner LJ, Davies C, Davison TS, Delenstarr G, Deng X, Dorris D, Eklund AC, Fan XH, Fang H, Fulmer-Smentek S, Fuscoe JC, Gallagher K, Ge W, Guo L, Guo X, Hager J, Haje PK, Han J, Han T, Harbottle HC, Harris SC, Hatchwell E, Hauser CA, Hester S, Hong H, Hurban P, Jackson SA, Ji H, Knight CR, Kuo WP, LeClerc JE, Levy S, Li QZ, Liu C, Liu Y, Lombardi MJ, Ma Y, Magnuson SR, Maqsodi B, McDaniel T, Mei N, Myklebost O, Ning B, Novoradovskaya N, Orr MS, Osborn TW, Papallo A, Patterson TA, Perkins RG, Peters EH, Peterson R, Philips KL, Pine PS, Pusztai L, Qian F, Ren H, Rosen M, Rosenzweig BA, Samaha RR, Schena M, Schroth GP, Shchegrova S, Smith DD, Staedtler F, Su Z, Sun H, Szallasi Z, Tezak Z, Thierry-Mieg D, Thompson KL, Tikhonova I, Turpaz Y, Vallanat B, Van C, Walker SJ, Wang SJ, Wang Y, Wolfinger R, Wong A, Wu J, Xiao C, Xie Q, Xu J, Yang W, Zhang L, Zhong S, Zong Y, Slikker W Jr. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 2006 Sep;24(9):1151-61.
- [48] Martino JJ, Wall BA, Mastrantoni E, Wilimczyk BJ, La Cava SN, Degenhardt K, White E, Chen S (2013) Metabotropic glutamate receptor 1 (Grm1) is an oncogene in epithelial cells. *Oncogene* 32(37):4366–4376.

- [49] Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjöberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, Rönnelid J.: Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. In: *Arthritis Rheum.* 2008 Jan;58(1):36-45.
- [50] Mayr D., Dettmar P., Dorn J., Schmalzried H., Schoeckel E., *Histologische Klassifikation maligner und potenziell maligner Ovarialtumoren, Stadieneinteilung und Prognosefaktoren, MANUAL, Maligne Ovarialkarzinome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.* Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität; Prof. Dr. Barbara Schmalfeld W. Zuckschwerdt Verlag; München, 10.Auflage, 2014.
- [51] Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11598–603.
- [52] McDermott U., Downing J.R., Stratton M.R.: Genomics and the continuum of cancer care. *New England Journal of Medicine* 2011; 364: 340-350.
- [53] McIntosh MW, Liu Y, Drescher C, Urban N, Diamandis EP. Validation and characterization of human kallikrein 11 as a serum marker for diagnosis of ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; (15 Pt 1): 4422–4428.
- [54] Meindl A., Rhiem K., Engel C., Ditsch N., Kast K., Hahnen E., Schutzler R.K. *Klinik und Genetik des familiären Brust- und Eierstockkrebses.* Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 2013.
- [55] Mørch LS, Løkkegaard E, Andreassen AH, Krüger-Kjaer S, Lidegaard O.: Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA* 2009; 302(3): 298–305.

- [56] Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999; 344(Pt 2):427–31.
- [57] Nguyen L, Cardenas-Goicoechea SJ, Gordon P, Curtin C, Momeni M, Chuang L, Fishman D. (2013) Biomarkers for early detection of ovarian cancer. *Women's health (London, England)* 9(2): 171–185; quiz 186–187.
- [58] Noll S, Schaub-Kuhnen S: *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer, München, Jena, 2000.
- [59] Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, Campbell IG. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 1998;58:2095–7.
- [60] Ochi T, Wu Q, Blundell TL. The spatial organization of non-homologous end joining: From bridging to end joining. *DNA Repair (Amst)*. 2014 Mar 10.
- [61] O'Shannessy DJ, Somers EB, Palmer LM, Thiel RP, Oberoi P, Heath R, Marcucci L. (2013) Serum folate receptor alpha, mesothelin and megakaryocyte potentiating factor in ovarian cancer: association to disease stage and grade and comparison to CA125 and HE4. *Journal of ovarian research* 6(1): 29.
- [62] Parisiadou L, Bethani I, Michaki V, Krousti K, Rapti G, Efthimiopoulos S. Homer2 and Homer3 interact with amyloid precursor protein and inhibit Abeta production. *Neurobiol Dis*. 2008 Jun;30(3):353-64.

- [63] Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ, Phillips WA. The phosphatidylinositol 39-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* 2001;61:7426–9.
- [64] Rauh-Hain JA, Krivak TC, Del Carmen MG, Olawaiye AB. Ovarian cancer screening and early detection in the general population. *Rev Obstet Gynecol.* 2011;4(1):15-21.
- [65] Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999;401:86–90.
- [66] Saito M, Okamoto A, Kohno T, Takakura S, Shinozaki H, Isonishi S, Yasuhara T, Yoshimura T, Ohtake Y, Ochiai K, Yokota J, Tanaka T.. Allelic imbalance and mutations of the PTEN gene in ovarian cancer. *Int J Cancer* 2000;85: 160–5.
- [67] Salanova M, Volpe P, Blottner D. Homer protein family regulation in skeletal muscle and neuromuscular adaptation. *IUBMB Life.* 2013 Sep;65(9):769-76. doi: 10.1002/iub.1198. Epub 2013 Aug 5.
- [68] Sreeja Sarojini, Ayala Tamir, Heejin Lim, Shihong Li,2 Shifang Zhang, Andre Goy, Andrew Pecora, and K. Stephen Suh1,3 (2012) Early detection biomarkers for ovarian cancer. *JCO* 2012: ID 709049.
- [69] Schöndorf T, Göhring UJ, Roth G, Middel I, Becker M, Moser N, Valter MM, Hoopmann M.. Time to progression is dependent on the expression of the tumour suppressor PTEN in ovarian cancer patients. *Eur J Clin Invest* 2003;33:256–60.
- [70] Schönberg S, Herstellung und Validierung von Tissue Microarrays von Knochenmarkbiopsien, Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Aachen, 2007

- [71] Schmalfeld B., Beer D., Burges A., Anthuber C., Schelling M., Früherkennung und Diagnostik, MANUAL, Maligne Ovarialkarzinome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität; Prof. Dr. Barbara Schmalfeld W. Zuckschwerdt Verlag; München, 10.Auflage, 2014.
- [72] Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7772–7.
- [73] Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW.. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 1999;21:99–102.
- [74] Shaw M, Cohen P, Alessi DR. The activation of protein kinase B by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J* 1998;336(Pt 1):241–6.
- [75] Speyer CL, Smith JS, Banda M, DeVries JA, Mekani T, Gorski DH (2012) Metabotropic glutamate receptor-1: a potential therapeutic target for the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 132(2):565–573.
- [76] Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tsihchlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ.. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 2001;159:431–7.
- [77] Stepulak A, Rola R, Polberg K, Ikonomidou C. Glutamate and its receptors in cancer. *J Neural Transm.* 2014 Mar 9.

- [78] Szodoray P, Szabó Z, Kapitány A, Gyetvai A, Lakos G, Szántó S, Szücs G, Szekanecz Z: Anticitrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. In: *Autoimmun Rev.* 2009 May 6.
- [79] Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF. Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron.* 1998 Oct;21(4):717-26.
- [80] 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 Jul 24;376(9737):235-44.
- [81] Tutt A, Ashworth A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med.* 2002 Dec;8(12):571-6.
- [82] Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsihchlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M.. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002;8:1136–44.
- [83] Wiedemeyer WR, Beach JA, Karlan BY. Reversing Platinum Resistance in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: Targeting BRCA and the Homologous Recombination System. *Front Oncol.* 2014 Mar 3;4:34.
- [84] Willard SS, Koochekpour S. Glutamate signaling in benign and malignant disorders: current status, future perspectives, and therapeutic implications. *Int J Biol Sci.* 2013 Aug 9;9(7):728-42.

- [85] Wu-Baer F, Ludwig T, Baer R. The UBXN1 protein associates with autoubiquitinated forms of the BRCA1 tumor suppressor and inhibits its enzymatic function. *Mol Cell Biol.* 2010 Jun;30(11):2787-98.
- [86] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013 Mar 29;339(6127):1546-58.
- [87] Volkmann J, Reuning U, Rudelius M, Häfner N, Schuster T, Becker v. Rose A, Weimer J, Hilpert F, Kiechle M, Dürst M, Arnold N, Schmalfeldt B, Meindl A, Ramser J. High expression of crystallin  $\alpha$ B represents an independent molecular marker for unfavourable ovarian cancer patient outcome and impairs TRAIL- and cisplatin-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Int J Cancer.* 2013 Jun 15;132 (12):2820-32.
- [88] Xia, Y., G. M. Pao, H. W. Chen, I. M. Verma, and T. Hunter. 2003. Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein. *J. Biol. Chem.* 278:5255-5263.
- [89] Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001;3: 245–52.

## 10 Internetverzeichnis

- [a] dkfz (Deutsches Krebsforschungszentrum):  
[http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort\\_5.html](http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_5.html),  
Stand: 29.10.2013
- [b] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM.  
GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide.  
IARC Cancerbase No,10 [Internet] Lyon, Frankreich: International  
Agency for Research on Cancer, 2010:<http://globocan.iarc.fr>.  
Stand: 20.11.2013
- [c] HOMER2 Official Symbol: HOMER2 and Name: homer homolog 2  
(Drosophila)[Homo sapiens] Other Aliases: ACPD, CPD, HOMER-2,  
VESL-2 Other Designations: cupidin; homer homolog 3; homer  
protein homolog 2; homer, neuronal immediate early gene, 2  
Chromosome: 15; Location: 15q24.3 Annotation: Chromosome  
15NC\_000015.10 (82841086..82986161, complement)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9455>,  
Stand: 21.02.2014
- [d] RKI (Robert Koch-Institut) Gesundheitsberichterstattung und  
Epidemiologie: Krebsregisterdaten und Epidemiologie,  
[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html)  
Stand: 09.01.14
- [e] Dr. Schild T.A., Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt  
<http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>;  
Stand: 19.02.2014
- [f] SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program)  
<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>,  
Stand: 28.10.2013

# 11 Lebenslauf

## Persönliches

Name: Carl, Moritz, Joschka, Aaron Becker – von Rose  
Geburtsdatum- ort: 05.07.1984 in Heidelberg

## Schule

1999-2004 Schule Schloß Salem, International College

## Studium und Beruf

10.2006 - 09.2008 Studium der Humanmedizin (Vorklinik),  
10.2008 – 12.2011 Studium der Humanmedizin (Klinik),  
12.2011 – 01.2013 Praktisches Jahr, Technische Universität München am  
Klinikum rechts der Isar  
12.2011 – 03.2012 1. Terial: Strahlentherapie, Klinik und Poliklinik für  
Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, Klinikum  
rechts der Isar  
04.2012 – 07.2012 2. Terial: Innere Medizin, II. und III. Medizinische Klinik,  
Klinikum rechts der Isar (Hämatologie / Internistische  
Onkologie, Medizinische Notaufnahme)  
07.2012 – 11.2012 3.Terial: Chirurgie, Chirurgische Klinik, Klinikum rechts der  
Isar (Gefäßchirurgie, Chirurgische Notaufnahme)  
04.07.2013 2. Staatsexamen, Note: gut  
01.11.2014 Beginn der Assistenzarztausbildung am Universitätsklinikum  
Frankfurt in der Hämatologie und Onkologie

## Famulaturen

03.2009 Klinikum für Kardiologie, Angiologie, Pulmologie (Prof. Dr.  
Katus), Universitätsklinikum Heidelberg  
07.2009-08.2009 Internal Medicine, Infectiology, Tropical Medicine, University  
of Malawi

04.2010 Praxisfamulatur (Dr. Peta Becker - v. Rose), Heidelberg

08.2010 Kinderchirurgische Klinik (Prof. Dr. Wessel), Klinikum  
Mannheim

### **Promotion**

Seit 2010 Thema: „Validierung prognostisch wichtiger Marker beim Ovarialkarzinom.“, Technische Universität München, Klinik der Frauenheilkunde am Klinikum rechts der Isar

### **Veröffentlichung**

06.2013 “High expression of crytallin  $\alpha$ B represents an independent molecular marker for unfavourable ovarian cancer patient outcome and impairs TRAIL- and cisplatin-induced apoptosis in human ovarian cancer cells.”

### **Zivildienst**

2004-2005 Anderer Dienst im Ausland, Triform Camphill Community,  
New York State

### **Fremdsprachen**

Englisch (fließend in Wort und Schrift)

## 12 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Alfons Meindl für die Ermöglichung und unterstützende Begleitung der Arbeit in der Abteilung der Tumorgenetik der Frauenheilkunde des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. phil. nat. Juliane Ramser für Ihre exzellente Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und Denken und in das spezifische Fachgebiet. Dies hatte für mich Vorbildcharakter. Frau PD Dr. med. Martina Rudelius möchte ich für die Zusammenarbeit während der Zeit in der Pathologie ganz herzlich danken.

Weiter möchte ich Claudia Wolff und Nina Freudenberg für das Korrekturlesen der Doktorarbeit danken.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, Frau Dr. Peta Becker von Rose und Herrn Prof. Dr. Hans Becker, für Ihre nicht enden wollende Unterstützung.

## **13 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Frankfurt, den 01.06.2015

---

Aaron Becker –von Rose