

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Chemie
Lehrstuhl für Biochemie

Neurocalcin δ als potentieller Biomarker für das Ovarialkarzinom

Sarah Maria Konrad

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Matthias Feige

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Michael Groll
2. Priv.-Doz. Dr. Anne Quante

Die Dissertation wurde am 29.10.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 02.12.2020 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Gynäkologische Tumorgenetik“ am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unter Co-Betreuung von PD Dr. Anne Quante und Dr. Juliane Ramser durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Ovarialkarzinom.....	5
1.1.1 Epidemiologie.....	5
1.1.2 Histologie.....	5
1.1.3 Risikofaktoren.....	7
1.1.4 Therapie.....	7
1.1.5 Prognose.....	8
1.2 Biomarker des Ovarialkarzinoms.....	9
1.2.1 Cancer antigen 125.....	9
1.2.2 Human epididymis protein 4.....	10
1.2.3 Neurocalcin δ	11
2 Zielsetzung der Arbeit	13
3 Material und Methoden	15
3.1 Material.....	15
3.1.1 Chemikalien.....	15
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
3.1.3 Kits.....	18
3.1.4 Antikörper.....	19
3.1.5 Geräte.....	19
3.1.6 Software.....	21
3.2 Patientenkollektive.....	21
3.2.1 Validierungskollektiv.....	21
3.2.2 Studienkollektiv.....	21
3.3 Tumorgewebsspezifische Methoden.....	23
3.3.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Tumorgewebe.....	23
3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	23
3.3.3 cDNA Synthese (Gesamt-RNA aus Tumorgewebe).....	24
3.3.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) – Gewebe.....	25
3.3.5 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten.....	27

3.3.6	Scoring der immunhistochemischen Färbungen	28
3.3.7	Analyse von unabhängigen mRNA-Microarray Datensätzen.....	29
3.4	Zellkulturtechnische Methoden	29
3.4.1	Zelllinien.....	29
3.4.2	Kultivierung der Zelllinien.....	30
3.4.3	Mykoplasmentest.....	30
3.4.4	Erstellung stabiler <i>NCALD</i> -Knockdowns in der Zelllinie HEY.....	31
3.4.4.1	Präparation plasmidischer DNA aus <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	32
3.4.4.2	Co-Transfektion zur Herstellung lentiviraler Partikel	33
3.4.4.3	Lentivirale Transduktion der Ovarialkarzinomzelllinie HEY.....	34
3.4.5	Extraktion von Gesamt-RNA aus HEY-Zellen.....	35
3.4.6	cDNA Synthese (Gesamt-RNA aus Zellen).....	36
3.4.7	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) – Zellen	36
3.4.8	Zellyse zur Proteinextraktion aus Zellen.....	36
3.4.9	Proteinbestimmung anhand des Bicinchoninsäure (BCA)-Assays.....	37
3.4.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot.....	38
3.4.11	Zellviabilitätsassay	40
3.5	Statistische Auswertung.....	40
4	Ergebnisse.....	43
4.1	<i>NCALD</i> mRNA-Expression in humanen Ovarialkarzinomgeweben.....	43
4.1.1	Validierung der vorangegangenen <i>NCALD</i> Genexpressionsanalysen.....	43
4.1.2	Assoziation der <i>NCALD</i> Genexpression mit dem Patientenüberleben.....	45
4.1.3	Analyse von unabhängigen <i>NCALD</i> mRNA-Microarray Datensätzen.....	47
4.2	<i>NCALD</i> Proteinexpression in humanen Ovarialkarzinomgeweben	48
4.2.1	Immunhistochemische Detektion der <i>NCALD</i> Proteinexpression.....	48
4.2.2	Assoziation der <i>NCALD</i> Proteinexpression mit klinischen Parametern.....	51
4.2.3	Assoziation der <i>NCALD</i> Expression mit dem Patientenüberleben	52
4.2.4	<i>NCALD</i> Expression im Vergleich zu klinischen Parametern.....	54
4.2.5	Assoziation der <i>NCALD</i> Stromaexpression mit klinischen Parametern.....	56
4.2.6	Assoziation der <i>NCALD</i> Stromaexpression mit der Überlebenszeit	59
4.3	<i>NCALD</i> Proteinexpression in humanen Tonsillengeweben	60
4.4	Einfluss <i>NCALDs</i> auf das Ansprechen der Chemotherapie.....	61
4.4.1	Stabiler <i>NCALD</i> Knockdown in der Ovarialkarzinomzelllinie HEY	61
4.4.2	Einfluss <i>NCALDs</i> auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzelllinien.....	65
4.4.2.1	Einfluss <i>NCALDs</i> auf die Zellviabilität unter Cisplatin-Behandlung.....	66

4.4.2.2 Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität unter Paclitaxel-Behandlung.....	68
4.4.3 Assoziation der NCALD Expression mit dem Patientenüberleben abhängig von der Art der Chemotherapie.....	70
5 Diskussion	73
5.1 Hohe <i>NCALD</i> mRNA-Expression mit längerer Überlebenszeit assoziiert.	73
5.2 Hohe NCALD Proteinexpression mit längerer Überlebenszeit assoziiert.	75
5.3 Einfluss NCALDs auf das Ansprechen der Chemotherapie.....	78
5.4 Ausblick	81
6 Verzeichnisse.....	83
6.1 Abkürzungsverzeichnis	83
6.2 Tabellenverzeichnis	85
6.3 Abbildungsverzeichnis.....	87
6.4 Literaturverzeichnis	89
Danksagung	93
Veröffentlichungen	95
Eidesstattliche Erklärung	97

Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom stellt die gynäkologische Tumorerkrankung mit der höchsten relativen Mortalität dar. Ein Großteil der Patientinnen wird in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III und FIGO IV) diagnostiziert und entwickelt im Laufe der Erkrankung eine Resistenz gegenüber platinhaltiger Chemotherapie. Personalisierte Therapiestrategien und die Identifizierung neuer prognostischer und therapierelevanter Biomarker sind daher von hohem klinischem Interesse.

Neurocalcin δ (NCALD), ein N-terminal myristoyliertes Protein aus der Familie der neuronalen Calciumsensoren, wurde als potentieller prognostischer Biomarker für das Ovarialkarzinom beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, ob eine Assoziation zwischen hoher NCALD mRNA- und Proteinexpression und einem längeren Patientenüberleben existiert. Dazu wurde zunächst die NCALD mRNA-Expression mittels qPCR in Ovarialkarzinomtumoren ($n = 31$) ermittelt und in niedrig/hoch unterteilt. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe NCALD mRNA-Expression sowohl mit einem längeren progressionsfreien als auch einem längeren Gesamtüberleben assoziiert war. Im Falle des Gesamtüberlebens war diese Assoziation statistisch signifikant. Diese Ergebnisse wurden in unabhängigen, öffentlich zugänglichen Affymetrix-Microarray-Datensätzen (OS: $n = 547$; RFS: $n = 467$) validiert. Es zeigte sich ebenfalls, dass in diesem größeren Kollektiv eine hohe NCALD mRNA-Expression mit einem längeren Patientenüberleben assoziiert war. Sowohl beim progressionsfreien als auch beim Gesamtüberleben war diese Assoziation signifikant. Anschließend wurde mittels Immunhistochemie die NCALD Proteinexpression in Tumorgewebe ($n = 102$) analysiert, dichotomisiert (niedrig/hoch) und mit dem Patientenüberleben assoziiert. Auch auf Proteinebene war eine hohe NCALD Expression signifikant mit einem längeren progressionsfreien und Gesamtüberleben assoziiert. In uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalysen setzte sich die NCALD Expression als unabhängiger, signifikanter Faktor durch. Diese Ergebnisse zeigen, dass NCALD einen vielversprechenden prognostischen Biomarker für das Ovarialkarzinom darstellt.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollte ermittelt werden, ob sich NCALD auch als therapierelevanter Biomarker eignet. Dazu wurde ein stabiler NCALD Knockdown in der Ovarialkarzinomzelllinie HEY erstellt. Dieser wurde durch qPCR und Western Blot

Analysen bestätigt. Mittels MTT-Assay wurde der Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzellen analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und den Knockdownzelllinien sowie zwischen den beiden Knockdownzelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass NCALD nicht direkt an der Zellviabilität beteiligt ist. In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität unter Intervention mit Chemotherapeutika untersucht. Es zeigte sich, dass die Knockdownzelllinien, welche eine niedrige NCALD Expression aufwiesen, signifikant weniger sensibel auf die Cisplatin-Intervention reagierten als die Kontrolle, welche sich durch eine hohe NCALD Expression auszeichnete. Im Falle einer Paclitaxel-Intervention konnte kein Unterschied zwischen Kontrolle und Knockdownzelllinien festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass NCALD spezifisch an einer Resistenz gegenüber Cisplatin beteiligt sein könnte. Daraufhin wurde die Assoziation der NCALD Proteinexpression mit dem Patientengesamtüberleben in Abhängigkeit von der eingesetzten Chemotherapie (Platin-Monotherapie, n = 50 vs. Platin-Taxol-Kombinationstherapie, n = 45) analysiert. Obwohl in beiden Therapiestrategien Patienten mit hoher NCALD Expression ein längeres Gesamtüberleben als Patienten mit niedriger NCALD Expression zeigten, war dieser Zusammenhang nur in der Gruppe der Platin-Monotherapie signifikant. Dies verstärkt den Hinweis, dass NCALD an einer spezifischen Cisplatinresistenz beteiligt sein könnte und somit einen therapierelevanten Biomarker darstellen könnte.

Weitere Studien in größeren Kollektiven werden benötigt, um das prognostische und therapierelevante Potential NCALDs als Biomarker für das Ovarialkarzinom zu ermitteln.

Abstract

Ovarian carcinoma has the highest relative mortality among gynecological tumors. The majority of patients are diagnosed at an advanced stage (FIGO III and FIGO IV) and develop resistance to platinum-based chemotherapy as the disease progresses. Personalized therapy strategies and the identification of new prognostic and therapy-relevant biomarkers are therefore of great clinical interest.

Neurocalcin δ (NCALD), an N-terminal myristoylated protein from the family of neuronal calcium sensors, has been described as a potential prognostic biomarker for ovarian cancer. The aim of this thesis was to determine whether there is an association between high NCALD mRNA and protein expression and longer patient survival. Therefore, the *NCALD* mRNA expression was determined by using qPCR in ovarian cancer tumors ($n = 31$) and divided into low/high expression. It could be shown that high *NCALD* mRNA expression was associated with both longer progression-free and longer overall survival. In the case of overall survival, this association was statistically significant. These results were validated in independent, publicly available Affymetrix microarray datasets (OS: $n = 547$; RFS: $n = 467$). It was shown that in this larger collective, high *NCALD* mRNA expression was also associated with longer patient survival. This association was significant for both progression-free and overall survival. Subsequently, the NCALD protein expression in tumor tissue ($n = 102$) was analyzed by immunohistochemistry, dichotomized (low/high) and associated with patient survival. Likewise, high NCALD protein expression levels were significantly associated with longer progression-free and overall survival. In univariate and multivariate Cox proportional hazard models, NCALD expression prevailed as an independent, significant factor. These results indicate that NCALD is a promising prognostic biomarker for ovarian cancer.

Based on these findings, it was determined whether NCALD is also suitable as a therapy-relevant biomarker. For this purpose, a stable NCALD knockdown was created in the ovarian carcinoma cell line HEY. This was confirmed by qPCR and western blot analyses. NCALD's influence on the cell viability of ovarian carcinoma cells was analyzed by MTT assay. No significant difference was found between the control and knockdown cell lines or between the two knockdown cell lines (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2). This

suggests that NCALD is not directly involved in cell viability. In a next step, NCALD's influence on cell viability under intervention with chemotherapeutic agents was investigated. It was found that the knockdown cell lines, which showed a low NCALD expression, reacted significantly less sensitively to the cisplatin intervention than the control, which displayed a high NCALD expression. In the case of paclitaxel intervention, no difference could be found between control and knockdown cell lines. These results suggest that NCALD may be specifically involved in cisplatin resistance. The association between NCALD protein expression and overall patient survival was then analyzed depending on the used chemotherapy (platinum monotherapy, n = 50 vs. platinum-taxol combination therapy, n = 45). Although patients with high NCALD expression showed a longer overall survival than patients with low NCALD expression in both therapy strategies, this relationship was only significant in the platinum monotherapy group. This reinforces the indication that NCALD could be involved in a specific cisplatin resistance and could thus represent a therapy-relevant biomarker. Further studies in larger collectives are needed to determine NCALD's prognostic and therapy-relevant potential as a biomarker for ovarian cancer.

1 Einleitung

1.1 Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom stellt die fünfthäufigste Ursache eines tumorbedingten Todes bei Frauen dar.^[1] Pro Jahr erkranken ca. 7350 Frauen in Deutschland an einem Ovarialkarzinom.^[2] Das Ovarialkarzinom weist nach dem Mammakarzinom und dem Corpus Uteri Karzinom die dritthäufigste Inzidenz unter den gynäkologischen Tumorerkrankungen auf und zeigt dabei die höchste relative Mortalität.^[3] Annähernd 70 % der Ovarialkarzinome werden aufgrund häufig fehlender oder unspezifischer Frühsymptome in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III und FIGO IV) diagnostiziert.^[4] Dabei liegt das mediane Erkrankungsalter bei ca. 68 Jahren.^[2] Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 43 %.^[2] Wird die Erkrankung früh (FIGO I) festgestellt, so liegt die relative Überlebensrate bei 89 %.^[2]

1.1.2 Histologie

Über 90 % der Tumore des Ovars stellen epitheliale Ovarialkarzinome da.^[5] Diese werden in vier histologische Subtypen unterteilt: serös (> 75 %), endometrioid (10 %), klarzellig (10 %) und muzinös (3 %).^[5] Weiterhin werden seröse Ovarialkarzinome nach ihrem histopathologischen Grading in High und Low Grade eingeteilt, wobei über 90 % der serösen Ovarialkarzinome High Grade darstellen.^[6] Der Tumorstatus wird anhand der Richtlinien der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) chirurgisch und pathologisch bestimmt.^[7] Die TNM-Klassifizierung beschreibt dabei die Größe des Primärtumors (T), Anzahl beteiligter regionaler Lymphknoten (L) und Fernmetastasen (M).^[7] Eine tabellarische Darstellung findet sich in Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1 FIGO und TNM-Stadien des Ovarialkarzinoms (nach Zeppernick und Meinhold-Heerlein).^[7]

FIGO	TNM	Definition
I		Tumor begrenzt auf die Ovarien oder Tuben
IA	T1a N0 M0	Tumor begrenzt auf ein Ovar (intakte Kapsel) oder Tube; Aszites oder Peritoneallavage ohne maligne Zellen
IB	T1b N0 M0	Tumor begrenzt auf beide Ovarien (intakte Kapseln) oder Tuben, kein Tumor an der Ovar- oder Tubenoberfläche, Aszites oder Peritoneallavage ohne maligne Zellen
IC	T1c N0 M0	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien oder Tuben mit:
IC1		-operativ bedingte Kapselruptur
IC2		-präoperative Kapselruptur oder Tumor an der Ovar- oder Tubenoberfläche
IC3		-maligne Zellen in Aszites oder Peritoneallavage
II		Tumor betrifft ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Ausbreitung ins Becken oder primäres Peritonealkarzinom
IIA	T2a N0 M0	Ausbreitung auf und/oder Implantate am Uterus und/oder den Tuben und/oder den Ovarien
IIB	T2b N0 M0	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
III		Tumor betrifft ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch bestätigter Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des Beckens und / oder Metastasierung auf die retroperitonealen Lymphknoten
IIIA1	T3a N0 M0	Ausschließlich retroperitoneale Lymphknotenmetastasen (zytologisch oder histologisch nachgewiesen)
IIIA1(i)		-Lymphknotenmetastasen bis max. 10 mm
IIIA1(ii)		-Lymphknotenmetastasen größer 10 mm
IIIA2	T3a N0 M0	Mikroskopische Ausbreitung auf dem Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
IIIB	T3b N0 M0	Makroskopische Ausbreitung auf dem Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens bis maximal 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen

FIGO	TNM	Definition
IIIC	T3ac N0/N1 M0	Makroskopische Ausbreitung auf dem Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens bis maximal 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen (einschließlich Ausbreitung auf Leber- und Milzkapsel ohne Parenchyembefall beider Organe)
IV		Fernmetastasen (mit Ausnahme von Peritonealmetastasen)
IVA	T (alle) N (alle) M1	Pleuralerguss mit positiver Zytologie
IVB	T (alle) N (alle) M1	Parenchymmetastasen und Metastasen in extra-abdominelle Organe (einschließlich Leistenlymphknoten und Lymphknoten außerhalb der Bauchhöhle)

1.1.3 Risikofaktoren

Ein wesentlicher Risikofaktor für das Ovarialkarzinom stellt das Alter dar, da mit zunehmendem Alter die Inzidenz des Ovarialkarzinoms ansteigt.^[2] Auch Adipositas wurde mit einem erhöhten Ovarialkarzinomrisiko assoziiert.^[4] Weitere Risikofaktoren sind hormoneller Art: Infertilität, Nulliparität, dauerhaft ovulatorische Zyklen und Hormonersatztherapie erhöhen das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken.^[8] Ungefähr 10 % aller Ovarialkarzinome sind durch genetischen Faktoren wie pathogene Mutationen der *BRCA1* und *BRCA2* Gene bedingt.^[9] Als protektiver Faktor wird eine Reduzierung der Ovulationszyklen genannt, wie beispielsweise durch häufige Schwangerschaften oder Einnahme oraler Kontrazeptiva.^[10]

1.1.4 Therapie

Die Therapie des Ovarialkarzinoms erfolgt an erster Stelle durch chirurgische Resektion des Tumors.^[11] Hierbei stellt das Ausmaß der Resektion des Tumorgewebes den wichtigsten prognostischen Faktor dar.^[12] Nach der Tumorresektion erfolgt die primäre chemotherapeutische Behandlung mit einer Kombinationstherapie aus Platin (Cisplatin, Carboplatin) und Taxol (Paclitaxel, Doxetaxel). Carboplatin wird dabei Cisplatin vorgezogen, sodass die Standard Erstlinientherapie aus sechs dreiwöchigen Zyklen

Carboplatin/Paclitaxel besteht.^[13] Eine neue chemotherapeutische Behandlungsform ist der Einsatz von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren.^[14] Diese verhindern, dass Tumorzellen die durch Chemotherapie verursachten DNA-Schäden reparieren.^[15] 2014 wurde Olaparib als Erhaltungstherapie bei platin sensitiven Ovarialkarzinomrezidiven mit Keimbahn- oder somatischen Mutationen im *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gen zugelassen.^[16] Inzwischen können auch Patientinnen unabhängig des *BRCA1/BRCA2*-Mutationsstatus mit Olaparib behandelt werden.^[17] Zusätzlich wurden weitere PARP-Inhibitoren wie Niraparib und Rucaparib zugelassen.^[17]

Zu Beginn liegt die Ansprechrate auf eine Erstlinienchemotherapie mit Carboplatin/Paclitaxel bei über 80 %.^[18] Allerdings erleiden über 70 % der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom innerhalb von fünf Jahren ein Rezidiv und entwickeln eine Arzneimittelresistenz gegen platinhaltige Chemotherapie.^{[4],[19]} Hinsichtlich der Zweitlinientherapie wird nach Remissionsdauer unterschieden: Patientinnen, die innerhalb von sechs Monaten ein Rezidiv erleiden, gelten als platinresistent und werden palliativ behandelt.^{[4],[9]} Tritt ein Rezidiv nach mehr als sechs Monaten auf wird mit platinhaltiger Kombinationstherapie behandelt, beispielsweise Carboplatin mit Paclitaxel, Gemcitabin oder pegyliertem liposomalem Doxorubicin.^[20] Bei einem Rezidiv zwischen sechs bis 24 Monaten nach Primärtherapie wird die Prognose als moderat bezeichnet, bei über 24 Monaten als gut.^[9]

1.1.5 Prognose

Die Prognose bei Ovarialkarzinompatientinnen wird vorrangig durch klinische Marker wie das Tumorstadium, der histologische Typ oder das Alter der Patientin gestellt, wobei der postoperative Tumorstadium als stärkster prognostischer Faktor angesehen wird.^{[4],[12]} Um das Patientenüberleben zu verbessern sind klinische Faktoren jedoch nicht effizient genug, da sie beispielsweise keine Informationen über das Ansprechen oder die Resistenz gegenüber Chemotherapie bereitstellen können. Personalisierte Therapiestrategien und ein tieferes molekularbiologisches Verständnis des Ovarialkarzinoms sind deshalb von hohem klinischem Interesse. Eine Ergänzung zu klinischen Markern können daher Biomarker darstellen.

1.2 Biomarker des Ovarialkarzinoms

Biomarker sind biologische Merkmale, welche objektiv gemessen und bewertet werden können.^[21] Sie dienen als Indikatoren für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder eine pharmakologische Reaktion auf eine therapeutische Intervention.^[21] Tumorbiomarker können im Tumorgewebe oder Serum nachgewiesen werden und umfassen ein breites Spektrum an Molekülen, wie beispielsweise DNA, mRNA, Enzyme, Metaboliten, Transkriptionsfaktoren oder Zelloberflächenrezeptoren.^[22] Sie können beim Einschätzen des Krebsrisikos, dem Screening, der Diagnose, der Charakterisierung und als Verlaufskontrolle von Tumoren eingesetzt werden.^{[21],[23]} Als prognostische Biomarker ermöglichen sie Vorhersagen über den natürlichen Krankheitsverlauf und können so Patientengruppen nach Dauer des Gesamt- oder progressionsfreien Überlebens unterteilen.^[22] Prädiktive Biomarker schätzen die Wahrscheinlichkeit ein, mit der ein Patient auf eine bestimmte Therapie anspricht. So profitieren beispielsweise Brustkrebspatientinnen mit HER2/neu-Überexpression von einer Herceptin-Behandlung, wohingegen Patientinnen mit erhöhtem Östrogenrezeptor auf Tamoxifen ansprechen.^[22] Ein idealer Tumorbiomarker sollte für eine bestimmte Tumorart hochspezifisch sein und eine hohe Sensitivität haben, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Er sollte zusätzlich zuverlässig mit der Tumorlast korrelieren und das Fortschreiten oder die Rückbildung des Tumors genau widerspiegeln. Ebenfalls sollte ein idealer Tumorbiomarker eine Vorlaufzeit gegenüber der klinischen Diagnose bieten.^[24] Als klinisch relevante Biomarker für das Ovarialkarzinom haben sich cancer antigen 125 (CA 125) und human epididymis protein 4 (HE4) durchgesetzt. Ein neuer, prognostischer Biomarkerkandidat für das Ovarialkarzinom könnte Neurocalcin δ darstellen.^{[25],[26]}

1.2.1 Cancer antigen 125

Cancer antigen 125 (CA 125) ist ein Glykoprotein vom Mucin-Typ, codiert durch das *MUC16*-Gen, und wurde erstmals durch Bast *et al.* charakterisiert.^[27] CA 125 ist der am häufigsten verwendete Serumbiomarker bei Ovarialkarzinompatientinnen.^[28] Als Biomarker kann CA 125 verwendet werden, um das Ansprechen auf die Chemotherapie

zu überprüfen und ein Rezidiv zu erkennen. Nimmt der CA 125-Wert etwa um die Hälfte ab, weist dies auf ein Ansprechen der Chemotherapie hin, während eine Verdopplung auf Platinresistenz und Krankheitsprogression deutet.^[29] Während CA 125 bei 92 % der Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinom überexprimiert ist, wird in frühen Stadien jedoch nur zu 50 % ein erhöhter Serumspiegel gemessen.^[30] Zusätzlich kann CA 125 auch während der Menstruation, Schwangerschaft, bei Endometriose und entzündlichen Erkrankungen des Beckens, sowie bei nicht-gynäkologischen Erkrankungen wie Hepatitis und Pankreatitis erhöht sein.^{[30],[31]} Obwohl CA 125 ein nützliches Hilfsmittel ist, um den Krankheitsverlauf zu überwachen, bedarf es aufgrund seiner mangelnden Sensitivität und Spezifität neuer zusätzlicher Biomarker.

1.2.2 Human epididymis protein 4

Human epididymis protein 4 (HE4) ist ein Glykoprotein, welches zur Familie der *whey acidic four-disulfide core* Proteine gehört. Es wird in Ovarialkarzinomen exprimiert, wobei die HE4-Expression vom histologischen Subtyp abhängt: In serösen und endometrioiden Tumoren wird HE4 überexprimiert, während klarzellige Tumore eine moderate Expression zeigen und muzinöse Tumore kein HE4 exprimieren.^[32] Da die HE4-Expression von der Diagnose der Krankheit bis zur vollständigen klinischen Remission signifikant abnimmt, kann HE4 als Biomarker für den Therapieerfolg, bzw. das Wiederauftreten von Ovarialkarzinomtumoren dienen.^[33] Es konnte gezeigt werden, dass HE4 eine höhere Spezifität als CA 125 bei der Unterscheidung zwischen gutartigen gynäkologischen Erkrankungen und Ovarialkarzinomen aufweist.^[34] Verglichen mit andere Tumormarkern zeigt HE4 die höchste Sensitivität bei der Detektion von Ovarialkarzinomen, insbesondere in FIGO Stadium I. Eine Kombination von CA 125 und HE4 kann dabei eine signifikant bessere Sensitivität ermöglichen als jeder Marker allein.^[28] Allerdings scheint sowohl Rauchen, als auch die Anwendung oraler Kontrazeptiva die HE4 Expression zu beeinflussen, sodass diese Faktoren bei der Anamnese berücksichtigt werden müssen.^[31]

Bis heute ist die Kombination von CA 125 und HE4 das effizienteste biologische Hilfsmittel zur Diagnose von Ovarialkarzinomen.^[31] Allerdings können beide Biomarker

nicht dazu verwendet werden, um das Ansprechen oder die Resistenz auf Chemotherapie vorherzusagen. Daher werden neue Biomarker für personalisierte Medizin benötigt.^[29]

1.2.3 Neurocalcin δ

Neurocalcin δ (NCALD) wurde als neuer prognostischer Biomarkerkandidat für das Ovarialkarzinom beschrieben.^{[25],[26]} NCALD ist ein N-terminal myristoyliertes 22,24 kDa großes Protein aus der Familie der neuronalen Calciumsensoren.^[35] Ein wichtiges Strukturelement NCALDs stellen zwei Paare von EF-Hand-Domänen dar. Da eine der EF-Hand-Domänen nicht funktionell ist, kann NCALD bis zu drei Ca^{2+} -Ionen binden. Werden zwei oder mehr Ca^{2+} -Ionen gebunden, erfolgt eine Konformationsänderung, die es der Myristoylgruppe erlaubt mit einer Lipiddoppelschichtmembran zu interagieren.^{[35],[36]} NCALD wird im Gehirn, Hoden, Eierstock und Dünndarm stark exprimiert.^[37] Obwohl die Proteinstruktur bekannt ist, ist NCALDs physiologische Funktion weitgehend unklar. Iving *et al.* schlägt eine direkte Wechselwirkung NCALDs mit Clathrin, Tubulin und Actin über die Myristoyl-Gruppe vor.^[38] In humanen Nierenzellen konnte eine mögliche NCALD-abhängige Regulation der Zellmigration und E-Cadherin-Expression gezeigt werden.^[39] Riessland *et al.* vermutet, dass NCALD möglicherweise ein Regulator der Clathrin-abhängigen Endozytose ist.^[40] Über NCALDs Beteiligung an onkologischen Prozessen ist nur wenig bekannt. So konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen durch eine NCALD Überexpression gehemmt wurde.^[41] Es gibt auch erste Hinweise, dass die NCALD Expression eine prognostische Rolle für das Ovarialkarzinom spielen könnte. So stellt Isaksson *et al.* dar, dass eine niedrige *NCALD* mRNA-Expression im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert war.^[42] Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls von Dong *et al.* anhand von *in-silico* Daten gezeigt werden.^[26] Feng *et al.* beschreibt, dass eine niedrige NCALD Proteinexpression in Tumorgewebe von Ovarialkarzinompatientinnen mit einem kürzeren Gesamt- und progressionsfreien Überleben assoziiert ist.^[25] NCALDs Potential als prognostischer Biomarker im Ovarialkarzinom, vor allem im Zusammenhang mit dem Ansprechen der Chemotherapie, bedarf weiterer Studien.

2 Zielsetzung der Arbeit

Unter den gynäkologischen Tumorerkrankungen weist das Ovarialkarzinom die höchste relative Mortalität auf.^[3] Dies kann dadurch begründet werden, dass ein Großteil der Patientinnen in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III und FIGO IV) diagnostiziert wird und im Laufe der Erkrankung eine Platinresistenz entwickelt.^{[4],[9]} Personalisierte Therapiestrategien und die Identifizierung neuer prognostischer und therapierelevanter Biomarker sind daher von hohem klinischem Interesse. Neurocalcin δ (NCALD) wurde als potentieller prognostischer Biomarker für das Ovarialkarzinom vorgeschlagen.^{[25],[26]} Daher ist das erste Ziel dieser Arbeit zu überprüfen, ob die *NCALD* mRNA-Expression mit einem längeren Gesamt- und progressionsfreien Überleben assoziiert ist. In einem nächsten Schritt sollte dann die NCALD Proteinexpression mit dem Patientenüberleben assoziiert werden. Diese Untersuchungen wurden an Tumorgewebe durchgeführt (mRNA-Analysen mittels qPCR; Proteinexpression mittels Immunohistochemie).

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollte ermittelt werden, ob sich NCALD nicht nur als prognostischer, sondern auch als therapierelevanter Biomarker für das Ovarialkarzinom eignet. Dazu wurden NCALD Knockdownzelllinien erstellt, welche mittels MTT-Assay analysiert wurden.

Zusammenfassend lassen sich folgende Ziele benennen:

- 1. Eignet sich NCALD als prognostischer Biomarker für das Ovarialkarzinom, bzw. existiert eine Assoziation zwischen hoher NCALD mRNA- und Proteinexpression und einem längeren Patientenüberleben?**
- 2. Könnte die NCALD Expression möglicherweise einen Einfluss auf das Ansprechen der Chemotherapie haben und könnte NCALD daher als ein therapierelevanter Biomarker für das Ovarialkarzinom eingesetzt werden?**

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3.1 Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller (Firmensitz, Land)
Agarose	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, DE)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Antibody diluent 500 ml ready-to-use	ZytoMed Systems (Berlin, DE)
Borsäure	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Cisplatin-Lösung (1 mg/ml) für Zellkulturversuche	Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
Citronensäure Monohydrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
cComplete, EDTA-freie Proteaseinhibitor-Cocktail Tabletten	Roche (Basel, CH)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat Dihydrat (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNA Molekulargewichtsmarker V (8-587 bp)	Roche (Basel, CH)
DNA Polymerase AmpliTaq Gold	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
EDTA (Versen) 1% (w/v) sterile Lösung	Merck (Darmstadt, DE)
Ethanol (70%)	Staub & Co. - Silbermann (Nürnberg, DE)
Ethanol (96%)	Staub & Co. - Silbermann (Nürnberg, DE)
Ethanol (absolut)	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
Ethidiumbromid, 1%-ige Lösung	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ficoll® PM 400	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Glycerin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
H ₂ O ₂ (30%)	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
HCl (37%)	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
HEPES 1M sterile Lösung	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Chemikalie	Hersteller (Firmensitz, Land)
Illustra™ Solution dNTPs: DNA Polymerization Mix	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NaCl	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
NaOH (2M)	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
Natriumdiphosphat Decahydrat (Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Orange G	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Paclitaxel-Lösung (6 mg/ml) für Zellkulturversuche	Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
10 X PCR Buffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pertex	Medite (Orlando, USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
2-Propanol	Staub & Co. - Silbermann (Nürnberg, DE)
Proteinauftragspuffer Roti®-Load 1 (reduzierend, 4X-konzentriert)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Proteinlängenstandard PageRuler™ Plus, vorgefärbt, 10 bis 250 kDa	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RNAlater RNA Stabilisierungsreagenz	Qiagen N.V. (Venlo, NL)
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypanblau	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin / EDTA (0.5% / 0.2% (w/v)) 10X sterile Lösung in PBS	Merck (Darmstadt, DE)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Xylol	Staub & Co. - Silbermann (Nürnberg, DE)
Ziegenserum	Dako (Glostrup, DK)
ZytoChem Plus HRP one-step polymer	ZytoMed Systems (Berlin, DE)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller (Firmensitz, Land)
Abdichtungsfolie LightCycler 480 II	Roche (Basel, CH)
Abdichtungsfolie Rotilabo-sealing films	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Abdichtungsfolie, optisch klar, selbstklebend Typ AB-1170	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Einwegpinzette, steril	J.Söllner AG (Deggendorf, DE)
Einwegskalpell Nr. 10, steril	Feather (Osaka, JP)
Filterpapier MN 827 B (200 x 200 mm; 0.7 mm dick)	Macherey-Nagel (Düren, DE)
Filterspitzen 10, 20, 200, 1000 µl	Brand (Wertheim, DE)
Handschuhe	Sempercare (Singapore, SG)
Handschuhe Vasco Nitril light	B. Braun Vet Care GmbH (Tuttlingen, DE)
Kryoröhrchen 1,5 ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mahlkugeln aus rostfreiem Stahl, für Schwingmühlen (d = 9 mm)	Retsch (Haan, DE)
Mikrotiterplatte 96 well, flacher Boden, klar	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AT)
Mikrotiterplatte 96 well, weiß	Roche (Basel, CH)
Mikrotiterplatte, optische 96-well Platte PM 3100	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
OP-Maske Sentinex Lite EL	Lohmann & Raucher (Wien, AT)
Pasteurpipette	NeoLab (Heidelberg, DE)
Petrischale, steril (d = 10 cm)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AT)
Reagenzreservoir, 55 ml, PS, steril, individuell verpackt	Starlab (Hamburg, DE)
Reagenzreservoir, 60 ml, PP, steril	Brand (Wertheim, DE)
Reaktionsgefäß 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Serologische Pipetten CELLSTAR (2-, 5-, 10-, 25-, 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AT)
Spitzen 10, 20, 200, 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Spitzen für elektronischen Multisteppler "HandyStep"; 1,25 ml	Brand (Wertheim, DE)
Sterilfilter Minisart (Porengröße 0,1 µm)	Sartorius (Göttingen, DE)
Transfermembran PVDF Immobilion-PSQ (Porengröße: 0,2 µm)	Merck Millipore (Darmstadt, DE)

Verbrauchsmaterial	Hersteller (Firmensitz, Land)
Zellkulturflasche mit Filterschraubverschluss (T25, T75)	TPP (Trasadingen, CH)
Zellkulturpetrischale Falcon, 100 × 20 mm	Corning (Corning, USA)
Zellkulturpetrischale Falcon, 60 × 15 mm	BD (Franklin Lakes, USA)
Zellkulturplatte, flacher Boden (6-, 12-, 24-, 48-, 96 well)	Corning (Corning, USA)
Zellschaber, 28 cm lang	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AT)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AT)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarsted (Nümbrecht, DE)

3.1.3 Kits

Tabelle 3.3 Liste der verwendeten Kits.

Kit	Hersteller (Firmensitz, Land)
DAB Substrate Kit High Contrast	ZytoMed Systems (Berlin, DE)
First-Strand cDNA Synthesis Kit	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pierce™ ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen N.V. (Venlo, NL)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen N.V. (Venlo, NL)
RNase-Free DNase Set	Qiagen N.V. (Venlo, NL)
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen N.V. (Venlo, NL)
RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V. (Venlo, NL)
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

3.1.4 Antikörper

Tabelle 3.4 Liste der verwendeten Antikörper. IHC: Immunhistochemie, WB: Western Blot.

Method	Antikörper	Hersteller (Firmensitz, Land)	Produkt-Nr.
IHC			
<i>primär</i>	anti-NCALD	Abcam (Cambridge, UK)	ab155161
WB			
<i>primär</i>	anti-NCALD	Proteintech (Chicago, USA)	12925-1-AP
	anti-GAPDH	Merck Millipore (Darmstadt, DE)	MAB374
<i>sekundär</i>	anti-Kaninchen HRP	GE Healthcare (Chicago, USA),	NA934V
	anti-Maus HRP	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	115-035-003

3.1.5 Geräte

Tabelle 3.5 Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller (Firmensitz, Land)
ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Autoklav Varioklav Classic 400E	H+P Labortechnik (Oberschleißheim, DE)
Blottingkammer Mini PROTEAN Trans-Blott Cell	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Elektronische Pipettierhilfe Stripettor™ Plus	Corning (Corning, USA)
Einfrierbehälter Mr. Frosty Cryo 1°C	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Elektronischer Multistepper HandyStep	Brand (Wertheim, DE)
Elektrophoreseapparatur E835 300 V-500 mA)	Consort (Turnhout, BE)
Elektrophoresekammer Mini PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Etikettendrucker BBP11	Brady Corporation (Milwaukee, USA)
Gelgießvorrichtung Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Heizblock HBT-1-131	HLC BioTech (Bovenden, DE)
Inkubator Heracell 150i CO ₂	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Labor-pH-Meter CG 842	Schott (Mainz, DE)
LightCycler 480 II	Roche (Basel, CH)
Mehrkanalpipette Transferpette S-8 (10 µl)	Brand (Wertheim, DE)
Mikro-Dismembrator S	Sartorius (Göttingen, DE)
Mikroskop Axioskop	Zeiss (Oberkochen, DE)

3 Material und Methoden

Gerät	Hersteller (Firmensitz, Land)
Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mikrowelle R-937	Sharp (Osaka, JP)
Molecular Imager ChemiDoc TM XRS	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Multistep-Pipette HandyStep electronic	Brand (Wertheim, DE)
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, DE)
Objektträgerscanner NanoZoomer 2.0-RS C10730	Hamamatsu Photonics (Hamamatsu, JP)
Pipetten Pipet-Lite (2-, 10-, 200-, 1000 µl)	Mettler-Toledo, LLC (Columbus, USA)
Schnellkochtopf PERFECT	WMF AG (Geislingen/ Steige, DE)
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus (Hanau, DE)
Spektralphotometer NanoDrop™ ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, DE)
TProfessional TRIO Thermocycler	Analytik Jena (Jena, DE)
Trockenschrank	Memmert (Schwabach, DE)
Vortex Mixer Typ 7-2020	NeoLab (Heidelberg, DE)
Waage Typ BA 110 S	Sartorius (Göttingen, DE)
Waage Typ EW1500-2M	Kern & Sohn GmbH (Balingen, DE)
Wasserbad Typ 3042	Köttermann Labortechnik (Uetze/Hänigsen, DE)
Zellkulturmikroskop CK30	Olympus (Tokio, JP)
Zentrifugalverdampfer SpeedVac SVC 100H	Savant Instruments (Farmingdale, USA)
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen, DE)
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich (Tuttlingen, DE)

3.1.6 Software

Tabelle 3.6 Liste der verwendeten Software.

Software, Version	Hersteller (Firmensitz, Land)
ABI PRISM 7000 SDS 1.2.3	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
BarTender Professional 10.0 SR3	Seagull Scientific (Bellevue, USA)
IBM SPSS Statistics 24.0	IBM (Armonk, USA)
Image Lab 5.1	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
LightCycler 480 II Software 1.5.0 SP4	Roche (Basel, CH)
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
NDP.scan version 2.5.86	Consort (Turnhout, BE)
NDP.view version 2	Hamamatsu Photonics (Hamamatsu, JP)

3.2 Patientenkollektive

3.2.1 Validierungskollektiv

Das Validierungskollektiv bestand aus 31 repräsentativen Proben von den 102 fortgeschrittenen, optimal operierten Ovarialkarzinomen in dem von Volkmann *et al.* beschriebenen Kollektiv.^[43] Anhand dieses Kollektivs sollten die von Dr. Juliane Ramser und Prof. Alfons Meindl in der Arbeitsgruppe „Gynäkologische Tumorgenetik“ am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München erhobenen Daten zur *NCALD* Genexpression überprüft werden. Für die RNA-Analysen wurde Gewebe verwendet, welches in Flüssigstickstofftanks oder in RNAlater bei -80 °C gelagert wurde.

3.2.2 Studienkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 102 Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom, welche von 1990 bis 2008 in der Frauenklinik des Universitätskrankenhauses rechts der Isar der Technischen Universität München behandelt wurden. Die an diesem Patientenkollektiv durchgeführten Analysen wurden im Rahmen eines wissenschaftlichen Projektes ausgeführt, welches durch das lokale Ethikkomitee des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

genehmigt wurde. Das für immunhistochemische Analysen verwendete Tumorgewebe lag in Paraffinblöcken eingebettet vor.

Tabelle 3.7 Klinische Charakteristika des immunhistochemischen Patientenkollektivs.

	Primäre Ovarialkarzinome (n = 102)		
		(n)	(%)
Alter bei Operation	< 60 Jahre	55	53,9
	≥ 60 Jahre	47	46,1
Durchschnittl. Alter bei Operation	58 (20 – 84)		
Postoperativer Tumorrest	0 cm	44	43,1
	> 0 und < 1 cm	22	21,6
	≥ 1 cm	36	35,3
FIGO Status	III	73	71,6
	IV	29	28,4
Nodalstatus	N0	29	28,4
	N1	52	51,0
	Nx	21	20,6
Aszitesvolumen	< 500 ml	59	57,8
	≥ 500 ml	40	39,2
	unbekannt	3	2,9
Histologischer Typ	serös	79	77,5
	endometrioid	6	5,9
	klarzellig	3	2,9
	muzinös	4	3,9
	gering differenziert	1	1,0
	undifferenziert	7	6,9
	andere	2	2,0
Histologisches Grading	Low	10	9,8
	High	80	78,4
	undifferenziert	12	11,8
Adjuvante Chemotherapie	Platin	50	49,0
	Platin-Taxol	45	44,1
	andere	5	4,9
	keine	2	2,0

Für immunhistochemische Analysen wurde ein Patientenkollektiv mit Patientinnen zusammengestellt, welche ein fortgeschrittenes FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) Stadium III oder IV aufwiesen (siehe Tabelle 3.7). 93 % der Patientinnen erhielt eine adjuvante, platinhaltige Primärchemotherapie (n = 95), 47 %

von ihnen in Kombination mit Paclitaxel (n = 45). Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 40 Monate (1 – 251 Monate).

3.3 Tumorgewebsspezifische Methoden

3.3.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Tumorgewebe

Die Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus Tumorgewebe wurde mithilfe des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (siehe Tabelle 3.3) gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Hierzu wurde Tumorgewebe verwendet, welches entweder in Flüssigstickstofftanks oder in RNAlater bei -80 °C gelagert wurde.

60 – 75 mg Tumorgewebe wurden mit einer Mahlkugel aus rostfreiem Stahl in ein 1,5 ml Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff gekühlt und durch einen Mikro-Dismembrator bei 3000 Umdrehungen pro Minute zwei Mal für 30 s homogenisiert. Das homogenisierte Tumorgewebe wurde in 1 ml QIAzol Lysis Reagent aufgenommen und entsprechend der Herstellerangaben ab Punkt 4 des Handbuchs^[44] weiter bearbeitet. Ein optionaler DNase-Verdau (siehe Handbuch Punkt 10^[44]) wurde mit dem RNase-Free DNase Set (siehe Tabelle 3.3) anhand der Herstellerangaben durchgeführt. Der optionale Zentrifugationsschritt Punkt 14 wurde ebenfalls ausgeführt.^[44] Die extrahierte RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurden anhand eines Spektralphotometers (NanoDrop, siehe Tabelle 3.5) bestimmt. Für Folgeversuche wurde nur RNA, deren Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} zwischen 2,05 und 2,16 lag, verwendet.

3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur weiteren Qualitäts- und Integritätskontrolle wurde die frisch extrahierte RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Hierfür wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser auf 200 ng/µl eingestellt. Jeweils 1 µl verdünnte RNA-Lösung wurde mit 1 µl 2 X-Auftragspuffer vermischt und bei 110 V für 45 min auf einem 1,5 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die hierfür verwendeten Puffer und Lösungen sind mit ihrer Zusammensetzung in Tabelle 3.8 angegeben. Das so erhaltene Gel wurde mit dem

Molecular Imager ChemiDoc™ XRS (siehe Tabelle 3.5) und der dazugehörigen Software Image Lab 5.1 (siehe Tabelle 3.6) dokumentiert und ausgewertet.

Tabelle 3.8 Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Agarosegelelektrophorese.

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Agarosegel	1,5 % (w/v) Agarose TBE Puffer (1 X) 0,0033 % (v/v) Ethidiumbromidlösung
Auftragspuffer (2 X)	TE-Puffer (1 X) 25 % (w/v) Ficoll Orange G
Längenstandard	75 % (v/v) TE-Puffer (1 X) 20 % (v/v) Auftragspuffer (2 X) 5 % (v/v) DNA Molekulargewichtsmarker V (8-587 bp)
TBE-Puffer (10 X)	0,84 M TRIS 0,89 M Borsäure 0,02 M EDTA
TE-Puffer (1 X), pH 8,0	10 mM TRIS 1 mM EDTA

Die Gesamt-RNA aus Säugerzellen besteht zu über 80 % aus ribosomaler RNA (rRNA) und nur zu geringen Teilen aus messenger RNA (mRNA). Die Qualität der Gesamt-RNA wurde daher anhand der Integrität der rRNA ermittelt. Intakte rRNA stellt sich in der Gelelektrophorese als zwei Banden, bestehend aus der 18S-Untereinheit (~1,9 kb) und der 28S-Untereinheit (~5 kb), dar.^[45] Daher wurden für Folgeversuche nur solche RNAs verwendet, die ausgeprägte 18S- und 28S-Banden zeigten.

3.3.3 cDNA Synthese (Gesamt-RNA aus Tumorgewebe)

Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des First-Strand cDNA Synthesis Kit der Firma GE Healthcare (siehe Tabelle 3.3). Dabei wurden 2,0 – 2,5 µg frisch isolierte Gesamt-RNA (siehe Abschnitt 3.3.1) mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt und durch „random hexadeoxynucleotide“ Primer pd(N)₆ nach

Herstellerangaben zu cDNA umgeschrieben. Die Konzentration der erhaltenen cDNA wurde am Spektralphotometer (NanoDrop) gemessen. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert und bei Gebrauch immer auf Eis gehalten.

3.3.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) – Gewebe

Zur Analyse der relativen *NCALD* mRNA-Expressionslevel wurden qPCRs nach dem TaqMan®-Prinzip durchgeführt. Dabei setzt sich ein TaqMan®-Assay aus einer Sonde und einem genspezifischen Primer zusammen. Die Sonde besteht am 5'-Ende aus einem Reporter-Farbstoff (hier 6-FAM-phosphoramidit, FAM) und am 3'-Ende aus einem nicht-fluoreszierenden Quencher sowie einem Minor-Grove-Binder. Durch die Bindung an der kleinen Furche („minor groove“) wird die Doppelhelix stabilisiert, was die Verwendung kürzerer Sonden erlaubt.^[46]

Während der qPCR hybridisiert die Sonde an eine cDNA-Sequenz zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Ist die Sonde intakt sind Reporterfarbstoff und Quencher in räumlicher Nähe, was mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zur Unterdrückung der Reporterfluoreszenz führt. Während der Extensionsphase der qPCR wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq®-Polymerase verdrängt und gespalten, sodass die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter unterbrochen wird und Fluoreszenz vom Analysegerät detektiert wird. Mit jedem PCR-Zyklus steigt dementsprechend die Fluoreszenz des Reporters an. Da nicht vollständig hybridisierte Sonden verdrängt werden, bevor sie durch die AmpliTaq®-Polymerase gespalten werden können, ist das detektierte Fluoreszenzsignal sequenzspezifisch.^[46]

Die verwendeten TaqMan® Gene Expression Single-tube Assays für das zu untersuchende Gen *NCALD* und endogene Kontrolle *ALAS1* sowie der TaqMan® Gene Expression Master Mix sind in Tabelle 3.9 angegeben.

Tabelle 3.9 Liste der verwendeten TaqMan®-Reagenzien.

TaqMan	Hersteller (Firmensitz, Land)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay <i>ALAS1</i> Hs00167441_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay <i>NCALD</i> Hs00230737_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Die mittels cDNA-Synthese (Abschnitt 3.3.3) erhaltene cDNA wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 62,5 ng/ μ l verdünnt und auf Eis gekühlt. In einer optischen 96-well Platte PM 3100 wurden mit einer Multistep-Pipette pro well 36 μ l Mastermix vorgelegt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.10) und 4 μ l verdünnte cDNA mithilfe einer Mehrkanalpipette möglichst luftblasenfrei zugegeben.

Tabelle 3.10 Zusammensetzung des Mastermixes.

Reagenz	Volumen
TaqMan® Gene Expression Master Mix	20 μ l
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay	2 μ l
Nukleasefreies Wasser	14 μ l

Die Platte wurde durch eine Abdichtungsfolie Typ AB-1170 verschlossen und zwei Mal für jeweils 30 s bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die qPCR wurde im ABI PRISM 7000 Sequence Detection System mit in Tabelle 3.11 gegebenem Temperaturprogramm durchgeführt und mithilfe des ABI PRISM 7000 SDS 1.2.3 Programmes ausgewertet.

Tabelle 3.11 TaqMan®-qPCR Temperaturprogramm.

Temperatur	Zeit	Zyklen
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1

95 °C	15 s	45
60 °C	1 min	

Sämtliche Proben wurden als Dubletten aufgetragen. Als Negativkontrolle („no template control“) diente je Assay ein Ansatz, bei dem die cDNA durch nukleasefreies Wasser ersetzt wurde. Um mehrere Platten verknüpft auswerten zu können, wurde eine Linker-cDNA mittlerer Genexpression gewählt, welche Teil jeder Platte war.

Die Genexpressionslevel wurden mittels relativer Quantifizierung nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode berechnet^[47] und in Microsoft Excel als Balkendiagramme dargestellt.

3.3.5 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Immunhistochemische (IHC) Färbungen wurden an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Ovarialkarzinomgewebeschnitten (2 µm) von Tissue Microarrays (TMA) durchgeführt. Das hierfür verwendete Patientenkollektiv wurde in Abschnitt 3.2 detailliert beschrieben. Zur Durchführung der immunhistochemischen Analysen wurden mehrere Antikörper getestet und ein NCALD-spezifisches Färbeprotokoll etabliert. Als Primärantikörper wurde der polyklonale Anti-NCALD-Antikörper ab155161 von Abcam (Cambridge, UK) verwendet (siehe Tabelle 3.4).

TMAAs wurden über Nacht bei 58 °C im Trockenschrank erwärmt, in Xylol entparaffiniert (3 × 10 min) und in 2-Propanol und Ethanol rehydriert (2 × 100 %-iges 2-Propanol, 1 × 96 %-iges Ethanol, 1 × 70 %-iges Ethanol, jeweils für 5 min). Danach wurden die Schnitte für 5 min in TBST-Puffer gewaschen (alle verwendeten Pufferzusammensetzungen und Lösungen sind in Tabelle 3.12 aufgelistet). Zum Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die TMAAs 20 min in 3 %-iger H₂O₂-Lösung (in H₂O verdünnt) inkubiert, 2 min in Leitungswasser und 5 min in TBST gewaschen. Die Antigendemaskierung erfolgte in einem Liter vorgewärmten 10 mM Tris-EDTA-Puffer (pH 9,0) für 4 min in einem Schnellkochtopf. Die Schnitte wurden 5 min unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden die TMAAs für 30 min bei Raumtemperatur (RT) mit 5 %-igem Ziegen Serum (120 µl/Schnitt, in TBS-Puffer verdünnt) in einer feuchten Kammer blockiert. Überschüssiges Ziegen Serum wurde vorsichtig abgetupft und die Schnitte wurden für 1 h bei RT in einer feuchten, dunklen Kammer mit NCALD-Primärantikörper (120 µl/Schnitt, 1:500 in antibody diluent verdünnt) inkubiert. Nach einem weiteren 5 min Waschschrift mit TBST-Puffer wurden die TMAAs in ZytoChem Plus HRP one-step polymer ZUC053-100 (120 µl/Schnitt) für 30 min ebenfalls bei RT in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Danach wurde für 5 min in TBST-Puffer gewaschen und für 8 min bei RT in einer feuchten Kammer in DAB-Lösung (DAB Substrate Kit High Contrast nach Herstellerangaben, siehe Tabelle 3.3) gefärbt (120 µl/Schnitt). Abschließend wurden die Schnitte für 5 min in TBST-Puffer gewaschen, 1 min in saurer Hämalaulösung nach Mayer gegengefärbt, 3 min unter fließendem Leitungswasser und 1 min in deionisiertem Wasser gewaschen. Die Schnitte

wurden dehydriert (1 × 70 %-iges Ethanol, 1 × 96 %-iges Ethanol, 2 × 100 %-iges 2-Propanol, 2 × Xylol, jeweils für 3 min) und mit Pertex eingedeckt.

Die gefärbten TMAs wurden mithilfe des Objektträgerscanner NanoZoomer 2.0-RS C10730 eingescannt.

Tabelle 3.12 Liste der verwendeten Puffer für immunhistochemische Färbungen.

Puffer	Zusammensetzung
TBS (pH 7,6)	50 mM M TRIS 154 mM NaCl
TBST (pH 7,6)	50 mM TRIS 154 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20
TRIS-EDTA (pH 9,0)	10 mM TRIS 1 mM EDTA

3.3.6 Scoring der immunhistochemischen Färbungen

Die NCALD-Immunhistochemie-Färbung wurde von einer Pathologin (Dr. Kristina Schwamborn, Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) bewertet, welche weder Einblick in die klinischen Daten des Patientenkollektivs noch in *NCALD* mRNA Analysen hatte.

Tabelle 3.13 Bewertungsskala zur semi-quantitativen Bewertung immunhistochemischer Färbungen.

Kriterium	Score	Bewertung
Färbeintensität (SI)	0	keine Expression
	1	schwache Expression
	2	intermediäre Expression
	3	starke Expression
Positiv gefärbte Zellen (PP)	0	keine gefärbten Zellen (0 %)
	1	< 10 % gefärbte Zellen
	2	10-50 % gefärbte Zellen
	3	51-80 % gefärbte Zellen
	4	> 80 % gefärbte Zellen

Es wurde ein semi-quantitativer Score erstellt, welcher sowohl die Färbeintensität (SI, 0-3) als auch den Prozentsatz positiv gefärbter Zellen (PP, 0-4) beinhaltet (siehe Tabelle 3.13). Der Gesamt-Immunhistochemie-Score (NCALD IHC-Score) wurde durch Multiplikation von SI mit PP erhalten und ergab dementsprechend eine Wertung zwischen 0-12. Eine niedrige NCALD Expression wurde als Score zwischen 0-4 und eine hohe NCALD Expression als Score zwischen 6-12 definiert. Die Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Analysen wurde durch die Pathologin Dr. Kristina Schwamborn (Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) unterstützt und betreut.

3.3.7 Analyse von unabhängigen mRNA-Microarray Datensätzen

Um die Ergebnisse der *NCALD*-Assoziation mit dem Patientenüberleben in Ovarialkarzinomproben validieren zu können, wurden unabhängige, öffentlich zugängliche Affymetrix-Microarray-Datensätze (Probe_ID 211685_s_at) des online Biomarker-Assessment Tool *KM-Plotter* (<http://kmplot.com/analysis/>) verwendet.^[48]

3.4 Zellkulturtechnische Methoden

3.4.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende adhärent wachsende Krebszelllinien verwendet:

HEY: Die Ovarialkarzinomzelllinie HEY wurde ursprünglich aus einem humanen, mäßig differenzierten, papillären Zystadenokarzinom des Ovars erhalten, welcher zuvor als Xenograft (HX-62) in immunkomprimierten Mäusen eingesetzt wurde.^[49]

293T: 293T ist eine von HEK 293 abstammende, humane, embryonale Nierenepithelzelllinie, welche im Gegensatz zur HEK 293 Zelllinie zusätzlich das SV40 T-Antigen exprimiert. 293T Zellen werden daher häufig als Verpackungszelllinie zur Produktion lentiviraler Virionen eingesetzt.^[50]

3.4.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinie 293T wurde lediglich zur Produktion lentiviraler Partikel verwendet (siehe Abschnitt 3.4.4) und zu diesem Zwecke ausschließlich von Frau Katja Honert (Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) kultiviert.

Die Kultivierung von HEY erfolgte antibiotikafrei bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in RPMI 1640 mit den in Tabelle 3.14 angegebenen Zusätzen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Dazu wurde das alte Zellmedium verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 0,05 % (w/v) Trypsin / 0,02 % (w/v) EDTA in PBS für 8 min im Brutschrank bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden 3 min lang bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch Trypanblaufärbung bestimmt und es wurden 7000 – 8000 HEY Zellen pro cm² in frische Zellkulturflaschen ausgesät.

Tabelle 3.14 Zusammensetzung des Zellkulturmediums.

Zelllinie	Grundmedium	Zusätze
HEY	RPMI 1640	10 % (v/v) FBS 10 mM HEPES

3.4.3 Mykoplasmentest

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden sowohl monatlich, als auch nach jedem Auftauen und vor jeder Kryokonservierung auf Mykoplasmen untersucht und jederzeit für negativ befunden.

Dazu wurden 1×10^6 Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit (siehe Tabelle 3.3) wurde gemäß den Herstellerangaben DNA isoliert, auf eine Konzentration von 40 – 50 ng/µl eingestellt und mittels PCR auf Mykoplasmenkontamination überprüft. Hierfür wurde der in Tabelle 3.15 dargestellte Ansatz verwendet. Teil jeder PCR war außerdem eine Positivkontrolle (Mykoplasmen-positiv getestete DNA) und Negativkontrolle

(Wasser anstelle von isolierter DNA). Primer F (5' – CGC CTG AGT AGT ACG TTC GC – 3') und Primer R (5' – GCG GTG TGT ACA AGA CCC GA – 3') wurden von der Firma Metabion GmbH (Planegg, DE) bezogen und als 10 µM Lösung (in H₂O) in der Mykoplasmen-PCR eingesetzt.

Tabelle 3.15 Zusammensetzung eines Mykoplasmen-PCR Ansatzes.

Reagenz	Volumen
H ₂ O	39 µl
10X PCR Puffer	5 µl
dNTP	4 µl
Primer F (5' primer)	2 µl
Primer R (3' primer)	2 µl
Polymerase AmpliTaq Gold	0,15 µl
Isolierte DNA	2 µl (≙ 80 – 100 ng)

Die PCR wurde anhand des in Tabelle 3.16 gegebenen Temperaturprogramms durchgeführt und das PCR-Produkt anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 3.3.2). Bei positiven Testergebnissen wurde eine ~500 bp große Bande erhalten.

Tabelle 3.16 Temperaturprogramm der Mykoplasmen-PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	10 min	1
94 °C	30 s	
60 °C	1 min	45
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	1
4 °C	∞	1

3.4.4 Erstellung stabiler *NCALD*-Knockdowns in der Zelllinie HEY

Für den stabilen *NCALD*-Knockdown wurden HEY-Zellen durch lentiviralen Gentransfer mit short hairpin RNA (shRNA)-Vektoren transduziert. Bei shRNA handelt es sich um künstliche, haarnadelförmige RNA, welche verwendet werden kann, um Genexpression

mittels RNA-Interferenz (RNAi) zu reduzieren.^[51] Dafür wurden zunächst entsprechende shRNA-Plasmide exprimiert, Viruspartikel in der Verpackungszelllinie 293T erstellt und schließlich die Ovarialkarzinomzellen lentiviral transduziert.

Die gesamte Durchführung des Kapitels 3.4.4 erfolgte in Kooperation mit Prof. Achim Krüger (Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) und unter Anleitung von Frau Katja Honert (Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München).

3.4.4.1 Präparation plasmidischer DNA aus *Escherichia coli* (*E. coli*)

Plasmide mit shRNA-Sequenzen gegen *NCALD* wurden als bakterieller Glycerinstock (MISSION ® shRNA Bacterial Glycerol Stock) bezogen (siehe Tabelle 3.17).

Tabelle 3.17 Verwendete Transferplasmide zum *NCALD*-Knockdown.

Plasmid	Hersteller (Firmensitz, Land)
pLK0.1/sh-NCALD #1 (TRCN0000153990)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
pLK0.1/sh-NCALD #2 (TRCN0000152815)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
pLK0.1/sh-NCALD #3 (TRCN0000153750)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
pLK0.1/sh-NCALD #4 (TRCN0000157590)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
pLK0.1/sh-NCALD #5 (TRCN0000152345)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Die Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mithilfe des „Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen N.V. (siehe Tabelle 3.3) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Ampicillin (bereitgestellt durch Prof. Achim Krüger, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) wurde mit 100 µg/ml als Selektionsantibiotikum zugegeben. Die isolierte, getrocknete DNA wurde für 48 h in 150 µl TE-Puffer (pH 8,0) bei 4 °C gelöst, die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die gelöste DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.4.4.2 Co-Transfektion zur Herstellung lentiviraler Partikel

Lentivirale Partikel wurden in der Verpackungszelllinie 293T hergestellt. Neben dem Transferplasmid zum Knockdown von *NCALD* wurden zur Viruspartikelherstellung noch drei Verpackungsplasmide benötigt: pMD.GP beinhaltet die Gene *gag* und *pol*, pMD.G kodiert *env* und pRSV-*rev* trägt das akzessorische *rev* Gen.

Pro Transfektionsansatz wurden 5×10^6 293T-Zellen in Zellkulturpetrischalen (100 × 20 mm) ausgesät. Am Folgetag wurde das Zellmedium gewechselt; die Co-Transfektion wurde 3 h später durchgeführt. Für jede Transfektion wurden 1,5 ml Opti-MEM Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 36 µl Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden die Virusverpackungsplasmide (bereitgestellt von Prof. Achim Krüger, Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) mit je einem *NCALD*-Knockdown-Transferplasmid in 1,5 ml Opti-MEM Medium verdünnt (siehe Tabelle 3.18).

Tabelle 3.18 Verwendete Plasmide zur Erstellung der Virionen.

Plasmid	Menge	Funktion
Transferplasmid (siehe Tabelle 2.14)	10 µg	<i>NCALD</i> -Knockdown
pMD.GP	6,6 µg	Virusherstellung, kodiert <i>gag</i> und <i>pol</i>
pMD.G	3 µg	Virusherstellung, kodiert <i>env</i>
pRSV- <i>rev</i>	5 µg	Virusherstellung, kodiert <i>rev</i>

Danach wurden je Transfektion beide Ansätze (Lipofectamine-Opti-MEM und Plasmide-Opti-MEM) gemischt und zur Bildung des DNA-Lipofectamin-Komplexes für 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der 293T Zellen verworfen und durch 5 ml Opti-MEM Medium mit 10 % FBS ersetzt. Nun wurden die DNA-Lipofectamin-Komplexe vorsichtig tropfenweise zu den 293T Zellen gegeben und für 6 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch 10 ml frisches 293T Medium ersetzt. 48 h nach der Co-Transfektion waren die 293T Zellen vollständig lysiert. Der virushaltige Zellüberstand wurde vorsichtig abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter filtriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.4.3 Lentivirale Transduktion der Ovarialkarzinomzelllinie HEY

HEY-Zellen wurden zusätzlich zu den in Abschnitt 3.4.4.2 hergestellten *NCALD*-spezifischen Virusüberständen ebenfalls mit einer zu keiner humanen oder murinen Gensequenz komplementären Kontroll-shRNA (sh-NT, *non targeting*) transduziert. Diese wurde bereits als Virusüberstand von Prof. Achim Krüger (Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) bereitgestellt (ursprünglich bezogen als SHC202 von der Firma Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Die Sequenzen aller verwendeten shRNAs sind in Tabelle 3.19 gegeben.

Pro Transfektionsansatz wurden 1×10^5 HEY-Zellen in Zellkulturpetrischalen (60×15 mm) ausgesät. Am Folgetag wurden das Medium verworfen, die HEY-Zellen einmal mit PBS gewaschen und je Ansatz mit 1 ml virushaltigem Überstand (siehe Abschnitt 3.4.4.2) in Anwesenheit von 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) für 3 h unter regelmäßigem Schwenken im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Danach wurden 3 ml HEY-Medium zugegeben und die Zellen wurden für 48 h im Brutschrank gelassen. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden die Virusüberstände entfernt. 72 h später erfolgte die Selektion transduzierter HEY-Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Die Zellen wurden so lange mit Puromycin behandelt, bis alle Zellen einer nicht-transduzierten Kontrolle vollständig abgestorben waren (Dauer ca. 70 h).

Tabelle 3.19 Sequenzen der verwendeten shRNAs.

shRNA	Sequenz
sh-NCALD #1 (TRCN0000153990)	CCGGCCACAGAAAGAGAGACATCATCTCGA-GATGATGTCTCTCTTTCTGTGGTTTTTTG
sh-NCALD #2 (TRCN0000152815)	CCGGGCCCAAATTCTCAAGGTGTTCTCGA-GAACACCTTGAGAATTTGGGCTTTTTTTG
sh-NCALD #3 (TRCN0000153750)	CCGGCCAGGAATGGTATAAAGGCTTCTCGA-GAAGCCTTTATACCATTCTGGTTTTTTTG
sh-NCALD #4 (TRCN0000157590)	CCGGGTGATCGTGCAGGCAATCTATCTCGA-GATAGATTGCCTGCACGATCACTTTTTTTG
sh-NCALD #5 (TRCN0000152345)	CCGGCCTGTTAAAGAATCAGAGGTTCTCGA-GAACCTCTGATTCTTTAACAGGTTTTTTTG
sh-NT (ctrl) (SHC202)	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGA-GTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTT

Von den fünf gegen *NCALD* verwendeten shRNA-Konstrukten (sh-NCALD #1-5, Tabelle 3.19) wurden die beiden Konstrukte für Folgeversuche ausgewählt, welche zum effektivsten Knockdown führten (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2).

3.4.5 Extraktion von Gesamt-RNA aus HEY-Zellen

Die Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus HEY-Zellen wurde mithilfe des RNeasy Mini Kit (siehe Tabelle 3.3) gemäß den Herstellerangaben extrahiert.

Hierzu wurden 5×10^5 HEY-Zellen in Zellkulturpetrischalen (100 × 20 mm) ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen (Zellkonfluenz zwischen 40-60 %) einmal mit PBS gewaschen, durch 8-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C im Brutschrank abgelöst und in Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 3 min lang bei 300 *g* zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 1 ml frischem Medium aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach abermals 3-minütigem Zentrifugieren bei 300 *g* wurde der Überstand restlos verworfen. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, indem das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert wurde und entsprechend der Herstellerangaben ab Punkt 3a weiter bearbeitet wurde.^[52] Ein optionaler DNase-Verdau (siehe Handbuch Punkt 5^[52]) wurde mit dem RNase-Free DNase Set (siehe Tabelle 3.3) anhand der Herstellerangaben durchgeführt. Der optionale Zentrifugationsschritt Punkt 9 wurde ebenfalls ausgeführt.^[52] Die extrahierte RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurden anhand eines Spektralphotometers (NanoDrops, siehe Tabelle 3.5) bestimmt. Für Folgeversuche wurde nur RNA, deren Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} zwischen 2,05 und 2,16 lag, verwendet. Zur weiteren Qualitäts- und Integritätskontrolle wurde die frisch extrahierte RNA ebenfalls mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 3.3.2)

3.4.6 cDNA Synthese (Gesamt-RNA aus Zellen)

Die cDNA-Synthese der Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte wie bereits in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, mit dem Unterschied, dass 2,0 – 2,5 µg frisch isolierte RNA (siehe Abschnitt 3.4.5) mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8 µl (anstelle von 20 µl) eingestellt wurden.

3.4.7 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) – Zellen

Das Prinzip der TaqMan®-basierten qPCR wurde bereits ausführlich in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Die Durchführung fand ebenfalls wie in Abschnitt 3.3.4 erläutert statt, mit folgenden Änderungen: Anstatt einem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System wurde die qPCR im LightCycler 480 II durchgeführt (siehe Tabelle 3.5) und mithilfe der LightCycler 480 II Software 1.5.0 SP4 (siehe Tabelle 3.6) ausgewertet. Daher wurde auch die für dieses System kompatible 96-well Platte (Mikrotiterplatte 96 well, weiß) und Abdichtungsfolie (Abdichtungsfolie LightCycler 480 II) verwendet (Tabelle 3.2).

3.4.8 Zellyse zur Proteinextraktion aus Zellen

5×10^5 HEY-Zellen wurden in Zellkulturpetrischalen (100 × 20 mm) ausgesät und für 72 h bei 37 °C im Brutschrank wachsen gelassen (mit Mediumwechsel nach 48 h).

Tabelle 3.20 Zusammensetzung des Lysepuffers.

Reagenz	Konzentration
HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Triton X-100	1 % (v/v)
Natriumdiphosphat Decahydrat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)	10 mM
cComplete, EDTA-freier Proteaseinhibitor-Cocktail	3,6 mg/ml

Danach wurden die Zellen einmal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen, pro Schale wurde 200 µl gekühlter Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.20, Zugabe des Proteaseinhibitors erst kurz vor Verwendung des Puffers) zugegeben und 10 min lang auf Eis inkubiert. Mithilfe eines Zellschabers wurden die adhärenen Zellen von den Schalen abgelöst und mitsamt Lysepuffer in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 30 min lang bei 4 °C invertiert und abschließend für 10 min bei 4 °C und 8000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.9 Proteinbestimmung anhand des Bicinchoninsäure (BCA)-Assays

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Tabelle 3.3) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Die Lysate wurden 1:20 und 1:50 in 1X TBST-Puffer (pH 8,5) verdünnt (siehe Tabelle 3.21) und in Dubletten aufgetragen. Der Assay wurde in einer Mikrotiterplatte (96 well, flacher Boden, klar, siehe Tabelle 3.2) durchgeführt, welche für 2 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert wurde. Abschließend wurde die Extinktion/Absorption bei 570 nm mit dem Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan FC (Tabelle 3.5) gemessen. Die Datenauswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

Tabelle 3.21 Zusammensetzung des 1X TBST-Puffers (pH 8,5).

Reagenz	Konzentration
TRIS	20 mM
NaCl	125 mM
Triton X-100	0,1 % (v/v)
Tween 20	0,05 % (v/v)

3.4.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

Zur Etablierung des NCALD-spezifischen Proteinnachweises wurden mehrere Antikörper getestet und ein Western Blot Protokoll entwickelt.

Für die SDS-PAGE wurde ein 12 %-iges Trenn- und ein 4 %-iges Sammelgel mit 1,5 mm Dicke verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.22). Die Zelllysate (Abschnitt 3.4.8) wurden mit 1X TBST (Tabelle 3.21) und reduzierendem Proteinauftragspuffer (Roti®-Load 1) verdünnt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gelagert. Pro Probe wurden 60 µg Protein auf das Gel geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte 20-25 min bei 80 V und abschließend für 50-55 min bei 150 V (Auflistung aller verwendeten Puffer siehe Tabelle 3.23).

Tabelle 3.22 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels. Angaben stehen für jeweils zwei Gele.

Gel (1,5 mm)	Zusammensetzung
Trenngel (12 %)	8,6 ml H ₂ O
	5,0 ml 1,5 M TRIS (pH 8,8)
	6,0 ml Rotiphorese® Gel 40 (29:1)
	200 µl 10 % (w/v) SDS
	100 µl 10 % (w/v) APS
	10 µl TEMED
Sammelgel (4 %)	6,3 ml H ₂ O
	2,5 ml 0,5 M TRIS (pH 6,8)
	1,0 ml Rotiphorese® Gel 40 (29:1)
	100 µl 10 % (w/v) SDS
	50 µl 10 % (w/v) APS
	10 µl TEMED

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 5 min mit kaltem Transferpuffer gewaschen. Die PVDF-Transfermembran (PVDF Immobilion-P^{SO}, Porengröße 0,2 µm) wurde in Methanol aktiviert, kurz in destilliertem Wasser gewaschen und für 45 min in 4 °C kaltem Transferpuffer äquilibriert. Filterpapiere und Schwämme wurden ebenfalls in kaltem Transferpuffer eingeweicht. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte in einer gekühlten Mini PROTEAN-Kammer bei 100 V für 30 min.

3 Material und Methoden

Tabelle 3.23 Zusammensetzung der in der SDS-PAGE und Western Blot verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Elektrophoresepuffer	25 mM TRIS
	192 mM Glycin
	0,1 % (w/v) SDS
Transferpuffer	25 mM TRIS
	192 mM Glycin
	20 % (v/v) Methanol
TBST-Puffer (pH 7,6)	20 mM TRIS
	150 mM NaCl
	0,1 % (v/v) Tween 20

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran anschließend in 2,5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST für 1 h bei RT geblockt. Danach wurde entweder über Nacht (o/n) bei 4 °C oder für 1 h bei RT mit Primärantikörper in entsprechenden Verdünnungen (siehe Tabelle 3.4 sowie Tabelle 3.24) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer (pH 7,6) für jeweils 10 min wurde die Membran mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert (siehe Tabelle 3.4 sowie Tabelle 3.24).

Tabelle 3.24 Verwendete Antikörper, deren Verdünnungen und Inkubationsbedingungen.

Antikörper	Verdünnung	Verdünnungsmittel (in TBST)	Inkubation
<i>Primärantikörper</i>			
anti-NCALD	1:2000	2,5 % (w/v) Magermilchpulver	o/n 4 °C
anti-GAPDH	1:10 000	1 % (w/v) BSA	1h RT
<i>Sekundärantikörper</i>			
anti-Kaninchen HRP	1:3000	5 % (w/v) Magermilchpulver	1h RT
anti-Maus HRP	1:10 000	1 % (w/v) BSA	1h RT

Danach wurde wieder dreimal für jeweils 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Die chemilumineszenzbasierte Detektion erfolgte entweder mit dem Pierce™ ECL Western Blotting Substrat (bei GAPDH) oder dem SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrat (bei NCALD) entsprechend den Herstellerangaben. Die Western Blots wurden

mit einem Molecular Imager ChemiDoc TM XRS (siehe Tabelle 3.5) aufgenommen und der dazugehörigen Software Image Lab 5.1 (siehe Tabelle 3.6) ausgewertet.

3.4.11 Zellviabilitätsassay

Um den Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzellen unter Chemotherapeutika-Behandlung zu untersuchen, wurden 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays durchgeführt. Das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT wird nur in lebendigen Zellen, nicht aber in toten Zellen, zu dem violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert. Die Menge an Formazan kann nach Zellyse photometrisch bestimmt werden und stellt somit ein Maß für die Zellviabilität dar.^[53] Für diese Arbeiten wurde ein HEY-Zellen-spezifisches MTT-Assay-Protokoll etabliert.

Es wurden 5×10^3 HEY-Zellen (Knockdown-Zellen sowie Kontrolle) pro well in 100 μ l Medium in eine 96-well Zellkulturplatte mit flachem Boden ausgesät. Zusätzlich wurden für jedes Experiment zellfreie Kontrollen angesetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit Cisplatin (1,0 μ g/ml; 1,5 μ g/ml) oder Paclitaxel (5,0 ng/ml; 7,0 ng/ml) behandelt. Für jede Zelllinie wurde eine unbehandelte Kontrolle angesetzt. 2 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Zellaussaat wurden 20 μ l einer 1,2 mg/ml-MTT-Lösung (in PBS, steril filtriert) zu jedem well zugegeben und die Platte wurde für 2,5 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden pro well 90 μ l Medium entfernt. Die Formazan-Kristalle wurden in 100 μ l DMSO unter 10-minütigem Schütteln gelöst und die optische Dichte wurde mithilfe eines Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 596 nm bestimmt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mithilfe der zellfreien Kontrollen normiert. Jede Zelllinie wurde als Prozentsatz der überlebenden Zellen im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle dargestellt.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software IBM SPSS Statistics Version 24.0 (Tabelle 3.6). Eine optimale Unterscheidung zwischen hoher und niedriger

NCALD mRNA-Expression wurde mittels Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analysen ermittelt. Der Pearson Korrelationskoeffizient (r) wurde verwendet, um *NCALD* mRNA-Expressionen, welche anhand von Mikroarrays bzw. qPCR-Analysen erhalten wurden, auf Korrelation zu untersuchen. Die Assoziation zwischen kategorialen klinischen Parametern und dichotomer *NCALD* Expression wurde durch exakte Fisher-Tests und χ^2 -Tests bestimmt. Überlebenskurven für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben (*overall survival*, OS bzw. *recurrence free survival*, RFS) wurden mittels Kaplan-Meier-Schätzer erstellt und durch den Log-Rank-Test miteinander verglichen. Die multivariable Cox-Regression wurde verwendet, um einen möglichen prognostischen Einfluss verschiedener Parameter zu bewerten. Mithilfe des Student's t-Test wurden quantitative Datensätze zwischen zwei unabhängigen Subgruppen des Zellviabilitätsassays überprüft.

P-Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet und in Abbildungen gegebenenfalls mit einem Asterisk gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 *NCALD* mRNA-Expression in humanen Ovarialkarzinomgeweben

4.1.1 Validierung der vorangegangenen *NCALD* Genexpressionsanalysen

In der Arbeitsgruppe „Gynäkologische Tumorgenetik“ des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München wurden, unter der Projektleitung von Dr. Juliane Ramser und Prof. Alfons Meindl, bereits erste Untersuchungen zur *NCALD* Genexpression anhand von Microarrays (Human Ref-8 expression BeadChip arrays; Illumina, San Diego, USA) an fortgeschrittenen (FIGO III + IV), optimal operierten (Tumorrest < 1cm) Ovarialkarzinomen durchgeführt. Diese Analysen zeigten, dass *NCALD* in Patienten mit „langem Überleben“ (Gesamtüberleben \geq 36 Monate, rezidivfreies Überleben \geq 36 Monate; n = 31) annähernd 1,5-fach höher exprimiert wurde als zu Patienten mit „kurzem Überleben“ (Gesamtüberleben \geq 24 Monate, rezidivfreies Überleben \geq 24 Monate; n = 25).^[43]

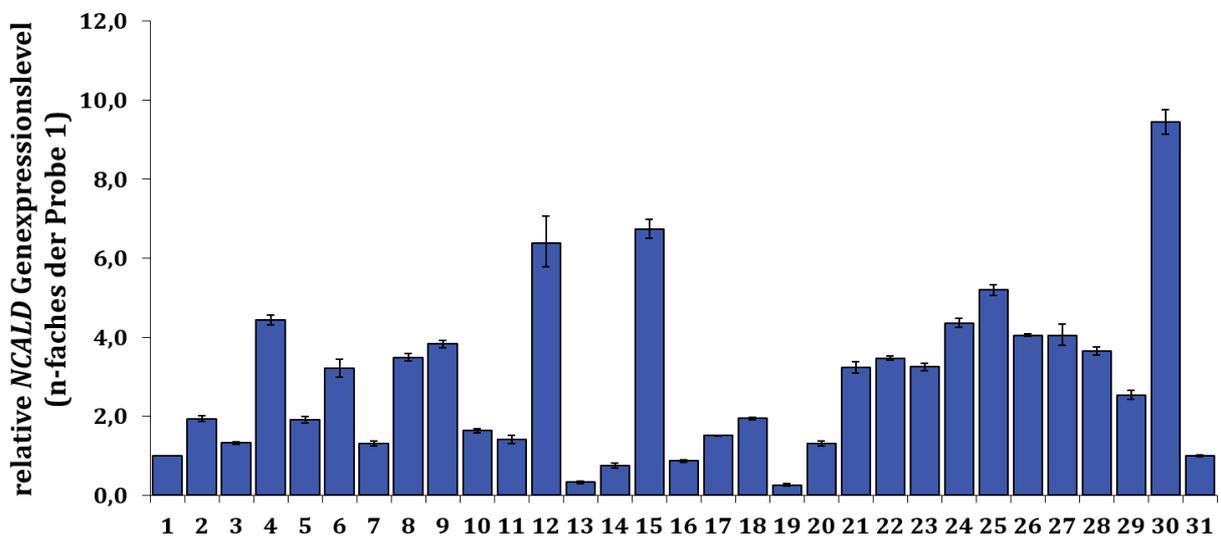


Abbildung 4.1 Darstellung der durch quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) erhaltenen, relativen *NCALD* mRNA-Expressionslevel von 31 Ovarialkarzinomgewebeproben. Die *NCALD* Genexpressionen wurden mithilfe der endogenen Kontrolle *ALAS1* normalisiert und als Vielfaches der Probe 1 dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

Für die zuvor beschriebene Microarray-basierte Genexpressionsanalyse wurden größere Mengen mRNA benötigt, sodass diese durch lineare Amplifikation vervielfältigt

wurde. Die Amplifikation der mRNA kann jedoch unter Umständen zu einer Verzerrung der Genexpression führen, sodass bestimmte RNAs möglicherweise über- oder unterrepräsentiert vorliegen.^[54] Daher wurden diese auf Microarray-Daten basierenden Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nun anhand einer weiteren, unabhängigen Methode an einem repräsentativen Teilkollektiv (FIGO III + IV, optimal operierter Tumorrest < 1cm, platinhaltige Chemotherapie) validiert. Hierfür wurde die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) gewählt, da für diese Analyse die RNA direkt in cDNA umgeschrieben wurde und nicht zuvor amplifiziert werden musste. Die *NCALD* Genexpression des repräsentativen Teilkollektivs, bestehend aus 31 humanen Ovarialkarzinomproben, ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Es wurde deutlich, dass die *NCALD* mRNA-Expression je nach Ovarialkarzinomprobe unterschiedlich stark ausgeprägt war (Abbildung 4.1). Probe 19 zeigte dabei die niedrigste relative *NCALD* Expression (0,25-fache Expression der Probe 1), wohin gegen Probe 30 die höchste relative *NCALD* Expression aufwies (9,45-fache Expression der Probe 1). Der Mittelwert der relativen Genexpressionslevel des Teilkollektivs lag bei 2,90; der Median bei 2,54.

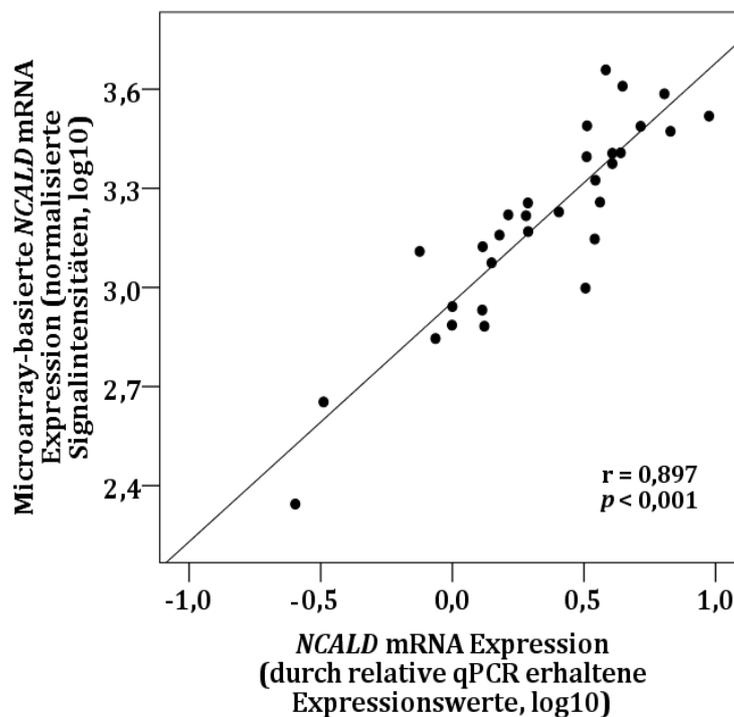


Abbildung 4.2 Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen den Microarray-basierten *NCALD* Genexpressionsdaten und den entsprechenden auf qPCR-basierenden *NCALD* mRNA-Daten in Ovarialkarzinomproben (n = 31). Pearson Korrelationskoeffizient $r = 0,897$, $p < 0,001$.

Zur Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen Microarray-Daten und den durch qPCR erhaltenen *NCALD* Expressionsdaten darzustellen (Abbildung 4.2). Insgesamt wurden die *NCALD* mRNA-Expressionen von 31 Ovarialkarzinomproben verglichen. Es zeigte sich eine stark positive Korrelation ($r = 0,897$) zwischen den durch qPCR erhaltenen Daten und den auf Microarray basierenden Daten. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p < 0,001$), sodass die zuvor analysierten Microarray-Daten mittels qPCR-Daten in diesem Kollektiv bestätigt werden konnte.

4.1.2 Assoziation der *NCALD* Genexpression mit dem Patientenüberleben

Um die mittels qPCR erhaltenen *NCALD* Genexpressionsdaten (Abschnitt 4.1.1) mit dem Patientenüberleben assoziieren zu können, wurden die Genexpressionsdaten des Teilkollektivs ($n = 31$) zunächst in niedrige und hohe *NCALD* mRNA-Expression unterteilt. Der optimale Cut-off-Wert der Genexpressionsdaten wurde dabei mithilfe der Receiver Operating Characteristic (ROC-)-Analysen und dem Youden-Index^[55] als 2,24 ermittelt.

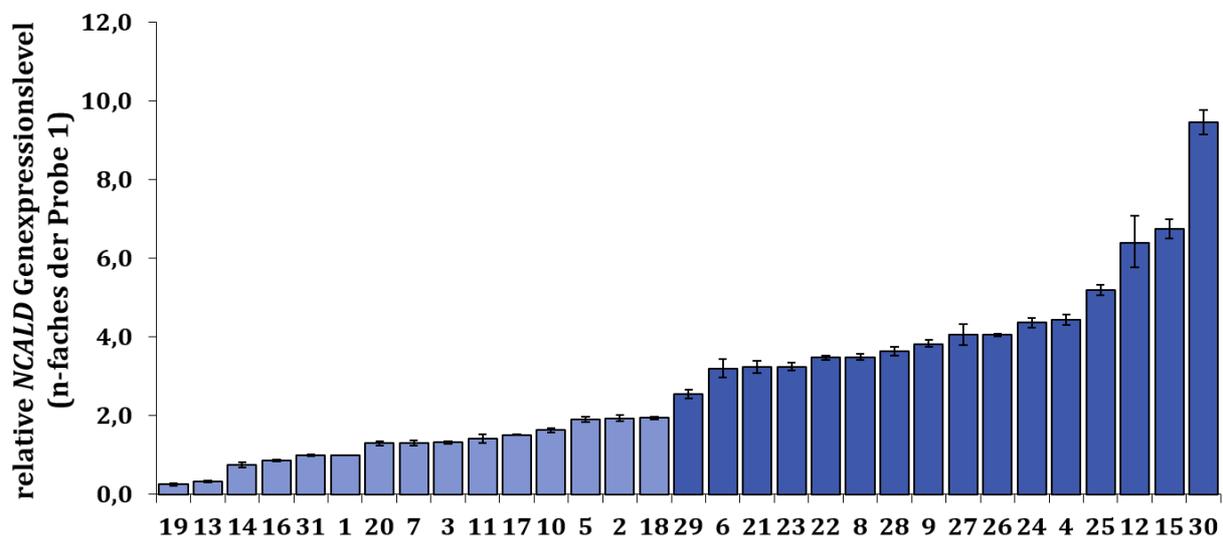


Abbildung 4.3 Darstellung der durch qPCR erhaltenen, relativen *NCALD* mRNA-Expressionslevel von 31 Ovarialkarzinomgewebsproben, sortiert nach ihrer Expressionsstärke von niedrig zu hoch. In Abhängigkeit des Cut-off-Werts von 2,24 zeigten 15 Proben eine niedrige (hellblaue Balken, Probe 19 – 18) und 16 Proben eine hohe Expression (dunkelblaue Balken, Probe 29 – 30). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

Abbildung 4.3 zeigt die mittels qPCR analysierten 31 Ovarialkarzinomgewebsproben des Teilkollektivs (Abschnitt 4.1.1), sortiert nach ihrer *NCALD* Genexpressionsstärke. Insgesamt lagen 15 Proben ($\cong 48,4\%$, hellblaue Balken in Abbildung 4.3) unterhalb des Cut-off-Wertes von 2,24 und wiesen daher eine niedrige *NCALD* Expression auf; 16 Proben ($\cong 51,6\%$, dunkelblaue Balken in Abbildung 4.3) zeigten eine hohe *NCALD* Genexpression.

Nachdem eine niedrige und hohe *NCALD* Genexpression unterschieden wurde, wurden die Genexpressionsdaten nun mit dem Patientenüberleben assoziiert. Das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) wurde vom Zeitpunkt der ersten tumorreduzierenden Operation bis zum Todesdatum oder letzten Follow-up-Datum in Monaten gemessen. Für das rezidivfreie Überleben (*recurrence free survival*, RFS) wurde der Zeitraum zwischen der tumorreduzierenden Operation und der Progression der Krankheit gewählt. Auch das rezidivfreie Überleben wurde in Monaten angegeben. Mithilfe des Kaplan-Meier-Schätzers wurden Überlebenskurven für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben erstellt und durch den Log-Rank-Test miteinander verglichen.^[56]

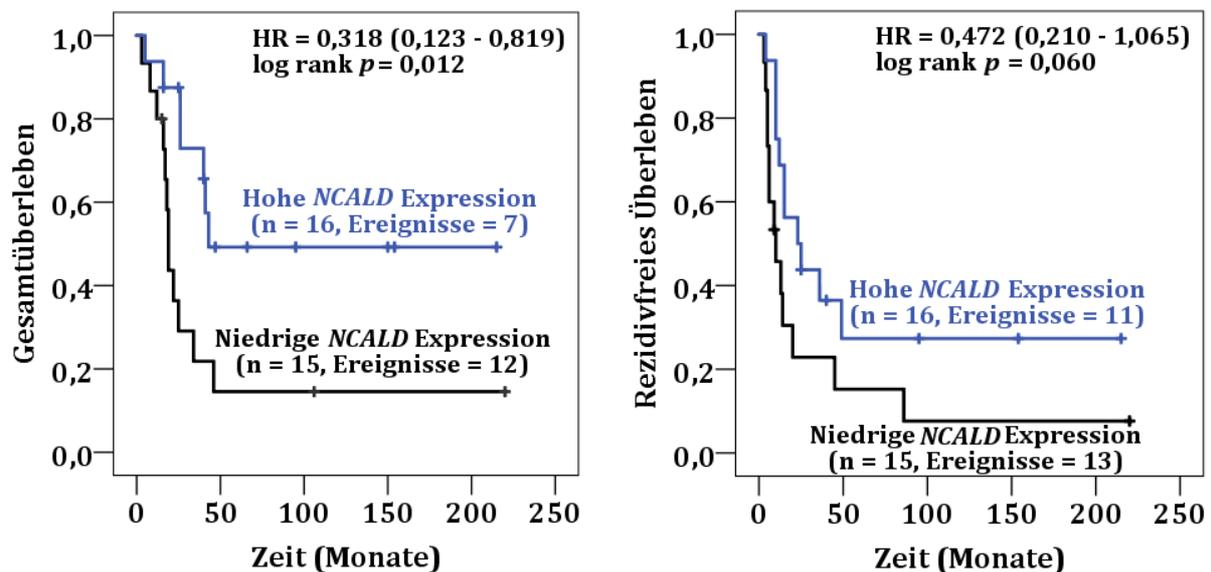


Abbildung 4.4 Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Anhängigkeit des Cut-off-Wertes 2,24 für das kumulative Gesamtüberleben (links) und das kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) des durch qPCR analysierten Teilkollektivs ($n = 31$). HR: Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI).

In Abbildung 4.4 sind die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das kumulative Gesamtüberleben (links) und kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) dargestellt. Es

wurde deutlich, dass eine hohe *NCALD* Expression sowohl beim Gesamtüberleben als auch beim rezidivfreien Überleben mit längerem Patientenüberleben assoziiert war. Diese Assoziation war beim Gesamtüberleben mit $p = 0,012$ signifikant, beim rezidivfreiem Überleben ($p = 0,060$) wurde die Signifikanzschwelle von $p = 0,050$ nicht erreicht. Dabei erhöhte sich das mediane Gesamtüberleben von 19 Monaten (niedrige *NCALD* Expression) auf 43 Monate (hohe *NCALD* Expression). Das mediane rezidivfreie Überleben konnte um 13 Monate verlängert werden (niedrige *NCALD* Expression: 10 Monate; hohe *NCALD* Expression: 23 Monate). Vergleicht man niedrige mit hoher *NCALD* Expression, konnte folglich ebenfalls eine Reduktion der Hazard Ratio (HR) festgestellt werden (OS: HR = 0,318; 95 % CI 0,123 – 0,819; RFS: HR = 0,472; 95 % CI 0,210 – 1,065).

4.1.3 Analyse von unabhängigen *NCALD* mRNA-Microarray Datensätzen

Die Kaplan-Meier-Analysen des Ovarialkarzinomteilkollektivs ($n = 31$) zeigten, dass eine hohe *NCALD* Genexpression mit einem längeren Überleben assoziiert war (siehe Abschnitt 4.1.2). Um diesen Zusammenhang nun in einem größeren Ovarialkarzinomkollektiv validieren zu können, wurden unabhängige, öffentlich zugängliche Affymetrix-Microarray-Datensätze (Probe_ID 211685_s_at) des online „Biomarker-Assessment Tools“ *KM-Plotter* (<http://kmplot.com/analysis/>) verwendet (siehe Abschnitt 3.3.7).^[48]

Entsprechend den qPCR- und Microarray-Analysen (Abschnitt 4.1.1 – 4.1.2) wurden für die durch den *KM-Plotter* bereitgestellte Online-Ovarialkarzinomdaten nur Datensätze mit FIGO Status III + IV, optimaler Tumorreduktionsoperation und platinhaltiger Chemotherapie verwendet. Der Follow-up-Zeitraum wurde auf 5 Jahre festgelegt. „Ausreißer“-Microarray-Datensätze wurden von den Analysen ausgeschlossen (Auswahl im *KM-Plotter*: *exclude outlier arrays*). Das resultierende Kollektiv zur Assoziation der *NCALD* Genexpression mit dem kumulativen Gesamtüberleben enthielt 547 Ovarialkarzinomproben; bei dem kumulativen rezidivfreien Überleben umfasste das Kollektiv 467 Patientenproben. Der Cut-off-Wert zur Unterscheidung zwischen niedriger und hoher *NCALD* Expression wurde vom *KM-Plotter* automatisch festgelegt (Auswahl im *KM-Plotter*: *auto select best cutoff*).^[48]

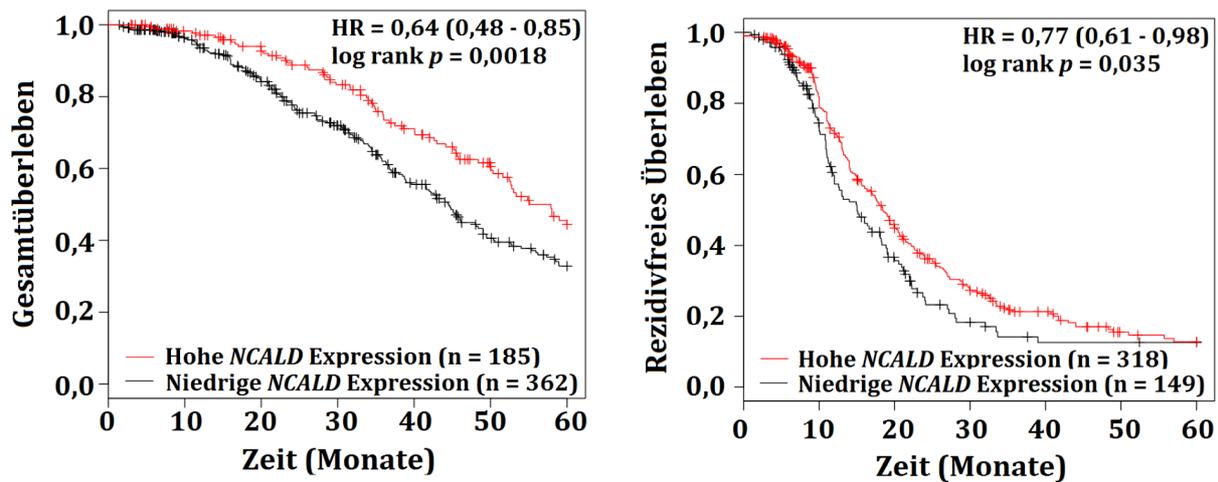


Abbildung 4.5 NCALD-abhängige Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das kumulative Gesamtüberleben (links) und das kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) basierend auf Microarray-Datensätzen von Ovarialkarzinomkollektiven (OS: $n = 547$, RFS: $n = 467$), erstellt mithilfe des Biomarker-Assessment Tools *KM-Plotter*, Stand: 16.05.2018.^[48] HR: Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI).

Die so erhaltenen Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigten ebenfalls, dass eine hohe *NCALD* mRNA-Expression mit längerem Patientenüberleben assoziiert war (Abbildung 4.5, Stand: 16.05.2018). Dieses Ergebnis war sowohl für das Gesamt- als auch für das rezidivfreie Überleben signifikant (OS: $p = 0,0018$, RFS: $p = 0,035$). Folglich konnte auch eine Verminderung der Hazard Ratios festgestellt werden (OS: HR = 0,64; 95 % CI 0,48 – 0,85; RFS: HR = 0,77; 95 % CI 0,61 – 0,98). Das mediane Gesamtüberleben konnte dabei von 44,53 Monaten (niedrige *NCALD* Expression) auf 55,07 Monate (hohe *NCALD* Expression) erhöht werden. Im Falle des rezidivfreien Überlebens verlängerte sich das mediane Überleben um 3,43 Monate (niedrige *NCALD* Expression: 15 Monate; hohe *NCALD* Expression: 18,43 Monate). Demnach konnten die zuvor erhobenen Daten auch in diesem größeren Kollektiv bestätigt werden.

4.2 NCALD Proteinexpression in humanen Ovarialkarzinomgeweben

4.2.1 Immunhistochemische Detektion der NCALD Proteinexpression

Durch Microarray- und qPCR-Analysen konnte bereits eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen *NCALD* mRNA-Expression und längerem Patientenüberleben gezeigt werden (Abschnitt 4.1.1 – 4.1.3). Allerdings ist für eine vollständige

Charakterisierung *NCALDs* neben der Analyse auf Transkriptionsebene auch die Ermittlung der Proteinexpression notwendig. Daher wurde in einem nächsten Schritt die *NCALD* Proteinexpression in 102 auswertbaren Tumorproben mittels immunhistochemischen Färbungen untersucht. Die klinischen Charakteristika des hierfür verwendeten Patientenkollektivs sind in Abschnitt 3.2, Tabelle 3.7 aufgelistet. Als technische Kontrolle und um unterschiedliche *NCALD*-Färbungen miteinander vergleichen zu können wurde neben Ovarialkarzinom Tissue Microarrays (TMAs) auch Nieren-Normalgewebe *NCALD*-spezifisch gefärbt. Die Ovarialkarzinom-TMAs enthielten als zusätzliche interne technische Kontrollen noch weitere Normalgewebeproben (unter anderem Tonsille, Leber, Lunge).

Tabelle 4.1 Ergebnis der immunhistochemischen *NCALD*-Analysen in 102 Ovarialkarzinomen.

	Primäre Ovarialkarzinome (n = 102)		
		(n)	(%)
Färbeintensität (FI)	0	4	3.9
	1	62	60.8
	2	29	28.4
	3	7	6.9
Immunreaktivität gegen <i>NCALD</i>	positiv (FI 1 – 3)	98	96.1
	negativ (FI 0)	4	3.9
Prozent positive Zellen (PP)	0 %	4	3.9
	< 10%	5	4.9
	10 – 15 %	15	14.7
	51 – 80 %	12	11.8
	> 80 %	66	64.7
<i>NCALD</i> -IHC-Score (FI × PP)	niedrige Expression (0 – 4)	68	66.7
	hohe Expression (6 – 12)	34	33.3
Stroma-Färbung	positiv	25	24.5
	negativ	75	73.5
	uneindeutig	2	2.0

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen *NCALD*-Detektion aufgelistet. Spezifische Immunreaktivität gegen *NCALD* wurde im Cytoplasma der Ovarialkarzinomzellen festgestellt. Zusätzlich wurde in 24,5 % aller Gewebeproben (n = 25) auch eine spezifische, von einer Pathologin bestätigte, *NCALD*-Färbung des Stromas detektiert. Eine *NCALD* Proteinexpression konnte dagegen nicht im Nukleus der

Tumorzellen nachgewiesen werden. Die cytoplasmatische NCALD Expression der Tumorzellen wurde mithilfe eines semi-quantitativen Scores (0 – 12) erfasst, welcher sowohl die Färbeintensität (SI, 0 – 3) als auch den Prozentsatz positiv gefärbter Zellen (PP, 0 – 4) berücksichtigte (wie bereits in Material und Methoden, Abschnitt 3.3.6 beschrieben). 96,1 % der untersuchten Tumorgewebe (n = 98) wiesen eine NCALD-spezifische Färbung auf; 3,9 % Ovarialkarzinome (n = 4) zeigten keine Immunreaktivität gegen NCALD. Auf Grundlage des semi-quantitativen NCALD-IHC-Scores zeichneten sich 66,7 % der Tumorproben (n = 68) durch eine niedrige NCALD Proteinexpression aus; dies umschloss Score 0 – 4 (darunter auch die vier negativen Tumorproben). 33,3 % der Ovarialkarzinome (n = 34) wiesen gemäß des NCALD-IHC-Scores eine hohe NCALD Proteinexpression auf (definiert als Score 6 – 12). Repräsentative Aufnahmen für negative, niedrige und hohe NCALD Expression sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

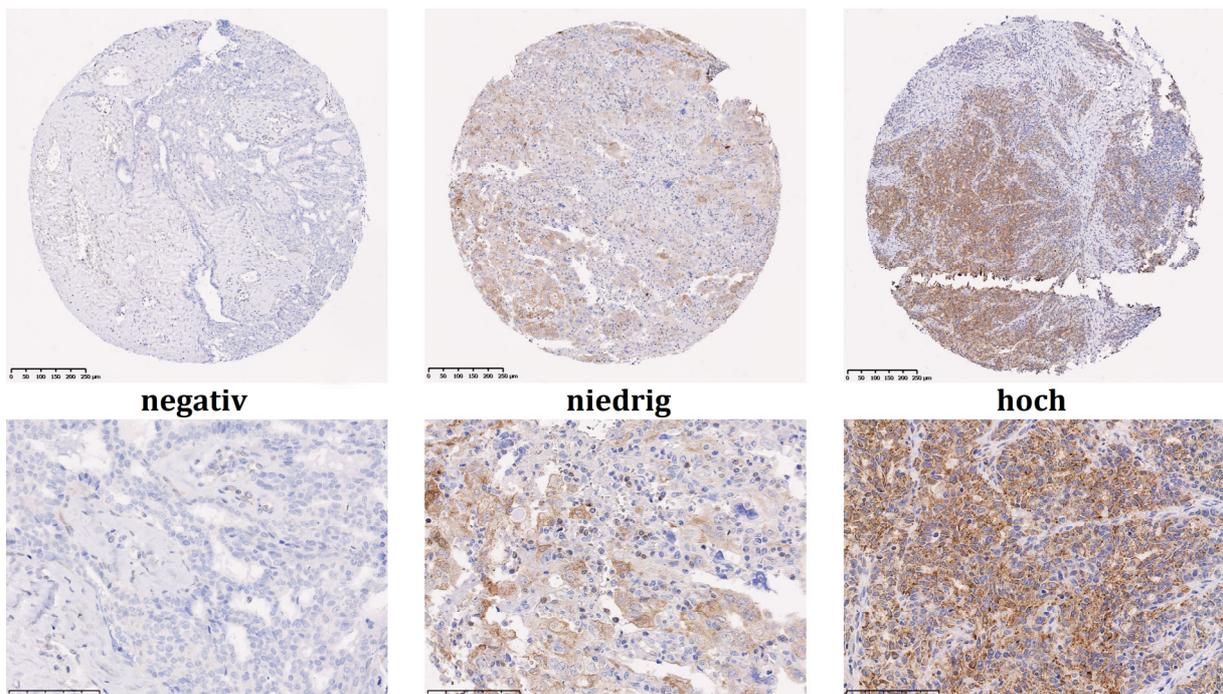


Abbildung 4.6 Immunhistochemische Detektion der NCALD Expression in Ovarialkarzinom Tissue Microarrays. Die Immunreaktivität gegen NCALD wurde anhand eines semi-quantitativen NCALD-IHC-Scores (0 – 12) bewertet, welcher sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl gefärbter Tumorzellen berücksichtigte. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen für negative (Score 0, linke Abbildungen), niedrige (Score 0 – 4, mittlere Abbildungen) und hohe (Score 6 – 12, rechte Abbildungen) cytoplasmatische NCALD Proteinexpression. Die oberen Abbildungen wurden bei einer Vergrößerung von 160 X (Balken: 250 µm) aufgenommen; die unteren Abbildungen stellen Ausschnitte der korrespondierenden oberen Abbildung bei einer Vergrößerung von 700 X (Balken: 100 µm) dar.

4.2.2 Assoziation der NCALD Proteinexpression mit klinischen Parametern

Anhand des NCALD-IHC-Scores konnte die NCALD Proteinexpression der Tumorzellen in zwei Gruppen eingeteilt werden: Niedrige Expression (NCALD-IHC-Scores 0 – 4, umschließt auch keine Expression) und hohe Expression (NCALD-IHC-Scores 6 – 12).

Tabelle 4.2 Assoziation zwischen niedriger und hoher NCALD Proteinexpression und verschiedenen klinischen Parametern, berechnet anhand des exakten Fisher-Tests, bzw. χ^2 -Tests. Statistische Signifikanz wurde als $p < 0,050$ definiert. FIGO: *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*.

	NCALD		<i>p</i>
	Niedrige Expression	Hohe Expression	
Alle Karzinome (n = 102)	68 (66,7 %)	34 (33,3 %)	
Alter bei Operation			0,261
< 60 Jahre	34 (50,0 %)	21 (61,8 %)	
≥ 60 Jahre	34 (50,0 %)	13 (38,2 %)	
Postoperativer Tumorrest			0,368
0 cm	26 (38,2 %)	18 (52,9 %)	
> 0 und < 1 cm	16 (23,5 %)	6 (17,6 %)	
≥ 1 cm	26 (38,2 %)	10 (29,4 %)	
FIGO Status			0,214
III	46 (67,6 %)	27 (79,4 %)	
IV	22 (32,4 %)	7 (20,6 %)	
Nodalstatus			0,573
N0	19 (27,9 %)	10 (29,4 %)	
N1	33 (48,5 %)	19 (55,9 %)	
Nx	16 (23,5 %)	5 (14,7 %)	
Aszitesvolumen			0,311
< 500 ml	37 (56,1 %)	22 (66,7 %)	
≥ 500 ml	29 (43,9 %)	11 (33,3 %)	
Histologischer Typ			0,241
serös	55 (80,9 %)	24 (70,6 %)	
nicht serös	13 (19,1 %)	10 (29,4 %)	
Histologisches Grading			0,754
Low	7 (11,9 %)	3 (9,7 %)	
High	52 (88,1 %)	28 (90,3 %)	
Adjuvante Chemotherapie			0,423
Platin	30 (44,1 %)	20 (58,8 %)	
Platin-Taxol	32 (47,1 %)	13 (38,2 %)	
andere	6 (5,9 %)	1 (2,9 %)	
keine	2 (2,9 %)	0 (0,0 %)	

Anschließend wurde ermittelt, ob eine Assoziation zwischen der NCALD Proteinexpression und für das Ovarialkarzinom relevanten klinischen Parametern besteht. Hierfür wurde das Alter der Patientinnen bei der tumorreduzierenden Operation, der postoperative Tumorrest, FIGO Status, Nodalstatus, Aszitesvolumen, der histologische Typ sowie das Grading und die Art der adjuvanten Chemotherapie genauer untersucht (siehe Tabelle 4.2). Die Analysen zeigten, dass keine signifikante Assoziation zwischen der NCALD Proteinexpression und den unterschiedlichen klinischen Parametern bestand.

4.2.3 Assoziation der NCALD Expression mit dem Patientenüberleben

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe *NCALD* mRNA-Expression signifikant mit einem längeren Patientenüberleben assoziiert war (siehe Abschnitt 4.1.2 und 4.1.3). Nun wurde untersucht, ob auch ein Zusammenhang zwischen der NCALD Expression und dem Patientenüberleben auf Proteinebene besteht. Dabei wurde das Gesamt- und rezidivfreie Überleben wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben definiert. Die Überlebenskurven für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben wurden mithilfe des Kaplan-Meier-Schätzers erstellt und durch den Log-Rank-Test miteinander verglichen.^[56]

In Abbildung 4.7 sind die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das kumulative Gesamtüberleben (links) sowie das kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) abgebildet. Es zeigte sich, dass auch auf Proteinebene eine niedrige NCALD Expression beim Gesamtüberleben wie auch beim rezidivfreien Überleben mit einem verkürzten Patientenüberleben assoziiert war. Dabei war diese Assoziation sowohl beim Gesamt- als auch beim rezidivfreien Überleben signifikant (Gesamtüberleben: $p = 0,002$; rezidivfreies Überleben: $p = 0,002$). Im Median erreichten die Patientinnen mit hoher NCALD Expression ein Gesamtüberleben von 92 Monaten; bei niedriger NCALD Expression betrug das mediane Gesamtüberleben nur 36 Monate. Somit ergibt sich, abhängig von der NCALD Expression, eine Differenz des medianen Überlebens von 56 Monaten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch beim rezidivfreien Überleben erzielt. Dort betrug das mediane Überleben der Patientinnen mit niedriger NCALD Expression

18 Monate; Patientinnen mit hoher NCALD Proteinexpression zeigten ein rezidivfreies Überleben von 39 Monate, was eine Differenz des medianen rezidivfreien Überlebens von 21 Monate darstellte.

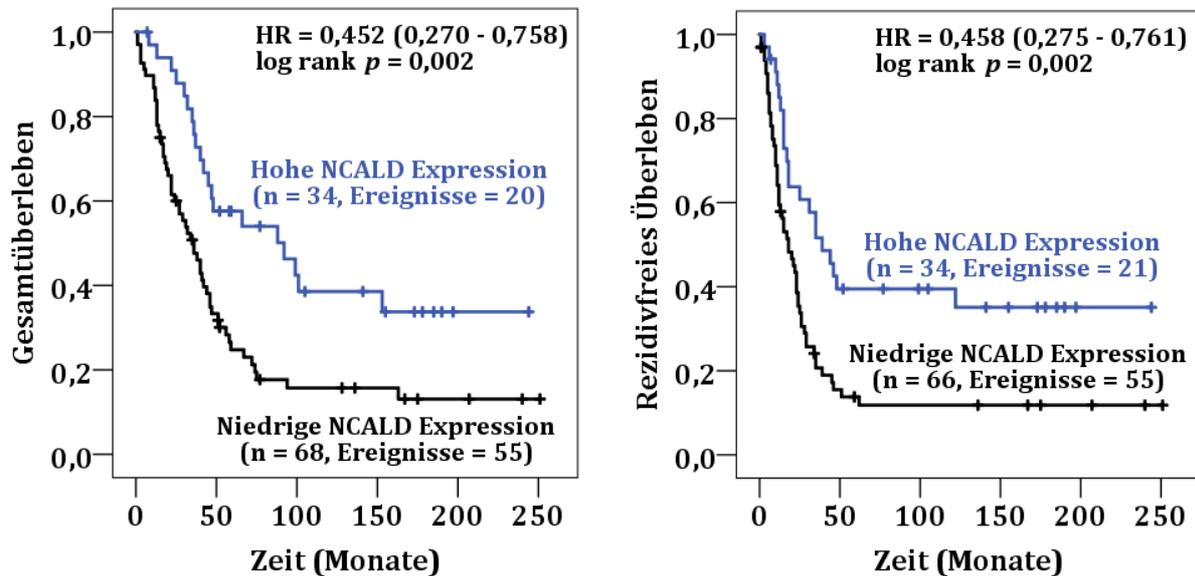


Abbildung 4.7 Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Anhängigkeit der NCALD Proteinexpression für das kumulative Gesamtüberleben (links) und das kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) des mittels immunhistochemische Analysen untersuchten Ovarialkarzinomkollektivs (n = 102). HR: Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI).

Dementsprechend konnte sowohl beim Gesamtüberleben (HR = 0,452; 95 % CI 0,270 – 0,758) als auch beim rezidivfreien Überleben (HR = 0,458; 95 % CI 0,275 – 0,761) eine NCALD-abhängige Verminderung der Hazard Ratio festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine hohe NCALD Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mit einer Verlängerung des Patientenüberlebens assoziiert war.

4.2.4 NCALD Expression im Vergleich zu klinischen Parametern

Nachdem ermittelt wurde, dass die NCALD-Expression mit dem Patientenleben assoziiert war, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss einzelner, für das Ovarialkarzinom relevanter, klinischer Parameter auf die Überlebenszeit im untersuchten Kollektiv bestimmt.

Tabelle 4.3 Auswirkung der klinischen Parameter und der NCALD Expression der Ovarialkarzinomzellen auf das Gesamtüberleben (OS), analysiert mittels uni- und multivariater Cox-Regressionsanalysen. (n=102). Der Einfluss galt als statistisch signifikant bei $p < 0,050$ (mit Asterisk markiert). FIGO: *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*.

Variable	n	Univariable Analyse OS		Multivariable Analyse OS	
		HR (95 % CI)	p	HR (95 % CI)	p
NCALD Expression			0,003 *		0,008 *
niedrig	68	1,00		1,00	
hoch	34	0,45 (0,27 – 0,76)		0,48 (0,28 – 0,82)	
Postop. Tumorrest			< 0,001 *		0,030 *
0 cm	44	1,00		1,00	
> 0 cm und < 1 cm	22	2,37 (1,26 – 4,47)		1,86 (0,86 – 4,01)	
≥ 1 cm	36	4,01 (2,34 – 6,89)		2,63 (1,29 – 5,39)	
FIGO Status			0,006 *		0,193
III	73	1,00		1,00	
IV	29	1,98 (1,21 – 3,23)		1,42 (0,84 – 2,40)	
Nodalstatus			0,010 *		0,776
N0	29	1,00		1,00	
N1	52	1,47 (0,84 – 2,56)		1,20 (0,65 – 2,21)	
Nx	21	2,74 (1,42 – 5,30)		1,31 (0,61 – 2,83)	
Alter			0,085		
< 60 Jahre	55	1,00			
≥ 60 Jahre	47	1,49 (0,95 – 2,36)			
Aszitesvolumen			< 0,001 *		0,268
< 500 ml	59	1,00		1,00	
≥ 500 ml	40	2,80 (1,73 – 4,51)		1,40 (0,77 – 2,52)	
Histologisches Grading			0,231		
Low	10	1,00			
High	80	1,68 (0,72 – 3,94)			

Analysiert wurden der postoperative Tumorrest (0 cm versus > 0 cm und < 1 cm; 0 cm versus ≥ 1 cm), der Nodalstatus (N0 versus N1; N0 versus Nx), der FIGO Status (III versus

4 Ergebnisse

IV), das Alter (< 60 Jahre versus ≥ 60 Jahre), das Aszitesvolumen (< 500 ml versus ≥ 500 ml) und das histologische Grading (low versus high) mittels univariabler Cox-Regressionsanalyse. Dabei wurde eine signifikante Assoziation zwischen dem Gesamtüberleben und dem postoperativen Tumorrest ($p < 0,001$), FIGO Status ($p = 0,006$), Nodalstatus ($p = 0,010$) und Aszitesvolumen ($p < 0,001$) festgestellt (siehe Tabelle 4.3, univariable Analyse).

Tabelle 4.4 Auswirkung der klinischen Parameter und der NCALD Expression der Ovarialkarzinomzellen auf das rezidivfreie Überleben (RFS), analysiert mittels uni- und multivariater Cox-Regressionsanalysen. (n=100). Der Einfluss galt als statistisch signifikant bei $p < 0,050$ (mit Asterisk markiert). FIGO: *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*.

Variable	n	Univariable Analyse RFS		Multivariable Analyse RFS	
		HR (95 % CI)	p	HR (95 % CI)	p
NCALD Expression			0,003 *		0,014 *
niedrig	66	1,00		1,00	
hoch	34	0,46 (0,28 – 0,76)		0,51 (0,30 – 0,87)	
Postop. Tumorrest			< 0,001 *		0,090
0 cm	42	1,00		1,00	
> 0 cm und < 1 cm	22	2,56 (1,41 – 4,67)		2,04 (1,00 – 4,16)	
≥ 1 cm	36	2,77 (1,63 – 4,72)		1,94 (1,01 – 3,74)	
FIGO Status			0,031 *		0,237
III	71	1,00		1,00	
IV	29	1,73 (1,05 – 2,85)		1,39 (0,81 – 2,40)	
Nodalstatus			0,006 *		0,568
N0	28	1,00		1,00	
N1	52	1,08 (0,63 – 1,85)		0,89 (0,49 – 1,61)	
Nx	20	2,53 (1,33 – 4,81)		1,24 (0,58 – 2,67)	
Alter			0,185		
< 60 Jahre	55	1,00			
≥ 60 Jahre	45	1,36 (0,86 – 2,15)			
Aszitesvolumen			0,001 *		0,332
< 500 ml	58	1,00		1,00	
≥ 500 ml	39	2,27 (1,40 – 3,36)		1,34 (0,74 – 2,41)	
Histologisches Grading			0,316		
Low	9	1,00			
High	80	1,60 (0,64 – 3,99)			

Für das rezidivfreie Überleben wurde ebenfalls eine signifikante Assoziation mit dem postoperativen Tumorrest ($p < 0,001$), FIGO Status ($p = 0,031$), Nodalstatus ($p = 0,006$) und Aszitesvolumen ($p < 0,001$) ermittelt (siehe Tabelle 4.4, univariable Analyse). Das

Alter (OS: $p = 0,085$; RFS: $p = 0,185$) sowie das histologische Grading (OS: $p = 0,231$; RFS: $p = 0,316$) waren weder mit dem Gesamt- noch dem rezidivfreien Überleben signifikant assoziiert.

Anschließend wurden multivariable Cox-Regressionsanalysen durchgeführt, in die neben der NCALD Expression auch die klinischen Parameter eingingen, welche bereits in den univariablen Cox-Regressionsanalysen eine signifikante Assoziation mit der Überlebenszeit zeigten (postoperativer Tumorrest, FIGO Status, Nodalstatus und Aszitesvolumen). In dieser Analyse setzten sich die NCALD-Expression ($p = 0,008$) sowie der postoperative Tumorrest ($p = 0,030$) als signifikante Faktoren für das Gesamtüberleben durch (siehe Tabelle 4.3, multivariable Analyse). Beim rezidivfreien Überleben war die NCALD-Expression ($p = 0,014$) der einzige signifikante Faktor (siehe Tabelle 4.4, multivariable Analyse). Dementsprechend konnte ebenfalls eine Reduktion der Hazard Ratios beim Gesamtüberleben (HR = 0,48; 95 % CI 0,28 – 0,82) sowie beim rezidivfreien Überleben (HR = 0,51; 95 % CI 0,30 – 0,87) festgestellt werden. FIGO Status, Nodalstatus und Aszitesvolumen waren sowohl mit dem Gesamt- als auch mit dem rezidivfreien Überleben nicht signifikant assoziiert.

Somit zeigten diese Analysen, dass sich die NCALD-Expression sowohl in uni- als auch in multivariablen Analysen als signifikanter Faktor gegen für das Ovarialkarzinom relevante, klinische Faktoren durchgesetzt hatte.

4.2.5 Assoziation der NCALD Stromaexpression mit klinischen Parametern

Neben der cytoplasmatischen NCALD Proteinexpression in den Ovarialkarzinomzellen wurde zusätzlich in 24,5 % aller Tumorgewebsproben ($n = 25$) auch eine spezifische, von einer Pathologin (Dr. Kristina Schwamborn, Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) bestätigte, NCALD-Färbung des Stromas detektiert (siehe Abschnitt 4.2.1). Repräsentative Aufnahmen für negative und positive NCALD Expression im Stroma sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

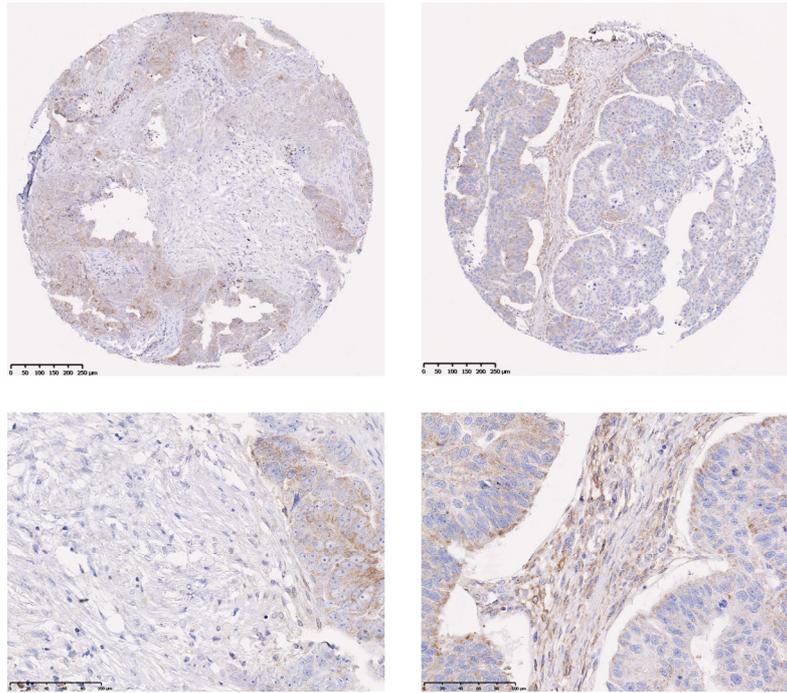


Abbildung 4.8 Immunhistochemische Detektion der NCALD Expression in Ovarialkarzinom Tissue Microarrays. Dargestellt sind Abbildungen für negative (linke Abbildungen) und positive (rechte Abbildungen) NCALD Expression im Stroma. Die oberen Abbildungen wurden bei einer Vergrößerung von 160 X (Balken: 250 µm) aufgenommen; die unteren Abbildungen stellen Ausschnitte der korrespondierenden oberen Abbildung bei einer Vergrößerung von 700 X (Balken: 100 µm) dar. Beide Abbildungen (negative sowie positive Stromaexpression) zeigen ebenfalls eine niedrige NCALD Expression (NCALD-IHC-Score 4) im Cytoplasma der Tumorzellen (siehe Abschnitt 4.2.1).

Es wurde daraufhin untersucht, ob eine Assoziation zwischen der NCALD Proteinexpression im Stroma und für das Ovarialkarzinom relevanten klinischen Parametern besteht. Hierfür wurden folgende Parameter verwendet (siehe auch Abschnitt 4.2.2): das Alter der Patientinnen bei der tumorreduzierenden Operation, der postoperative Tumorrest, der FIGO Status, der Nodalstatus, das Aszitesvolumen, der histologische Typ sowie das Grading und die Art der adjuvanten Chemotherapie (siehe Tabelle 4.5). Zusätzlich wurde ebenfalls ermittelt, ob eine signifikante Assoziation zwischen der NCALD Expression in Tumorzellen und der NCALD Stromaexpression bestand. Die Analysen zeigten, dass keine signifikante Assoziation zwischen der NCALD Proteinexpression und den unterschiedlichen klinischen Parametern bestand. Auch zwischen der NCALD Expression im Stroma und der NCALD Expression in den Tumorzellen konnte kein signifikanter Zusammenhang erfasst werden (Signifikanzwert $p = 0,390$).

4 Ergebnisse

Tabelle 4.5 Assoziation zwischen NCALD Stromaexpression und NCALD Tumorzellexpression, sowie verschiedenen klinischen Parametern, berechnet anhand des exakten Fisher-Tests, bzw. χ^2 -Tests. Statistische Signifikanz wurde als $p < 0,050$ definiert. FIGO: *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*.

	NCALD		<i>p</i>
	Stromaexpression	keine Stromexpression	
Alle Karzinome (n = 100)	25 (25,0 %)	75 (57,0 %)	
Alter bei Operation			0,908
< 60 Jahre	14 (56,0 %)	41 (54,7 %)	
≥ 60 Jahre	11 (44,0 %)	34 (45,3 %)	
Postoperativer Tumorrest			0,388
0 cm	12 (48,0 %)	31 (41,3 %)	
> 0 und < 1 cm	7 (28,0 %)	15 (20,0 %)	
≥ 1 cm	6 (24,0 %)	29 (38,7 %)	
FIGO Status			0,123
III	21 (84,0 %)	51 (68,0 %)	
IV	4 (16,0 %)	24 (32,0 %)	
Nodalstatus			0,723
N0	7 (28,0 %)	22 (29,3 %)	
N1	14 (56,0 %)	36 (48,0 %)	
Nx	4 (16,0 %)	17 (22,7 %)	
Aszitesvolumen			0,755
< 500 ml	15 (62,5 %)	43 (58,9 %)	
≥ 500 ml	9 (37,5 %)	30 (41,1 %)	
Histologischer Typ			0,163
serös	17 (68,0 %)	61 (81,3 %)	
nicht serös	8 (32,0 %)	14 (18,6 %)	
Histologisches Grading			0,204
Low	4 (19,0 %)	6 (9,0 %)	
High	17 (81,0 %)	61 (91,0 %)	
Adjuvante Chemotherapie			0,891
Platin	13 (52,0 %)	36 (48,0 %)	
Platin-Taxol	10 (40,0 %)	34 (45,3 %)	
andere	1 (4,0 %)	4 (5,3 %)	
keine	1 (4,0 %)	1 (1,3 %)	
NCALD Tumorzellexpression			0,390
niedrig	15 (60,0 %)	52 (69,3 %)	
hoch	10 (40,0 %)	23 (30,7 %)	

4.2.6 Assoziation der NCALD Stromaexpression mit der Überlebenszeit

Nachdem ermittelt wurde, dass keine Assoziation zwischen NCALD Stromaexpression und NCALD Expression in Tumorzellen, sowie den für das Ovarialkarzinom relevanten klinischen Parametern besteht, wurde in einem nächsten Schritt der Zusammenhang zwischen NCALD Stromaexpression und dem Patientenüberleben analysiert. Hierbei wurde das Gesamt- und rezidivfreie Überleben wie bereits in Abschnitt 4.1.2 sowie Abschnitt 4.2.3 beschrieben, festgelegt. Die Überlebenskurven für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben wurden mithilfe des Kaplan-Meier-Schätzers erstellt und durch den Log-Rank-Test miteinander verglichen.^[56]

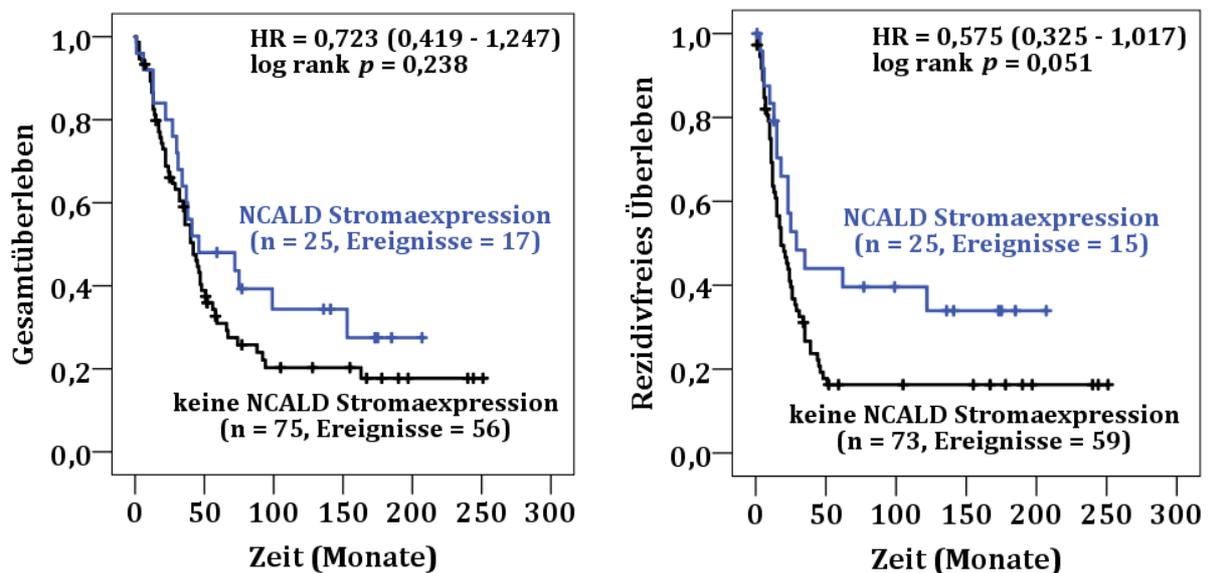


Abbildung 4.9 Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit der NCALD Stromaexpression für das kumulative Gesamtüberleben (links) und kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) des immunhistochemisch untersuchten Ovarialkarzinomkollektivs ($n = 100$). HR: Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI).

Abbildung 4.9 zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das kumulative Gesamtüberleben (links) sowie das kumulative rezidivfreie Überleben (rechts). Dabei wurde deutlich, dass keine signifikante Assoziation zwischen dem Gesamtüberleben und der NCALD Stromaexpression ermittelt werden konnte (OS: $p = 0,238$). Auch beim rezidivfreien Überleben wurde die Signifikanzschwelle von $p < 0,050$ knapp nicht erreicht (RFS: $p = 0,051$). Beim medianen Gesamtüberleben überlebten Patientinnen ohne NCALD Stromaexpression 42 Monaten; mit NCALD Stromaexpression waren es

46 Monate. Das mediane rezidivfreie Überleben lag bei negativer NCALD Stomaexpression bei 18 Monaten und bei vorhandener NCALD Sromaexpression bei 29 Monaten, was eine Differenz von 11 Monaten darstellte.

4.3 NCALD Proteinexpression in humanen Tonsillengewebe

Die NCALD Proteinexpression wurde immunhistochemisch in Ovarialkarzinom-TMAs ermittelt. Diese TMAs enthielten als zusätzliche interne, technische Kontrollen Normalgewebeproben, unter anderem auch humanes Tonsillengewebe (siehe Abschnitt 4.2.1).

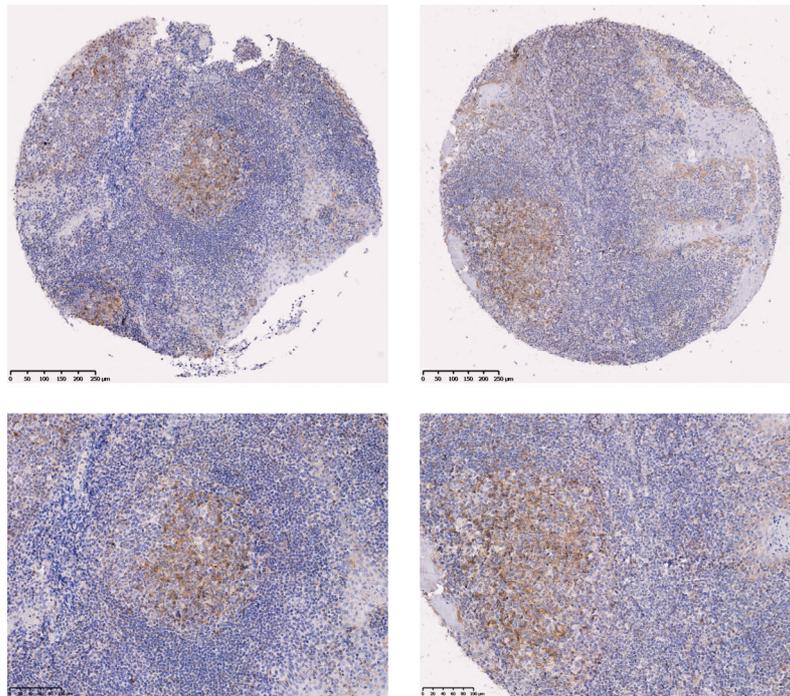


Abbildung 4.10 Immunhistochemische Detektion der NCALD Expression in Tonsillengewebe, welches als interne Kontrolle für Ovarialkarzinom-TMAs verwendet wurde. Dargestellt ist eine spezifische NCALD-Färbung in den Keimzentren der Tonsillen. Die oberen Abbildungen wurden bei einer Vergrößerung von 160 X (Balken: 250 μm) aufgenommen; die unteren Abbildungen stellen Ausschnitte der korrespondierenden oberen Abbildung bei einer Vergrößerung von 400 X (Balken: 100 μm) dar.

Interessanterweise wurde in ebendiesem Tonsillengewebe eine spezifische, von einer Pathologin (Dr. Kristina Schwamborn, Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) bestätigte Immunreaktivität gegen NCALD

detektiert. Dabei zeigte vor allem das Cytoplasma der Keimzentren eine starke NCALD-Färbung. Repräsentative Aufnahmen der NCALD Expression in Tonsillen sind in Abbildung 4.10 gegeben.

4.4 Einfluss NCALDs auf das Ansprechen der Chemotherapie

4.4.1 Stabiler *NCALD* Knockdown in der Ovarialkarzinomzelllinie HEY

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe NCALD Expression in humanen Ovarialkarzinomen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant mit einem verlängerten Patientenüberleben assoziiert war (siehe Abschnitt 4.1 – 4.2.4). Zusätzlich zum Potential NCALDs als prognostischer Biomarker für das Ovarialkarzinom sollte ebenfalls untersucht werden, ob sich NCALD als therapeutischer Biomarker eignet. Der physiologische Einfluss NCALDs auf das Ovarialkarzinom war zum Zeitpunkt dieses Projekts jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Versuche zur ihrer Ermittlung unternommen.

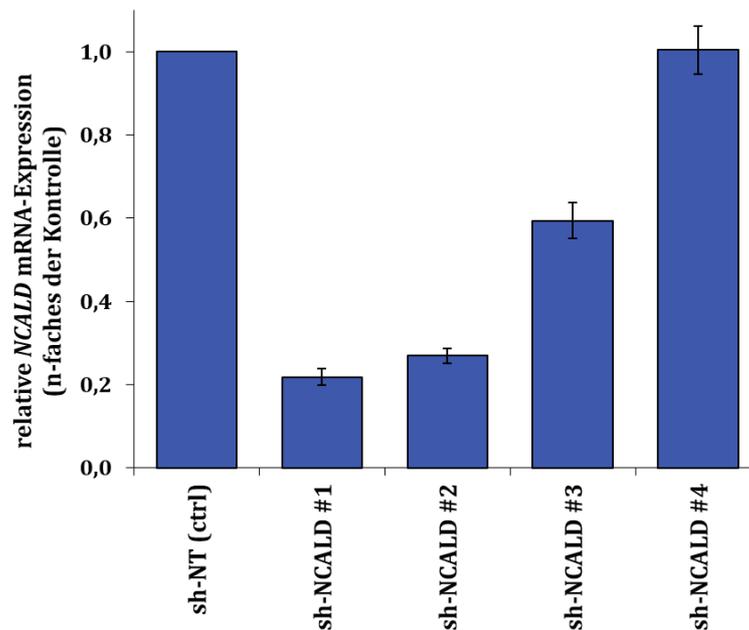


Abbildung 4.11 Darstellung der durch qPCR erhaltenen, relativen *NCALD* mRNA-Expressionslevel. HEY-Zellen wurden mit vier Knockdown-Konstrukten gegen NCALD transduziert (sh-NCALD #1 - #4). Die *NCALD* Genexpressionen wurden mithilfe der endogenen Kontrolle *ALAS1* normalisiert und als Vielfaches der Kontrolle (sh-NT) dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

Dazu wurden zunächst Ovarialkarzinomzelllinien mit reduzierter *NCALD* Expression benötigt. Diese wurden mittels unabhängiger shRNA-Konstrukte durch lentiviral-vermittelten, shRNA-basierten *NCALD* Knockdown in der Ovarialkarzinomzelllinie HEY erstellt (wie bereits in *Material und Methoden*, Abschnitt 3.4.4 beschrieben).

Es wurden fünf verschiedene shRNA-Konstrukte gegen *NCALD* eingesetzt (sh-*NCALD* #1-5, siehe Tabelle 3.19). Die anschließende Puromycin-Selektion überlebten vier Zelllinien (sh-*NCALD* #1-4), welche mittels qPCR auf ihre *NCALD*-Expression analysiert wurden (siehe Abbildung 4.11). Dabei zeigten sh-*NCALD* #1 und sh-*NCALD* #2 Zellen im Vergleich zur Kontrolle (shNT) die niedrigste *NCALD*-Expression, weswegen sie für Folgeversuche ausgewählt wurden.

Anschließend wurde überprüft, ob die *NCALD* Expression auch über mehrere Passagen stabil herabreguliert wurde. Hierzu wurden die verwendeten Zelllinien einmal wöchentlich über den gesamten Zeitraum der Experimente mittels qPCR analysiert (siehe Abbildung 4.12).

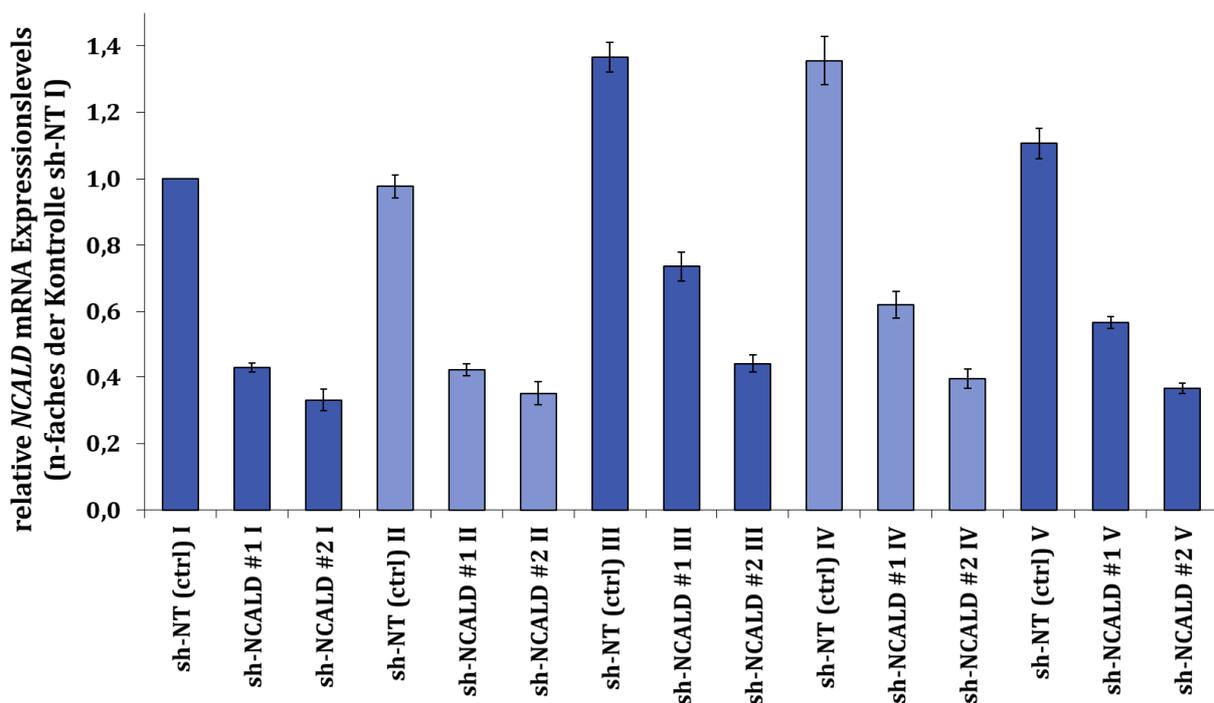


Abbildung 4.12 Darstellung der durch qPCR erhaltenen, relativen *NCALD* mRNA-Expressionslevel. HEY-Zellen wurden wöchentlich auf ihre *NCALD* Expression analysiert. Die *NCALD* Genexpressionen wurden mithilfe der endogenen Kontrolle *ALAS1* normalisiert und als Vielfaches der Kontrolle sh-NT dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

Es konnte gezeigt werden, dass die *NCALD* Expression der Kontroll- sowie der beiden Knockdown-Zelllinien (sh-*NCALD* #1 und sh-*NCALD* #2) über den betrachteten Zeitraum hinweg stabil blieb. Im Mittel ergibt sich bei der Zelllinie sh-*NCALD* #1 eine Reduktion der *NCALD* Expression im Vergleich zur Kontrolle sh-NT von $52,6 \pm 4,9$ %; bei der Zelllinie sh-*NCALD* #2 lag die Reduktion bei $67,3 \pm 2,4$ % (siehe Abbildung 4.13). Diese Differenz war statistisch signifikant, sowohl für die Differenz zwischen Kontrolle und Knockdown-Zelllinie (in beiden Fällen $p < 0,001$) als auch für die Differenz zwischen den Knockdownzelllinien (ebenfalls $p < 0,001$).

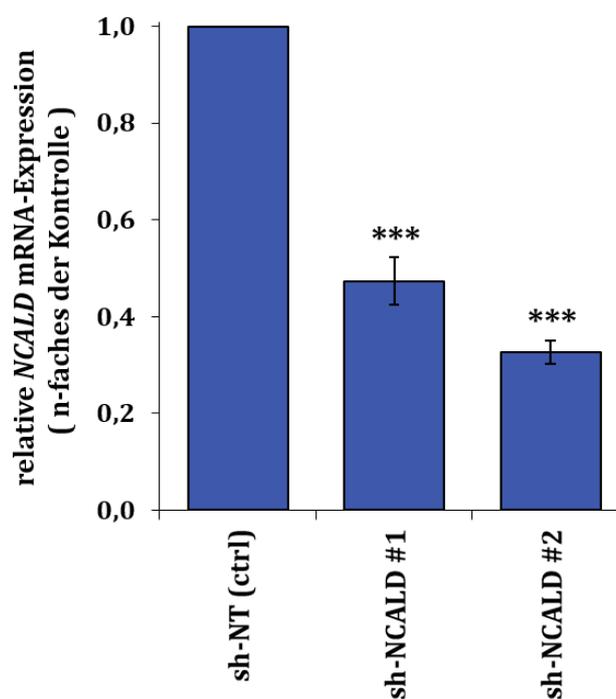


Abbildung 4.13 Darstellung der durch qPCR erhaltenen, relativen *NCALD* mRNA-Expressionslevel. Die *NCALD* Genexpressionen wurden mithilfe der endogenen Kontrolle *ALAS1* normalisiert und als Vielfaches der Kontrolle sh-NT dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Der Einfluss war statistisch signifikant bei $p < 0,001$ (mit *** markiert), $n = 5$.

Um die Knockdown-Effizienz auf der Proteinebene zu untersuchen wurden die HEY-Zellen mittels Western Blot analysiert (siehe Abbildung 4.14).

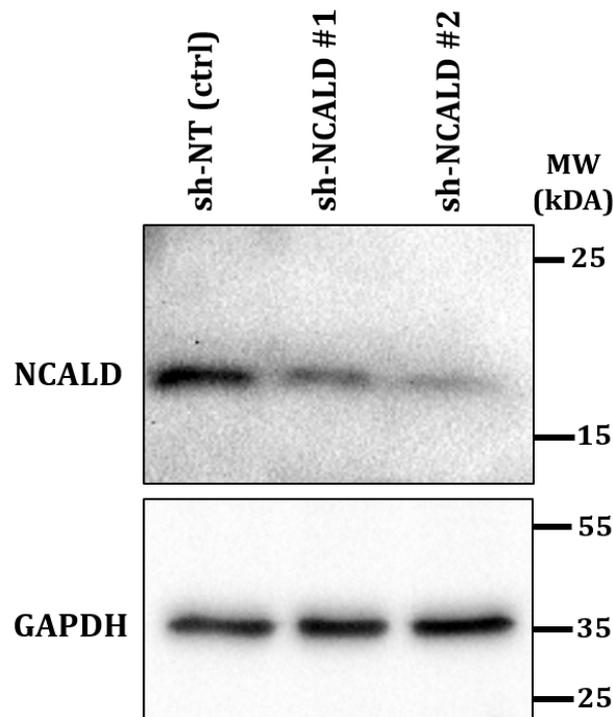


Abbildung 4.14 Detektion der NCALD Proteinexpression in der Kontrollzelllinie sh-NT und den beiden Knockdown-Zelllinien sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2. GAPDH Expression wurde als intrinsische Ladekontrolle verwendet. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. Eine Quantifizierung des hier dargestellten Western Blots ergab eine Reduktion der NCALD Expression um ca. 40 % (sh-NCALD #1) und ca. 60 % (sh-NCALD #2) im Vergleich zur Kontrolle sh-NT.

Der NCALD Knockdown konnte ebenfalls auf Proteinebene festgestellt werden. Ähnlich den qPCR-Ergebnissen zeigte auch hier die Zelllinien sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2 verminderte NCALD Expression im Vergleich zur Kontrolle sh-NT. Eine Quantifizierung des in Abbildung 4.14 dargestellten Western Blots mithilfe der Image Lab 5.1 Software (Bio-Rad Laboratories, siehe Tabelle 3.1.6) ergab eine Reduktion der NCALD Expression im Vergleich zur Kontrolle sh-NT um circa 40 % bei sh-NCALD #1; sh-NCALD #2 zeigte eine Reduktion um circa 60 %.

4.4.2 Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzelllinien

Um die Bedeutung NCALDs für das Ovarialkarzinom zu ergründen, wurde nun der Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzellen analysiert, um so Erkenntnisse über den physiologischen Einfluss NCALDs zu gewinnen. Die Zellviabilität wurde anhand von 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für die Kontrolle (sh-NT) als auch die Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) in Abbildung 4.15 dargestellt.

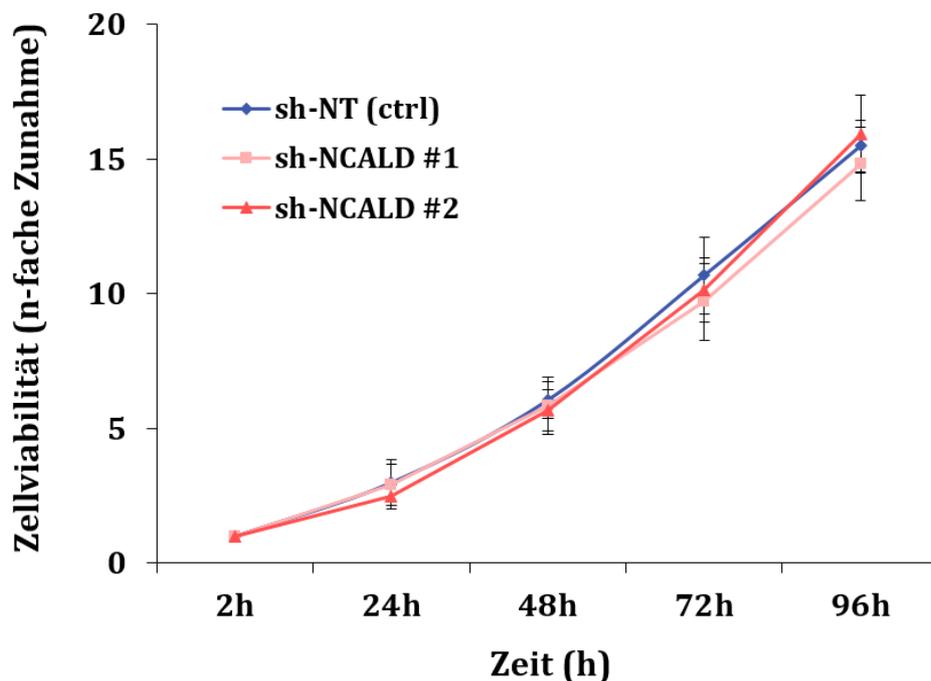


Abbildung 4.15 Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Zunahme der Zellviabilität der Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) über einen Zeitraum von 96 h. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Der Einfluss war statistisch nicht signifikant ($p > 0,050$), $n = 7$.

Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Zunahme der Zellviabilität zwischen den beiden Knockdown-Zelllinien und der Kontroll-Zelllinie (sh-NT) festgestellt. Auch wurde kein statistischer Unterschied zwischen den unterschiedlichen Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) ermittelt.

4.4.2.1 Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität unter Cisplatin-Behandlung

Die in Abschnitt 4.2.3 gezeigte Assoziation der NCALD Expression mit dem Patientenüberleben wurde an einem Patientenkollektiv durchgeführt, welches zu 93 % mit einer platinhaltigen Chemotherapie behandelt wurde (siehe Tabelle 3.7 in Abschnitt 3.2). Aus diesem Grund wurde daraufhin der Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzellen nach Cisplatin-Intervention gemessen. Die hierfür verwendeten Cisplatin-Konzentrationen wurde an bereits veröffentlichten Experimenten an HEY-Zellen von Meinhold-Heerlein *et al.*^[57] und Volkmann *et al.*^[43] angelehnt. Die dort eingesetzten Konzentrationen bewegten sich in einem Rahmen von 2,0 µg/ml bis 10 µg/ml Cisplatin. Da die publizierten Versuche auf kürzeren Inkubationszeiten basierten als die Zellviabilitätsexperimente der vorliegenden Arbeit, wurde sich an den niedrigeren Cisplatin-Konzentrationen orientiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konzentrationen zwischen 1,0 µg/ml und 2,5 µg/ml (in 0,5 µg/ml-Schritten) ausgetestet. Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Konzentration zwischen 1,0 µg/ml und 1,5 µg/ml Cisplatin eine optimale Zellviabilitätsdynamik abgebildet werden konnte. Daher wurde im Folgenden 1,0 µg/ml und 1,5 µg/ml Cisplatin verwendet.

Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellviabilitätsversuchen (siehe Abbildung 4.15) zeigten sich bei 1,0 µg/ml Cisplatin-Intervention (siehe Abbildung 4.16) signifikante Unterschiede zwischen den Knockdown-Zelllinien und der Kontrolle: Die Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) reagierten weniger sensibel auf die Cisplatin-Behandlung als die Kontrolle sh-NT. 48 Stunden nach Cisplatin-Zugabe (entspricht 72 h nach Versuchsbeginn) lag die Zellviabilität der Kontrolle (sh-NT) bei $50,9 \pm 1,9$ %, wohingegen die Zellviabilität der Knockdownzelllinien bei $59,6 \pm 2,3$ % (sh-NCALD #1, $p = 0,007$) und $68,6 \pm 5,8$ % (sh-NCALD #2, $p = 0,008$) lag. Damit zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Knockdownzelllinien. Auch nach 72 h Cisplatin-Behandlung (entspricht 96 h nach Versuchsbeginn) konnte dieser signifikante Unterschied festgestellt werden: Hier lag die Zellviabilität der Kontrollzellen (sh-NT) bei $33,2 \pm 3,1$ %; die Zellviabilität der Knockdownzelllinien jedoch bei $42,9 \pm 2,9$ % (sh-NCALD #1, $p = 0,016$) und $51,4 \pm 7,6$ % (sh-NCALD #2, $p = 0,019$).

Es zeigte sich ebenfalls, dass die Abnahme der Sensitivität auf Cisplatin der unterschiedlichen Zelllinien sh-NT (Kontrolle), sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2 mit der Abnahme der NCALD-Expression in den Zelllinien korrelierte (NCALD mRNA-Expression bezogen auf die Kontrolle: sh-NT: 100 %, sh-NCALD #1: 47,4 %, sh-NCALD #2: 32,7 %; NCALD Proteinexpression bezogen auf die Kontrolle: sh-NT: 100 %, sh-NCALD #1: ca. 60 %, sh-NCALD #2: ca. 40 %).

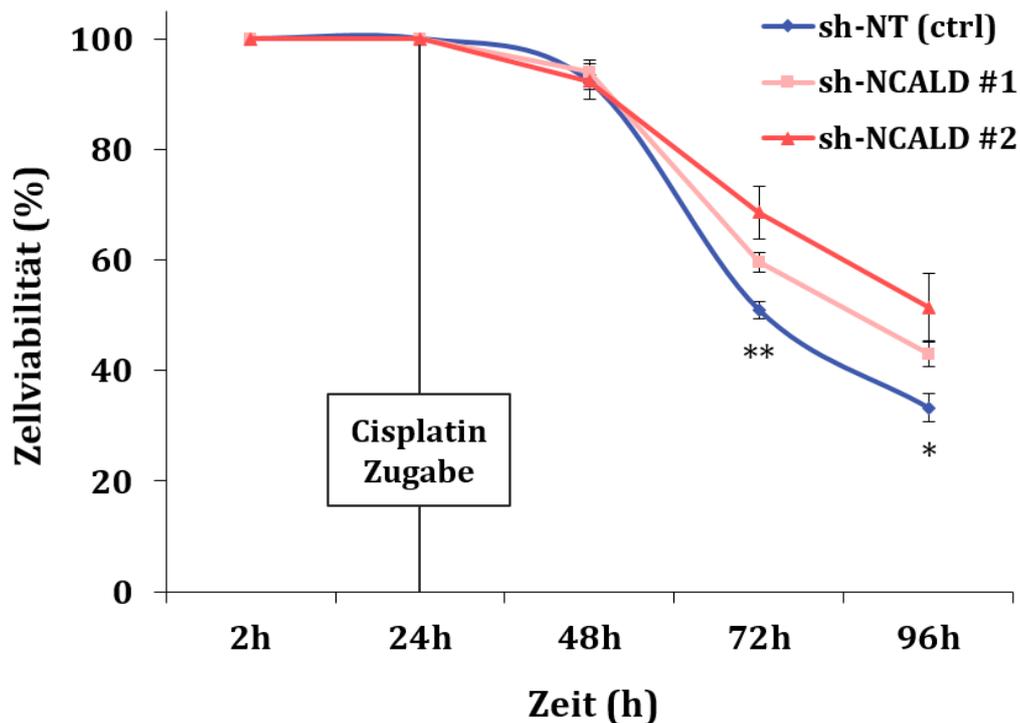


Abbildung 4.16 Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Abnahme der Zellviabilität der Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) nach Cisplatin-Behandlung (1,0 µg/ml) über einen Zeitraum von 96 h. NCALD mRNA-Expression bezogen auf die Kontrolle: sh-NT: 100 %, sh NCALD #1: 47,4 % und sh-NCALD #2: 32,7 %. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Der Einfluss war statistisch signifikant (* $\triangleq p < 0,050$; ** $\triangleq p < 0,010$), $n = 3$.

Um diesen Zusammenhang weiter zu ergründen, wurden Zellviabilitätsversuche mit einer höheren Cisplatinkonzentration (1,5 µg/ml) unternommen (siehe Abbildung 4.17). Auch hier blieb der signifikante Unterschied zwischen Knockdown-Zelllinien und Kontrolle bestehen: 48 Stunden nach Cisplatin-Zugabe (entspricht 72 h nach Versuchsbeginn) lag die Zellviabilität der Kontrolle (sh-NT) bei $35,4 \pm 2,7$ %; die Zellviabilität der Knockdownzelllinien lag allerdings noch bei $48,3 \pm 3,8$ % (sh-NCALD #1, $p = 0,009$) und $57,9 \pm 5,0$ % (sh-NCALD #2, $p = 0,002$) (siehe Abbildung 4.17). Diese Ergebnisse spiegelten sich auch nach 72 h Cisplatin-Behandlung

(entspricht 96 h nach Versuchsbeginn) wieder (Zellviabilität sh-NT $13,3 \pm 2,7 \%$ vs. sh-NCALD #1 $24,2 \pm 4,9 \%$, $p = 0,028$ vs. sh-NCALD #2 $32,7 \pm 2,3 \%$, $p = 0,001$).

Vergleicht man die Ergebnisse der Cisplatin-Intervention mit $1,0 \mu\text{g/ml}$ und $1,5 \mu\text{g/ml}$ Cisplatin, so erkennt man, dass die Gesamtviabilität bei der Cisplatin-Intervention mit $1,5 \mu\text{g/ml}$ niedriger als bei der Behandlung mit $1,0 \mu\text{g/ml}$ ist.

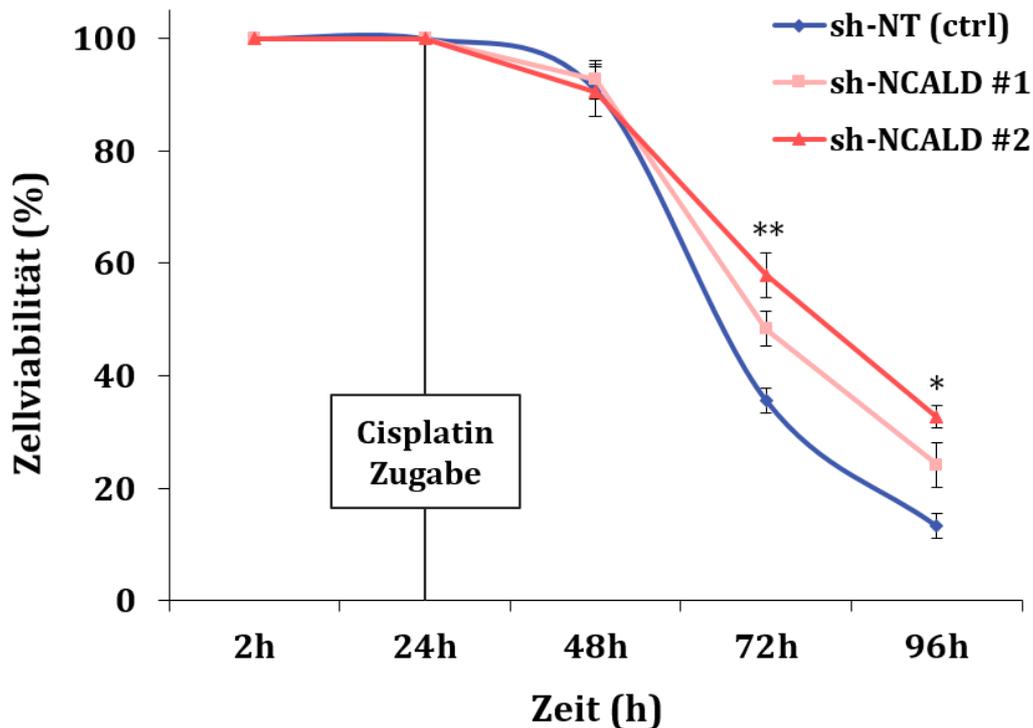


Abbildung 4.17 Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Abnahme der Zellviabilität der Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) nach Cisplatin-Behandlung ($1,5 \mu\text{g/ml}$) über einen Zeitraum von 96 h. *NCALD* mRNA-Expression bezogen auf die Kontrolle: sh-NT: 100 %, sh NCALD #1: 47,4 % und sh-NCALD #2: 32,7 %. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Der Einfluss war statistisch signifikant (* $\triangleq p < 0,050$; ** $\triangleq p < 0,010$), $n = 3$.

4.4.2.2 Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität unter Paclitaxel-Behandlung

Da ca. 70 % der Ovarialkarzinome heutzutage mit einer Kombination aus Platin und Taxol behandelt werden,^[4] wurde in einem nächsten Schritt die Zellviabilität der Kontrolle (sh-NT) als auch der Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) unter Paclitaxel-Intervention untersucht. Die dabei eingesetzten Paclitaxel-Konzentrationen orientierten sich an bereits veröffentlichten Experimenten von

Meinhold-Heerlein *et al.*^[57] Die dort verwendeten Konzentrationen reichten von 3,0 ng/ml bis 10 ng/ml Paclitaxel. Da die publizierten Versuche auf kürzeren Inkubationszeiten basierten als die Zellviabilitätsexperimente der vorliegenden Arbeit, wurde sich an den niedrigeren Paclitaxel-Konzentrationen orientiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konzentrationen zwischen 3,0 ng/ml und 7 ng/ml getestet. Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Konzentration zwischen 5,0 ng/ml und 7,0 ng/ml Paclitaxel eine optimale Zellviabilitätsdynamik abgebildet werden konnte. Daher wurde sich im Folgenden für Paclitaxel-Konzentrationen von 5,0 ng/ml und 7,0 ng/ml entschieden.

Im Gegensatz zur Cisplatin-Intervention konnten hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle (sh-NT) und den Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) unter Paclitaxel-Intervention mit 5,0 ng/ml Paclitaxel festgestellt werden (siehe Abbildung 4.18). Auch zwischen den unterschiedlichen Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

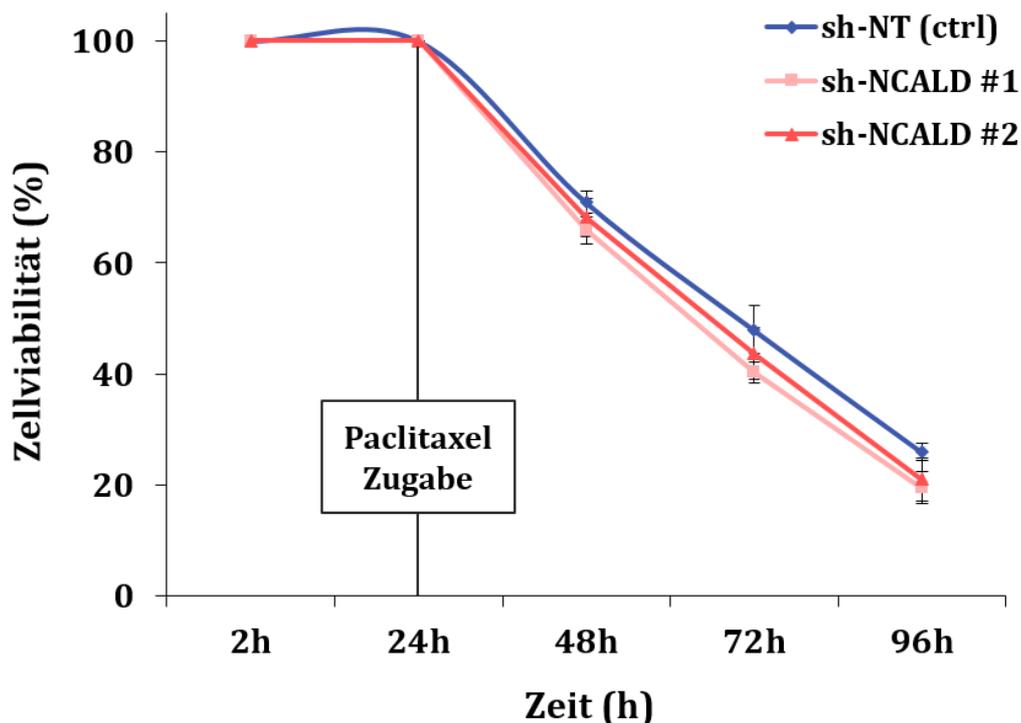


Abbildung 4.18 Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Abnahme der Zellviabilität der Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) nach Paclitaxel-Behandlung (5,0 ng/ml) über einen Zeitraum von 96 h. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Der Einfluss war statistisch nicht signifikant, $n = 3$.

Dieser Zusammenhang wurde auch mit einer Paclitaxel-Konzentration von 7,0 ng/ml untersucht (Abbildung 4.19). Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle (sh-NT) und Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) oder zwischen den einzelnen Knockdown-Zelllinien gemessen.

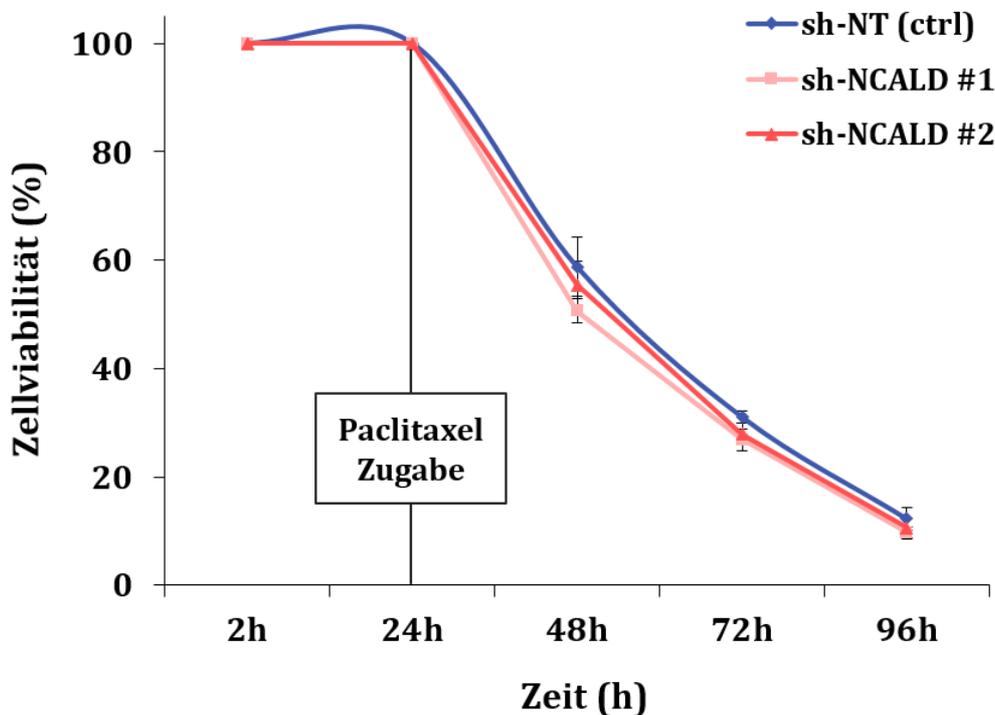


Abbildung 4.19 Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Abnahme der Zellviabilität der Knockdown-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) nach Paclitaxel-Behandlung (7,0 ng/ml) über einen Zeitraum von 96 h. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Der Einfluss war statistisch nicht signifikant, $n = 3$.

4.4.3 Assoziation der NCALD Expression mit dem Patientenüberleben abhängig von der Art der Chemotherapie

Die durchgeführten Zellviabilitätsversuche (Abschnitt 4.4.2.1 und Abschnitt 4.4.2.2) zeigten, dass die Kontrollzelllinie (sh-NT) und die Knockdownzelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) unterschiedlich auf Cisplatin- und Paclitaxel-Intervention reagierten. Bei der Cisplatin-Intervention konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Knockdowns festgestellt werden; dieser Zusammenhang wurde bei Paclitaxel-Intervention nicht beobachtet.

Diese in den Zellkulturexperimenten gemachten Beobachtungen sollten nun anhand des in Abschnitt 3.2 dargestellten Patientenkollektivs überprüft werden. Dazu wurde die

Assoziation der NCALD Proteinexpression mit dem Patientengesamtüberleben (siehe Abschnitt 4.2.3) erneut berechnet, wobei diesmal das Patientenkollektiv in Abhängigkeit von der eingesetzten Chemotherapie aufgeteilt wurde (Platin-Monotherapie vs. Platin-Taxol-Kombinationstherapie).

In Abbildung 4.20 sind die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das kumulative Gesamtüberleben für Platin-Monotherapie (links) sowie Platin-Taxol-Kombinationstherapie (rechts) dargestellt.

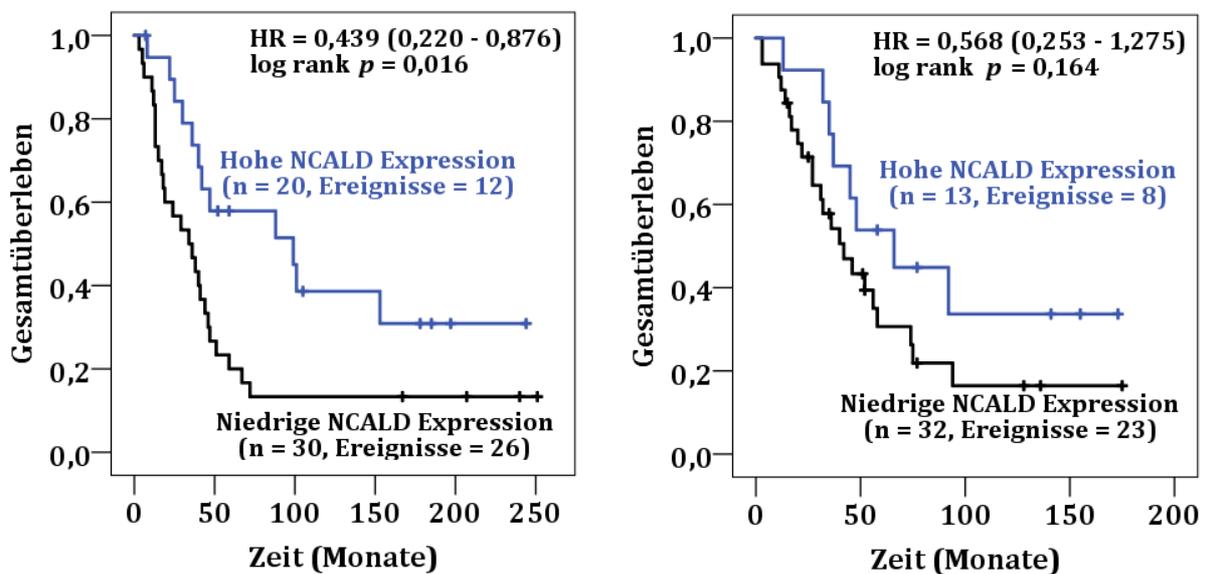


Abbildung 4.20 Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit der NCALD Proteinexpression für das kumulative Gesamtüberleben des mittels immunhistochemischen Analysen untersuchten Ovarialkarzinomkollektivs aufgeteilt nach Art der Chemotherapie: Platin-Monotherapie (links, n = 50) und Platin-Taxol-Kombinationstherapie (rechts, n = 45). HR: Hazard Ratio mit 95 % Konfidenzintervall (CI).

In beiden Fällen zeigten Patienten mit hoher NCALD Expression ein längeres Gesamtüberleben als Patienten mit niedriger NCALD Expression. Dieser Zusammenhang war allerdings nur in der Gruppe der Platin-Monotherapie signifikant ($p = 0,016$). Im Falle der Platin-Taxol-Kombinationstherapie wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher und niedriger NCALD Expression und dem Patientenüberleben festgestellt.

5 Diskussion

Das Ovarialkarzinom weist nach wie vor die höchste relative Mortalität bei gynäkologischen Krebserkrankungen auf.^{[1],[4]} Die Standardtherapie für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom besteht aus einer Kombinationstherapie aus Platin und Taxol.^[4] Während zu Beginn mehr als 80% der Patienten auf diese Chemotherapie ansprechen, erleiden die meisten Patientinnen einen Rückfall und entwickeln Resistenzen.^[4] Daher werden dringend neue Biomarker für Strategien der personalisierten Medizin benötigt. Einen vielversprechenden Kandidaten für solche Biomarker könnte der neuronale Calciumsensor Neurocalcin δ (NCALD) darstellen. NCALD ist ein 22,24 kDa großes, Calcium-bindendes Protein,^[37] welches über einen Calcium-Myristoyl-Switch mit der Zellmembran in Kontakt treten kann.^[35] In der vorliegenden Arbeit wird das Potential NCALDs als Biomarker für das Ovarialkarzinom näher untersucht.

5.1 Hohe *NCALD* mRNA-Expression mit längerer Überlebenszeit assoziiert

Vorläufige Analysen der Arbeitsgruppe „Gynäkologische Tumorgenetik“ des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München zur mRNA-Expression *NCALDs* zeigten, dass eine hohe *NCALD* Expression mit einem längeren Patientenüberleben assoziiert war. Für diese Microarray-basierten Untersuchungen wurden jedoch mRNA-Proben mittels linearer RNA-Amplifikation vervielfältigt. Da die Amplifikation der mRNA möglicherweise zu einer Verzerrung der Genexpression führen kann,^[54] wurden diese Ergebnisse nun in der vorliegenden Arbeit anhand einer unabhängigen Methode an einem repräsentativem Teilkollektiv bestätigt (siehe Abschnitt 4.1.1). Hierfür wurde die qPCR gewählt, da diese Methode keine lineare Amplifikation benötigt. Es konnte festgestellt werden, dass die durch qPCR erhobenen Daten stark positiv mit den auf Microarray-basierten Daten korrelierten. Somit konnte gezeigt werden, dass bei der mRNA-Amplifikation für die Microarray-Analyse keine Verzerrung einer Genexpression stattgefunden hatte. Die Bestätigung der Microarray-basierten Daten durch eine

unabhängige Methode^[43] ist ein wichtiger erster Schritt, da diese Daten die Basis für Folgeanalysen bildeten.

Als nächstes wurde die *NCALD* Expression im repräsentativen Teilkollektiv mit dem Patientenüberleben assoziiert (siehe Abschnitt 4.1.2). Sowohl für das rezidivfreie (RFS) als auch für das Gesamtüberleben (OS) konnte eine Assoziation von hoher *NCALD* Expression mit längerem Patientenüberleben festgestellt werden. Im Falle des rezidivfreien Überlebens ($p = 0,060$) konnte der Signifikanzwert von $p = 0,050$ nicht erreicht werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die geringe Größe ($n = 31$) des Teilkollektivs sein. Zur Bestimmung des Rezidivzeitpunktes beim Ovarialkarzinom können neben dem Nachweis einer Tumormanifestation weitere Parameter verwendet werden (zum Beispiel ein CA 125-Anstieg).^{[4], [20]} Daher wäre ebenfalls denkbar, dass es zu einer Verzerrung der rezidivfreien Zeit kam und dadurch keine signifikante Assoziation gezeigt werden konnte. Die Assoziation der *NCALD* Expression mit dem Gesamtüberleben war signifikant ($p = 0,012$). Dies stellte einen ersten Hinweis auf *NCALDs* Potential als Biomarker dar und war die Voraussetzung für proteinbasierte Folgeversuche.

Da diese Ergebnisse in einem kleinen, repräsentativen Teilkollektiv ($n = 31$ Proben) gezeigt wurden, wurde in einem nächsten Schritt die Assoziation der *NCALD* Expression mit dem Patientenleben in einem größeren Ovarialkarzinomkollektiv validiert. Hierzu wurden unabhängige, öffentlich zugängliche Affymetrix-Microarray-Datensätze des online „Biomarker-Assessment Tools“ *KM-Plotter*^[48] verwendet (siehe Abschnitt 4.1.3). Es wurden dieselben Parameter eingestellt, welche bei den qPCR- und Microarray-Analysen (Abschnitt 4.1.1 – 4.1.2) verwendet wurden, wobei eine detaillierte klinische Beschreibung jedes einzelnen Falles im *KM-Plotter* nur begrenzt möglich ist. Allerdings bietet der *KM-Plotter* Zugang zu einem großen Ovarialkarzinomkollektiv (Gesamtüberleben $n = 547$, rezidivfreies Überleben $n = 467$), welches sich aus unabhängigen Techniken und verschiedenen, unabhängigen Datensätzen ($n = 15$, Stand 16.05.2018) zusammensetzt. Diese Analysen zeigten, dass eine hohe *NCALD* Expression sowohl mit einem längeren Gesamt- als auch rezidivfreien Überleben signifikant assoziiert war. Somit konnten die zuvor gefundenen Assoziationen durch das größere Kollektiv bestätigt werden, wodurch das Potential *NCALDs* als Biomarker für das

Ovarialkarzinom weiter unterstrichen wurde. Da die *NCALD* Expression hier nun ebenfalls signifikant mit dem rezidivfreien Überleben assoziiert war, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die *NCALD* Expression im repräsentativen Teilkollektiv der qPCR-Analysen aufgrund der kleinen Größe des Teilkollektives nicht signifikant mit dem rezidivfreien Überleben assoziiert war.

5.2 Hohe *NCALD* Proteinexpression mit längerer Überlebenszeit assoziiert

Microarray- und qPCR-Analysen ergaben eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen *NCALD* mRNA-Expression und längerem Patientenüberleben. Die Mehrheit der physiologischen Zellprozesse laufen jedoch auf Proteinebene ab. In humanen Zelllinien korreliert die Menge an Protein nur teilweise mit der korrespondierenden mRNA.^[58] Deshalb ist für eine Charakterisierung *NCALD*s als Biomarker neben einer Analyse auf Transkriptionsebene auch die Untersuchung der Proteinexpression erforderlich. Daher wurden die zuvor ermittelten Assoziationen mittels immunhistochemischen Analysen in einem Ovarialkarzinomkollektiv (n = 102) untersucht (siehe Abschnitt 4.2.1). Es wurde zunächst festgestellt, dass keine signifikante Assoziation zwischen der *NCALD* Proteinexpression und den für das Ovarialkarzinom relevanten klinischen Parametern (Alter der Patientinnen bei der tumorreduzierenden Operation, der postoperative Tumorrest, FIGO Status, Nodalstatus, Aszitesvolumen, der histologische Typ sowie das Grading und die Art der adjuvanten Chemotherapie) bestand. Diese Ergebnisse zeigen, dass *NCALD* möglicherweise ein unabhängiger Biomarker ist, da eine hohe oder niedrige *NCALD* Proteinexpression unabhängig von den hier untersuchten Parametern vorliegt. Da keine Assoziation gefunden wurde, konnte kein Rückschluss auf eine mögliche physiologische Funktion *NCALD*s geschlossen werden.

Weiterhin zeigte sich, dass auch auf Proteinebene eine hohe *NCALD* Expression beim Gesamtüberleben wie auch beim rezidivfreien Überleben mit einem längeren Patientenüberleben signifikant assoziiert war. Somit konnten die mRNA-Daten auf Proteinebene bestätigt werden. Diese Ergebnisse unterstützen weiterhin *NCALD*s Potential als Biomarker.

Der Einfluss der einzelnen, für das Ovarialkarzinom relevanten klinischen Parameter auf die Überlebenszeit der Patienten wurde mittels Cox-Regressionsanalysen bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.4). Als signifikant setzten sich neben der NCALD Proteinexpression auch der postoperative Tumorrest, der FIGO Status, der Nodalstatus und das Ascitesvolumen durch. Das Patientinnenalter und das histologische Grading waren weder mit dem Gesamt- noch dem rezidivfreien Überleben signifikant assoziiert. Dies könnte im Falle des histologischen Gradings mit der ungleichen Verteilung zwischen Low und High Grading (OS: 10 vs. 80; RFS: 9 vs. 80) erklärt werden. Auch die unterschiedliche Biologie der Low und High Grad Tumore könnte eine mögliche Ursache sein.^[59]

Das Patientinnenalter zum Zeitpunkt der tumorreduzierenden Operation wird in der Literatur als signifikanter prognostischer Marker beschrieben,^{[12],[60]} was in dieser Studie nicht gezeigt werden konnte. Um diesen Zusammenhang genauer zu erläutern bedarf es weiterer Analysen.

Im Anschluss wurden multivariable Cox-Regressionsanalysen durchgeführt, in denen neben der NCALD Proteinexpression auch die klinischen Parameter eingingen, welche in den univariablen Cox-Regressionen eine signifikante Assoziation mit der Überlebenszeit zeigten. Neben dem postoperativen Tumorrest, welcher als stärkster klinischer Faktor gilt,^{[4],[12]} setzte sich auch NCALD als signifikanter Faktor für das Gesamtüberleben durch. Beim rezidivfreien Überleben war die NCALD Proteinexpression der einzige signifikante Faktor. Somit wurde gezeigt, dass sich die NCALD Proteinexpression sowohl in uni- als auch in multivariablen Analysen als signifikanter Faktor gegen die für das Ovarialkarzinom relevanten, klinischen Faktoren durchgesetzt hatte. Diese Ergebnisse bestärken die Unabhängigkeit NCALDs als Biomarker für das Ovarialkarzinom, welche bereits durch die fehlende Assoziation zu den für das Ovarialkarzinom relevanten klinischen Parametern angedeutet wurde.

In der Literatur finden sich nur wenige Daten zu NCALD im Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom. Issakson *et al.*^[42] analysierten mRNA aus Blut von Ovarialkarzinompatientinnen (n = 33) und konnten dabei feststellen, dass die *NCALD* mRNA-Expression in der Patientengruppe mit schlechter Prognose signifikant herabreguliert war. Eine hohe *NCALD* Expression im Blut war mit signifikant längerem Patientenüberleben

assoziiert.^[42] In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe *NCALD* mRNA-Expression im Tumorgewebe mit längerem Patientenüberleben signifikant assoziiert war, welches die Ergebnisse von Isaksson *et al.* widerspiegelt und erweitert (siehe Abschnitt 4.1.2 – 4.1.3). Diese Ergebnisse wurden ebenfalls von Dong *et al.*^[26] bestätigt, welche vorrangig Daten aus Onlinedatenbanken analysierten. Die vorliegende Arbeit beschreibt, dass eine hohe *NCALD* Proteinexpression (n = 102) sowohl mit einem längeren Gesamt- als auch progressionsfreien Überleben assoziiert war. Dieser Zusammenhang wird von Feng *et al.* unterstützt, welche in Tumorgewebe von Ovarialkarzinompatientinnen (n = 178) zeigten, dass eine niedrige *NCALD* Proteinexpression mit einem kürzeren Gesamt- und progressionsfreien Überleben assoziiert war.^[25] Zusammenfassend weist die in dieser Arbeit dargestellte Assoziation der *NCALD* Expression auf mRNA- und Proteinebene mit dem Patientenüberleben darauf hin, dass *NCALD* einen prognostischen Biomarker für das Ovarialkarzinom darstellen könnte.

*NCALD*s Potential als Biomarker wurde auch in anderen Tumorentitäten beschrieben. Shi *et al.*^[41] zeigten, dass *NCALD* sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen-(NSCLC)-Geweben im Vergleich zu Normalgewebe herabreguliert war. Eine hohe *NCALD* Proteinexpression in NSCLC (n = 90) war außerdem signifikant mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert.^[41] Dies stellt eine Parallele zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen dar, dass eine hohe *NCALD* Expression mit längerem Patientenüberleben assoziiert ist. Im Falle der akuten myeloischen Leukämie konnte dieser Zusammenhang nicht gezeigt werden: Eine hohe *NCALD* mRNA-Expression (n = 75) war dort mit kürzerem Patientenüberleben assoziiert.^[61] Dies lässt darauf schließen, dass *NCALD*s Potential als Biomarker abhängig von der betreffenden Tumorentität ist.

5.3 Einfluss NCALDs auf das Ansprechen der Chemotherapie

Nachdem gezeigt wurde, dass NCALD ein möglicher prognostischer Biomarker für das Ovarialkarzinom sein könnte, wurde untersucht, ob NCALD sich auch als therapeutischer Biomarker eignet. Der physiologische Einfluss NCALDs auf das Ovarialkarzinom war zum Zeitpunkt dieses Projekts jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Versuche zur seiner Ermittlung unternommen.

Hierzu wurde ein stabiler NCALD Knockdown in der Ovarialkarzinomlinie HEY erstellt, welcher sowohl auf mRNA- sowie auf Proteinebene bestätigt wurde (siehe Abschnitt 4.4.1). Es wurden zwei Knockdownzelllinien unterschiedlicher NCALD Expression (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) und eine Kontrollzelllinie (sh-NT) erzeugt. Dabei zeigte sich, dass sich die Reduktion der *NCALD* Expression auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit der Zelllinie auf die Reduktion der NCALD Expression auf Proteinebene widerspiegelte.

In einem nächsten Schritt wurde mittels MTT-Assay der Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzellen analysiert (siehe Abschnitt 4.4.2). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und den Knockdownzelllinien sowie zwischen den beiden Knockdownzelllinien festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass NCALD nicht direkt an der Zellviabilität der Ovarialkarzinomzellen beteiligt ist. Allerdings wurde die Assoziation der NCALD Expression mit dem Patientenüberleben (siehe Abschnitt 4.2.3) in einem Patientenkollektiv durchgeführt, welches zu 93 % mit einer platinhaltigen Chemotherapie behandelt wurde (siehe Tabelle 3.7 in Abschnitt 3.2). Daher wurde der Einfluss NCALDs auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzellen nach Cisplatin-Intervention analysiert (siehe Abschnitt 4.4.2.1). Die Knockdownzelllinien, welche eine niedrige NCALD Expression aufwiesen, reagierten signifikant weniger sensibel auf die Cisplatin-Intervention als die Kontrolle, welche sich durch eine hohe NCALD Expression auszeichnete. Dabei korrelierte die Abnahme der Sensitivität auf Cisplatin der unterschiedlichen Zelllinien (sh-NT, sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) mit der Abnahme der NCALD Expression in den Zelllinien. Die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien blieb auch bei Erhöhung der Cisplatin-

Intervention (1,0 µg/ml vs. 1,5 µg/ml) signifikant bestehen. Es zeigte sich ebenfalls, dass die Gesamtviabilität bei der Cisplatin-Intervention mit 1,5 µg/ml niedriger als bei der Behandlung mit 1,0 µg/ml war, was der erwarteten Prognose entsprach. Dies unterstreicht, dass es sich bei diesen Ergebnissen um eine NCALD- und Cisplatin-konzentrationsabhängige Korrelation handelt. Diese Ergebnisse weisen zusätzlich darauf hin, dass NCALD möglicherweise einen Einfluss auf die Resistenz der Ovarialkarzinomzellen gegen Chemotherapie nimmt. Dieser Zusammenhang wird ebenfalls von Dong *et al.* und Feng *et al.* unterstützt: Dong *et al.* zeigten, dass die NCALD mRNA-Expression in Platin-resistenten Ovarialkarzinomzelllinien sowie –geweben signifikant herabreguliert war.^[26] Feng *et al.* stellten dar, dass NCALD in platin sensitiven Ovarialkarzinompatientinnen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene höher exprimiert wurde.^[25]

Aktuell werden jedoch ca. 70 % der Ovarialkarzinome mit einer Kombination aus Platin und Taxol behandelt.^[4] Daher wurde die Zellviabilität der Ovarialkarzinomzelllinien (sh-NT, sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) ebenfalls unter Paclitaxel-Intervention untersucht. Interessanterweise wurden im Gegensatz zur Cisplatin-Intervention unter Paclitaxel-Intervention keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockdownzelllinien und der Kontrolle festgestellt. Dieser Zusammenhang blieb auch bei erhöhter Paclitaxel-Intervention (5,0 ng/ml vs. 7,0 ng/ml) bestehen. Es zeigte sich, dass auch die Kurvenverläufe der Zellviabilitätsabnahme unter Cisplatin- und Paclitaxel-Intervention verschieden waren. Dies könnte durch den unterschiedlichen Wirkmechanismus von Cisplatin und Paclitaxel begründet werden. Diese Ergebnisse erweitern die zuvor gewonnenen Erkenntnisse, dass NCALD einen Einfluss auf die Resistenz der Ovarialkarzinomzellen gegen Chemotherapie ausübt. NCALD scheint in physiologische Prozesse involviert zu sein, welche spezifisch an einer Resistenz gegenüber Cisplatin beteiligt sind. Damit wäre es denkbar, dass NCALD nicht nur als prognostischer Biomarker für das Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen eingesetzt werden könnte, sondern möglicherweise auch als Biomarker für den Erfolg einer Platin-basierten Chemotherapie.

Um zu überprüfen, ob diese auf Zellkulturexperimenten basierenden Ergebnisse auch in Tumorgewebe gezeigt werden können, wurde das in Abschnitt 3.2 dargestellte

Patientenkollektiv erneut ausgewertet. Dieses Mal wurde die Assoziation der NCALD Proteinexpression mit dem Patientengesamtüberleben (siehe Abschnitt 4.2.3) jedoch in Abhängigkeit von der eingesetzten Chemotherapie (Platin-Monotherapie vs. Platin-Taxol-Kombinationstherapie) analysiert (siehe Abschnitt 4.4.3). Obwohl in beiden Therapiestrategien Patienten mit hoher NCALD Expression ein längeres Gesamtüberleben als Patienten mit niedriger NCALD Expression zeigten, war dieser Zusammenhang nur in der Gruppe der Platin-Monotherapie signifikant. Dies könnte einen weiteren Hinweis darstellen, dass NCALD einen spezifischen Einfluss auf Platin-basierte Chemotherapie ausübt. Da es keine Patientinnen mit Taxol-Monotherapie gab, konnten die Ergebnisse der Platin-Taxol-Kombinationstherapie dabei nicht direkt mit den Zellkulturergebnissen mit reiner Taxol-Intervention verglichen werden, da es möglich sein kann, dass der Platinanteil der Therapie die Überlebensdaten beeinflusst. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung dafür, dass zwar ein Unterschied zwischen hoher und niedriger NCALD Expression gemessen wurde, dieser Unterschied jedoch nicht signifikant war. Bis dato gibt es in der Literatur keine Untersuchungen zum Einfluss NCALDs auf Paclitaxelintervention.

Der exakte molekularbiologische Wirkmechanismus der Cisplatin-induzierten antineoplastischen Wirkung ist noch nicht vollständig erforscht.^[62] Es wird angenommen, dass die Hauptwirkung auf der kovalenten Bindung aquatisierten Cisplatins an der DNA beruht, indem die so gebildeten Cisplatin-DNA-Addukte zum Stillstand des Zellzyklus oder zur Apoptose führen.^[63] Trotz hoher Ansprechrate der Erstlinienchemotherapie entwickelt die Mehrheit der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom ein Rezidiv und eine Resistenz gegenüber platinhaltiger Chemotherapie.^{[4],[19]} Dabei wird postuliert, dass die Gründe für eine Platinresistenz multifaktoriell sind.^{[62],[64]} Es konnte gezeigt werden, dass NCALD möglicherweise in physiologische Prozesse involviert zu sein scheint, welche spezifisch an einer Resistenz gegenüber Cisplatin beteiligt sind. Eine denkbare Hypothese könnte sein, dass NCALD eine Infiltration des Ovarialkarzinoms mit Immunzellen begünstigen könnte. Für diese Hypothese spricht unter anderem, dass im Rahmen dieser Arbeit eine spezifische NCALD Expression in Keimzentren von humanem Tonsillengewebe gefunden wurde (siehe Abschnitt 4.3). Keimzentren sind reich an Immunzellen, insbesondere an B-Zellen, folliculäre dendritische Zellen und CD4⁺-T-Zellen.^[65] Zukünftige Studien sind

notwendig, um herauszufinden, welche Bedeutung die hohe NCALD Expression in den Keimzentren hat und ob NCALD mit den dort vorhandenen Immunzellen interagiert. Eine NCALD Proteinexpression wurde ebenfalls im Stroma der Ovarialkarzinome detektiert (siehe Abschnitt 4.2.5-4.2.6). Das Tumorstroma enthält, wie die Keimzentren, eine große Anzahl an Immunzellen, unter anderem an B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten.^[66] Auch hier könnte ein Zusammenhang zwischen der NCALD Proteinexpression und Immunzellen bestehen. Die NCALD Stromaexpression war im Gegensatz zur NCALD Expression in Tumorzellen nicht signifikant mit dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben assoziiert. Eine Erklärung hierfür könnte die ungleiche Verteilung zwischen der NCALD Stromaexpression und keiner Stromaexpression (OS: 25 vs. 75; RFS: 25 vs. 73) sein. Auch könnte es sein, dass die geringe Anzahl an Geweben mit Stromaexpression kein repräsentatives Bild darstellt. Weitere Untersuchungen zur NCALD Stromaexpression sind daher notwendig.

Eine weitere Hypothese, wie NCALD an einer spezifischen Cisplatinresistenz beteiligt sein könnte, stellt die Endozytose dar. Riessland *et al.* vermuteten, dass NCALD als calciumabhängiger Regulator der Endozytose fungiert.^[40] Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass Ivings *et al.* eine direkte Wechselwirkung NCALDs mit Clathrin und Actin postuliert.^[38] NCALD könnte Einfluss auf Clathrin-beschichteten Vesikeln haben.^[38] Somit wäre denkbar, dass NCALD beispielsweise über Clathrin-vermittelte Endozytose die Aufnahme von Cisplatin in Tumorzellen begünstigt und so zu einem besseren Ansprechen der Therapie führt. Diese Hypothese muss jedoch erst in weiteren Analysen untersucht werden.

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass NCALD einen unabhängigen, prognostischen Biomarker für das Ovarialkarzinom darstellen könnte. Um diesen Zusammenhang zu bestätigen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen zum Einfluss NCALDs auf das Patientenüberleben in einem größeren Ovarialkarzinomkollektiv. Zu NCALDs physiologischem Einfluss gibt es nur wenige Studien. Dieser könnte in

zukünftigen Untersuchungen beispielsweise über weitere tumorbiologische Assays (beispielsweise Migrations- oder Apoptoseassay) erforscht werden.

Die vorliegende Arbeit stellt einen ersten Hinweis dar, dass NCALD nicht nur als prognostischer, sondern auch als therapierelevanter Biomarker für das Ansprechen Platin-basierter Chemotherapie beim Ovarialkarzinom verwendet werden könnte. Um diese Hypothese zu bestätigen, bedarf es weiterer Studien in einem größeren Kollektiv. Dabei ist vor allem eine größere Gruppe an Patientinnen, welche nur mit Paclitaxel behandelt wurden, notwendig. Ebenfalls wäre es wichtig herauszufinden, wie sich NCALD auf das Ansprechen weiterer, für das Ovarialkarzinom relevanter Chemotherapeutika (z.B. Olaparib, Gemcitabin, pegyliertem liposomalem Doxorubicin^{[17],[20]}) auswirkt. So könnte ermittelt werden, ob NCALD ausschließlich an einer Resistenz gegenüber Cisplatin beteiligt ist.

Ein weiterer Anhaltspunkt für zukünftige Studien könnten Analysen zur NCALD Expression in weiteren Tumorentitäten darstellen. Diese Studien könnten zeigen, ob es sich bei NCALD um einen für das Ovarialkarzinom spezifischen Biomarker handelt. Ebenfalls wäre es interessant, NCALDs Einfluss auf platinhaltige Chemotherapie in weiteren Tumorentitäten (z.B. nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom^[41]) zu analysieren.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ALAS1	δ -Aminolävulinatsynthase 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
BSA	Rinderserumalbumin
CA125	Cancer antigen 125
cDNA	komplementäre DNA
CI	Konfidenzintervall
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat Dihydrat
FBS	Fetales Kälberserum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
HE4	Human epididymis protein 4
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HR	Hazard Ratio
HRP	Meerrettichperoxidase
IHC	Immunhistochemie
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCALD	Neurocalcin δ
OS	Gesamtüberleben
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RFS	rezidivfreies Überleben
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin RNA
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMA	Tissue Microarray
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

6.2 Tabellenverzeichnis

1.1	FIGO und TNM-Stadien des Ovarialkarzinoms (nach Zeppernick und Meinhold-Heerlein). ^[7]	6
3.1	Liste der verwendeten Chemikalien.....	15
3.2	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	17
3.3	Liste der verwendeten Kits.....	18
3.4	Liste der verwendeten Antikörper. IHC: Immunhistochemie, WB: Western Blot.....	19
3.5	Liste der verwendeten Geräte.....	19
3.6	Liste der verwendeten Software.....	21
3.7	Klinische Charakteristika des immunhistochemischen Patientenkollektivs.....	22
3.8	Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Agarosegelelektrophorese.....	24
3.9	Liste der verwendeten TaqMan®-Reagenzien.....	25
3.10	Zusammensetzung des Mastermixes.....	26
3.11	TaqMan®-qPCR Temperaturprogramm.....	26
3.12	Liste der verwendeten Puffer für immunhistochemische Färbungen.....	28
3.13	Bewertungsskala zur semi-quantitativen Bewertung immunhistochemischer Färbungen.....	28
3.14	Zusammensetzung des Zellkulturmediums.....	30
3.15	Zusammensetzung eines Mykoplasmen-PCR Ansatzes.....	31
3.16	Temperaturprogramm der Mykoplasmen-PCR.....	31
3.17	Verwendete Transferplasmide zum NCALD-Knockdown.....	32
3.18	Verwendete Plasmide zur Erstellung der Virionen.....	33
3.19	Sequenzen der verwendeten shRNAs.....	34
3.20	Zusammensetzung des Lysepuffers.....	36
3.21	Zusammensetzung des 1X TBST-Puffers (pH 8,5).....	37
3.22	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels. Angaben stehen für jeweils zwei Gele.....	38
3.23	Zusammensetzung der in der SDS-PAGE und Western Blot verwendeten Puffer.....	39
3.24	Verwendete Antikörper, deren Verdünnungen und Inkubationsbedingungen.....	39
4.1	Ergebnis der immunhistochemischen NCALD-Analysen in 102 Ovarialkarzinomen.....	49
4.2	Assoziation zwischen niedriger und hoher NCALD Proteinexpression und verschiedenen klinischen Parametern, berechnet anhand des exakten Fisher-Tests, bzw. χ^2 -Tests.....	51
4.3	Auswirkung der klinischen Parameter und der NCALD Expression der Ovarialkarzinomzellen auf das Gesamtüberleben (OS), analysiert mittels uni- und multivariater Cox-Regressionsanalysen (n=102).....	54
4.4	Auswirkung der klinischen Parameter und der NCALD Expression der Ovarialkarzinomzellen auf das rezidivfreie Überleben (RFS), analysiert mittels uni- und multivariater Cox-Regressionsanalysen (n=100).....	55

4.5 Assoziation zwischen NCALD Stromaexpression und NCALD Tumorzellexpression, sowie
verschiedenen klinischen Parametern.....58

6.3 Abbildungsverzeichnis

4.1	Darstellung der durch quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) erhaltenen, relativen <i>NCALD</i> mRNA-Expressionslevel von 31 Ovarialkarzinomgewebsproben.....	43
4.2	Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen den Microarray-basierten <i>NCALD</i> Genexpressionsdaten und den entsprechenden auf qPCR-basierenden <i>NCALD</i> mRNA-Daten in Ovarialkarzinomproben (n = 31).....	44
4.3	Darstellung der durch qPCR erhaltenen, relativen <i>NCALD</i> mRNA-Expressionslevel von 31 Ovarialkarzinomgewebsproben, sortiert nach ihrer Expressionsstärke von niedrig zu hoch.....	45
4.4	Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Anhängigkeit des Cut-off-Wertes 2,24 für das kumulative Gesamtüberleben (links) und kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) des durch qPCR analysierten Teilkollektivs (n = 31).....	46
4.5	<i>NCALD</i> -abhängige Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das kumulative Gesamtüberleben (links) und kumulatives rezidivfreie Überleben (rechts) basierend auf Microarray-Datensätzen von Ovarialkarzinomkollektiven (OS: n = 547, RFS: n = 467), erstellt mithilfe des Biomarker-Assessment Tools <i>KM-Plotter</i> , Stand: 16.05.2018. ^[48]	48
4.6	Immunhistochemische Detektion der <i>NCALD</i> Expression in Ovarialkarzinom Tissue Microarrays...50	
4.7	Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Anhängigkeit der <i>NCALD</i> Proteinexpression für das kumulative Gesamtüberleben (links) und kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) des mittels immunhistochemische Analysen untersuchten Ovarialkarzinomkollektivs (n = 102).....	53
4.8	Immunhistochemische Detektion der <i>NCALD</i> Expression in Ovarialkarzinom Tissue Microarrays...57	
4.9	Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Anhängigkeit der <i>NCALD</i> Stromaexpression für das kumulative Gesamtüberleben (links) und kumulative rezidivfreie Überleben (rechts) des immunhistochemisch untersuchten Ovarialkarzinomkollektivs (n = 100).....	59
4.10	Immunhistochemische Detektion der <i>NCALD</i> Expression in Tonsillengewebe, welches als interne Kontrolle für Ovarialkarzinom-TMAs verwendet wurde.....	60
4.11	Darstellung der durch qPCR erhaltenen, relativen <i>NCALD</i> mRNA-Expressionslevel.....	61
4.12	Darstellung der durch qPCR erhaltenen, relativen <i>NCALD</i> mRNA-Expressionslevel.....	62
4.13	Darstellung der durch qPCR erhaltenen, relativen <i>NCALD</i> mRNA-Expressionslevel.....	63
4.14	Detektion der <i>NCALD</i> Proteinexpression in der Kontrollzelle sh-NT und den beiden Knock-down-Zelllinien sh- <i>NCALD</i> #1 und sh- <i>NCALD</i> #2.....	64
4.15	Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Zunahme der Zellviabilität der Knock-down-Zelllinien (sh- <i>NCALD</i> #1 und sh- <i>NCALD</i> #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) über einen Zeitraum von 96 h.....	65
4.16	Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Abnahme der Zellviabilität der Knock-down-Zelllinien (sh- <i>NCALD</i> #1 und sh- <i>NCALD</i> #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) nach Cisplatin-Behandlung (1,0 µg/ml) über einen Zeitraum von 96 h.....	67

6 Verzeichnisse

4.17 Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Abnahme der Zellviabilität der Knock-down-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) nach Cisplatin-Behandlung (1,5 µg/ml) über einen Zeitraum von 96 h.....	68
4.18 Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Abnahme der Zellviabilität der Knock-down-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) nach Paclitaxel-Behandlung (5,0 ng/ml) über einen Zeitraum von 96 h.....	69
4.19 Darstellung der durch MTT-Assays erhaltenen, relativen Abnahme der Zellviabilität der Knock-down-Zelllinien (sh-NCALD #1 und sh-NCALD #2) sowie der Kontrolle (sh-NT) nach Paclitaxel-Behandlung (7,0 ng/ml) über einen Zeitraum von 96 h.....	70
4.20 Darstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Anhängigkeit der NCALD Proteinexpression für das kumulative Gesamtüberleben des mittels immunhistochemischen Analysen untersuchten Ovarialkarzinomkollektivs aufgeteilt nach Art der Chemotherapie: Platin-Monotherapie (links, n = 50) und Platin-Taxol-Kombinationstherapie (rechts, n = 45).....	71

6.4 Literaturverzeichnis

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal, *CA Cancer J Clin* **2017**, *67*, 7-30.
- [2] Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., in *Krebs in Deutschland für 2015/2016, Vol. 12*, Robert-Koch-Institut, Berlin, **2019**.
- [3] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, T. Dyba, G. Randi, M. Bettio, A. Gavin, O. Visser, F. Bray, *Eur J Cancer* **2018**, *103*, 356-387.
- [4] B. Schmalfeldt, in *Manual Maligne Ovarialtumoren, Vol. 10*, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, **2014**.
- [5] B. M. Reid, J. B. Permuth, T. A. Sellers, *Cancer Biol Med* **2017**, *14*, 9-32.
- [6] E. Ricciardi, T. Baert, B. Ataseven, F. Heitz, S. Prader, M. Bommert, S. Schneider, A. du Bois, P. Harter, *Geburtshilfe Frauenheilkd* **2018**, *78*, 972-976.
- [7] F. Zeppernick, I. Meinhold-Heerlein, *Arch Gynecol Obstet* **2014**, *290*, 839-842.
- [8] M. Daly, G. I. Orams, *Semin Oncol* **1998**, *25*, 255-264.
- [9] C. Le Page, D. G. Huntsman, D. M. Provencher, A. M. Mes-Masson, *Cancers (Basel)* **2010**, *2*, 913-954.
- [10] N. Lalwani, S. R. Prasad, R. Vikram, A. K. Shanbhogue, P. C. Huettner, N. Fasih, *Radiographics* **2011**, *31*, 625-646.
- [11] S. Lheureux, C. Gourley, I. Vergote, A. M. Oza, *Lancet* **2019**, *393*, 1240-1253.
- [12] A. du Bois, A. Reuss, E. Pujade-Lauraine, P. Harter, I. Ray-Coquard, J. Pfisterer, *Cancer* **2009**, *115*, 1234-1244.
- [13] L. R. Boyd, F. M. Muggia, *Oncology (Williston Park)* **2018**, *32*, 418-420, 422-414.
- [14] R. E. O'Cearbhaill, *Oncology (Williston Park)* **2018**, *32*, 339-343.
- [15] C. Stewart, C. Ralyea, S. Lockwood, *Semin Oncol Nurs* **2019**, *35*, 151-156.
- [16] A. Mullard, *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, *13*, 877.
- [17] J. A. Ledermann, E. Pujade-Lauraine, *Ther Adv Med Oncol* **2019**, *11*, 1758835919849753.
- [18] A. Kim, Y. Ueda, T. Naka, T. Enomoto, *J Exp Clin Cancer Res* **2012**, *31*, 14.
- [19] J. Y. Kim, C. H. Cho, H. S. Song, *Korean J Intern Med* **2017**, *32*, 798-804.

-
- [20] G. C. Jayson, E. C. Kohn, H. C. Kitchener, J. A. Ledermann, *Lancet* **2014**, *384*, 1376-1388.
- [21] L. Wu, X. Qu, *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 2963-2997.
- [22] C. L. Sawyers, *Nature* **2008**, *452*, 548-552.
- [23] J. K. Aronson, R. E. Ferner, *Curr Protoc Pharmacol* **2017**, *76*, 9 23 21-29 23 17.
- [24] S. Sharma, *Indian J Med Paediatr Oncol* **2009**, *30*, 1-8.
- [25] L. Y. Feng, L. Li, *J Ovarian Res* **2020**, *13*, 35.
- [26] C. Dong, F. Yin, D. Zhu, X. Cai, C. Chen, X. Liu, *J Cell Biochem* **2020**, *121*, 4470-4483.
- [27] R. C. Bast, Jr., M. Feeney, H. Lazarus, L. M. Nadler, R. B. Colvin, R. C. Knapp, *J Clin Invest* **1981**, *68*, 1331-1337.
- [28] R. G. Moore, A. K. Brown, M. C. Miller, S. Skates, W. J. Allard, T. Verch, M. Steinhoff, G. Messerlian, P. DiSilvestro, C. O. Granai, R. C. Bast, Jr., *Gynecol Oncol* **2008**, *108*, 402-408.
- [29] W. L. Yang, Z. Lu, R. C. Bast, Jr., *Expert Rev Mol Diagn* **2017**, *17*, 577-591.
- [30] E. Kobayashi, Y. Ueda, S. Matsuzaki, T. Yokoyama, T. Kimura, K. Yoshino, M. Fujita, T. Kimura, T. Enomoto, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2012**, *21*, 1902-1912.
- [31] V. Dochez, H. Caillon, E. Vaucel, J. Dimet, N. Winer, G. Ducarme, *J Ovarian Res* **2019**, *12*, 28.
- [32] R. Drapkin, H. H. von Horsten, Y. Lin, S. C. Mok, C. P. Crum, W. R. Welch, J. L. Hecht, *Cancer Res* **2005**, *65*, 2162-2169.
- [33] A. Chudecka-Glaz, I. Rzepka-Gorska, I. Wojciechowska, *Eur J Gynaecol Oncol* **2012**, *33*, 382-390.
- [34] J. M. Escudero, J. M. Auge, X. Filella, A. Torne, J. Pahisa, R. Molina, *Clin Chem* **2011**, *57*, 1534-1544.
- [35] S. Vijay-Kumar, V. D. Kumar, *Nat Struct Biol* **1999**, *6*, 80-88.
- [36] S. Zozulya, L. Stryer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 11569-11573.
- [37] W. Wang, Z. Zhou, W. Zhao, Y. Huang, R. Tang, K. Ying, Y. Xie, Y. Mao, *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1518*, 162-167.
- [38] L. Ivings, S. R. Pennington, R. Jenkins, J. L. Weiss, R. D. Burgoyne, *Biochem J* **2002**, *363*, 599-608.
-

- [39] M. Kamiyama, M. Kobayashi, S. Araki, A. Iida, T. Tsunoda, K. Kawai, M. Imanishi, M. Nomura, T. Babazono, Y. Iwamoto, A. Kashiwagi, K. Kaku, R. Kawamori, D. P. Ng, T. Hansen, P. Gaede, O. Pedersen, Y. Nakamura, S. Maeda, *Hum Genet* **2007**, *122*, 397-407.
- [40] M. Riessland, A. Kaczmarek, S. Schneider, K. J. Swoboda, H. Lohr, C. Bradler, V. Grysco, M. Dimitriadi, S. Hosseinibarkooie, L. Torres-Benito, M. Peters, A. Upadhyay, N. Biglari, S. Krober, I. Holker, L. Garbes, C. Gilissen, A. Hoischen, G. Nurnberg, P. Nurnberg, M. Walter, F. Rigo, C. F. Bennett, M. J. Kye, A. C. Hart, M. Hammerschmidt, P. Kloppenburg, B. Wirth, *Am J Hum Genet* **2017**, *100*, 297-315.
- [41] X. Shi, C. Ma, Q. Zhu, D. Yuan, M. Sun, X. Gu, G. Wu, T. Lv, Y. Song, *Oncotarget* **2016**, *7*, 25558-25575.
- [42] H. S. Isaksson, B. Sorbe, T. K. Nilsson, *Oncotarget* **2014**, *5*, 4040-4049.
- [43] J. Volkmann, U. Reuning, M. Rudelius, N. Hafner, T. Schuster, V. R. A. Becker, J. Weimer, F. Hilpert, M. Kiechle, M. Durst, N. Arnold, B. Schmalfeldt, A. Meindl, J. Ramser, *Int J Cancer* **2013**, *132*, 2820-2832.
- [44] RNeasy Lipid Tissue Handbook, Qiagen, **2009**.
- [45] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, dritte Auflage (Kapitel 7)*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2001**.
- [46] TaqMan Gene Expression Assays Protocol, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, **2010**.
- [47] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, *Methods* **2001**, *25*, 402-408.
- [48] B. Gyorffy, A. Lanczky, Z. Szallasi, *Endocr Relat Cancer* **2012**, *19*, 197-208.
- [49] R. N. Buick, R. Pullano, J. M. Trent, *Cancer Res* **1985**, *45*, 3668-3676.
- [50] R. B. DuBridge, P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, M. P. Calos, *Mol Cell Biol* **1987**, *7*, 379-387.
- [51] N. Manjunath, H. Wu, S. Subramanya, P. Shankar, *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, *61*, 732-745.
- [52] RNeasy Mini Handbook, Qiagen, **2012**.
- [53] T. Mosmann, *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- [54] N. Duftner, J. Larkins-Ford, M. Legendre, H. A. Hofmann, *Genomics* **2008**, *91*, 108-117.
- [55] W. J. Youden, *Cancer* **1950**, *3*, 32-35.
- [56] E. L. Kaplan, P. Meier, *Journal of the American Statistical Association* **1958**, *53*, 457-481.
-

- [57] I. Meinhold-Heerlein, K. Borges-Engeby, U. Grönn, D. Bauerschlag, N. Maass, C. Mundhenke, W. Jonat, T. Bauknecht, *Geburtsh Frauenheilk* **2005**, *65*, 1064-1073.
- [58] C. Vogel, E. M. Marcotte, *Nat Rev Genet* **2012**, *13*, 227-232.
- [59] R. Vang, M. Shih Ie, R. J. Kurman, *Adv Anat Pathol* **2009**, *16*, 267-282.
- [60] L. C. Chang, C. F. Huang, M. S. Lai, L. J. Shen, F. L. Wu, W. F. Cheng, *PLoS One* **2018**, *13*, e0194993.
- [61] Y. Song, W. Zhang, X. He, X. Liu, P. Yang, J. Wang, K. Hu, W. Liu, X. Zhang, H. Jing, X. Yuan, *J Transl Med* **2019**, *17*, 166.
- [62] L. Galluzzi, I. Vitale, J. Michels, C. Brenner, G. Szabadkai, A. Harel-Bellan, M. Castedo, G. Kroemer, *Cell Death Dis* **2014**, *5*, e1257.
- [63] L. Kelland, *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 573-584.
- [64] D. W. Shen, L. M. Pouliot, M. D. Hall, M. M. Gottesman, *Pharmacol Rev* **2012**, *64*, 706-721.
- [65] C. D. Allen, T. Okada, J. G. Cyster, *Immunity* **2007**, *27*, 190-202.
- [66] Z. Werb, P. Lu, *Cancer J* **2015**, *21*, 250-253.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Michael Groll für die offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Chemie. Bereits während meines Masterstudiums stärkte und förderte er mein Interesse an der biomedizinischen Forschung. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Juliane Ramser für die interessante Themenstellung, die exzellente wissenschaftliche Betreuung während allen Phasen meiner Promotion und ihr großes Engagement bedanken. Auch bedanke ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen, welches es mir ermöglichte, selbstständig und eigenverantwortlich zu arbeiten.

Mein großer Dank gilt Frau PD Dr. Anne Quante für die herausragende Betreuung und Unterstützung während der letzten Phase meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für die hilfreichen fachlichen Anregungen und die tatkräftige Förderung.

Frau Prof. Dr. Marion Kiechle danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde des Klinikums rechts der Isar durchzuführen. Herrn Prof. Dr. Alfons Meindl danke ich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Gynäkologische Tumorgenetik“.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kooperationspartnern: Prof. Dr. Achim Krüger und Frau Katja Honert danke ich sehr für die Hilfe und Betreuung bei der Erstellung der stabilen Knockdown-Zelllinien. Frau Dr. Kristina Schwamborn und Frau Daniela Hellmann gilt mein großer Dank für die Auswertung und Beratung bei den immunhistochemischen Färbungen.

Von ganzen Herzen möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Gynäkologischen Tumorgenetik bedanken. Besonders bedanke ich mich bei Frau Stefanie Engert, Frau Heide Hellebrand, Frau Kathrin Holz, Herrn Andre Kis,

Danksagung

Frau Ana Brkić und Herrn Marko Bertone für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die guten Gespräche und die motivierenden Espressopausen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Theresa Brunet für die schöne gemeinsame Laborzeit bedanken. Danke dafür, dass du immer für mich da warst, auch außerhalb des Labors.

Für das mühevollen und zeitaufwendige Korrekturlesen bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Carolin Grotz, Herrn Dr. David Goričanec, Frau Kristin Ofer, Frau Jennifer Šebena und Herrn Daniel Šebena.

Zum Schluss geht mein großer Dank an meine gesamte Familie sowie meine Freunde: Meinen Eltern und André danke ich für die große Unterstützung während der gesamten Zeit. Meinen Freunden, vor allem Kristin Ofer, Carolin Grotz, Jenny und Daniel Šebena, danke ich für die Ausflüge, Urlaube, Weinabende und schönen Gespräche, die mir den nötigen Ausgleich gegeben haben. Danke, dass ihr für mich da seid.

David Goričanec danke ich für seine uneingeschränkte Unterstützung in allen Situationen, seinen Rückhalt und seine Geduld. Danke, dass du seit über 11 Jahren an meiner Seite bist. Ljubim-te moj najdraži.

Veröffentlichungen

Sarah Konrad, Kristina Schwamborn, Daniela Hellmann, Achim Krüger, Alfons Meindl, Juliane Ramser (2017): *A specific neuronal calcium sensor protein as potential predictive biomarker for ovarian cancer therapy*. Posterbeitrag, 25th World Cancer Conference 2017 (ausgezeichnet mit dem "Best Poster Award")

Publikation in Bearbeitung:

Sarah Konrad, Kristina Schwamborn, Daniela Hellmann, Achim Krüger, Marion Kiechle, Alfons Meindl, Juliane Ramser: *Neurocalcin δ as potential predictive biomarker for ovarian cancer therapy*.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche verwendete Quellen und Hilfsmittel sind im Literaturverzeichnis aufgelistet.

München, Oktober 2020