

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Direktor: Prof. Dr. Nicolai Maass
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung der Genexpression von *ACTN3*, *HOOK2*,
BRCA1 und *BRCA2* im sporadischen Ovarialkarzinom unter
Berücksichtigung klinischer Parameter**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Carolin Knolle, geb. Köhlmoos
aus Achim

Kiel 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Arnold

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung: 10. August 2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21. April 2022

gez.: Priv.-Doz. Dr. André Farrokh

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Risikofaktoren	1
1.3 Ätiologie	2
1.4 Histologie	3
1.5 Tumorklassifikation Ovarialkarzinom nach TNM und FIGO	4
1.6 Klinik	5
1.6.1 Diagnostik	5
1.6.2 Therapie	6
1.6.3 Metastasierung und Rezidiv	6
1.6.4 Prognose	7
1.7 Genetische Prädisposition / Untersuchte Gene	8
1.7.1 Bedeutung und Funktion von <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	8
1.7.2 Bedeutung und Funktion von <i>HOOX2</i> und <i>ACTN3</i>	9
1.8 Ziel der Arbeit	10
2 Methoden	11
2.1 Beschreibung Patientenkollektiv	11
2.2 Probenmaterial	11
2.3 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)	12
2.3.1 Reverse Transkriptase-PCR	14
2.3.2 Real-Time PCR	15
2.4 mRNA-Gewinnung	15

2.4.1 Ablauf der mRNA-Gewinnung aus Tumorgewebe	16
2.4.2 Überprüfung der Reinheit und Konzentrationsbestimmung der mRNA	17
2.5 Herstellung der cDNA.....	17
2.6 Herstellung der Primer aliquots für die Real-Time PCR	18
2.7 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR	19
2.7.1 Analyse der Eignung der Referenzgene für die Normalisierung.....	19
2.7.2 Verwendung eines Kalibrators	20
2.7.3 Erstellung von Standardkurven	20
2.7.4 Konzeption der Analyseplatte für den Light Cycler.....	22
2.7.5 Genexpressionsanalyse im Thermocycler	22
2.8 Statistische Methoden	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Patientinnendaten	25
3.2 Genexpressionsanalysen	29
3.2.1 Klassifizierung der Genexpression.....	29
3.2.2 Korrelation der Expression der Gene untereinander	31
3.3 Korrelation der Genexpression mit klinischen Parametern.....	33
3.3.1 Genexpression nach Histologie.....	33
3.3.2 Korrelationsanalyse zwischen <i>BRCA1</i> und klinischen Daten	34
3.3.3 Korrelationsanalyse zwischen <i>BRCA 2</i> und klinischen Daten	35
3.3.4 Korrelationsanalyse zwischen <i>HOOK2</i> und klinischen Daten	36
3.3.5 Korrelationsanalyse zwischen <i>ACTN3</i> und klinischen Daten	37
4 Diskussion	39
5 Zusammenfassung	44
6 Literaturverzeichnis	46
7 Danksagung	50
8 Akademischer Lebenslauf	51
9 Veröffentlichung.....	51

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Mechanismus der PCR, vereinfachte Darstellung	12
Abb. 2	Mechanismus der RT-PCR; vereinfachte Darstellung	14
Abb. 3	Vereinfachte Darstellung einer Real-Time PCR	22
Abb. 4	Einteilung der Genexpression in Perzentilen mittels Box Plot	30
Abb. 5	Spearman's Rangkorrelation <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	31
Abb. 6	Spearman's Rangkorrelation <i>BRCA1</i> und <i>ACTN3</i>	32
Abb. 7	Korrelationsgraphik <i>BRCA1</i> und Alter bei ED.....	35
Abb. 8	Korrelationsgraphik <i>ACTN3</i> und Alter bei ED	37

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Histologische Einteilung des Ovarialkarzinoms	3
Tab. 2	TNM/ FIGO Klassifikation des Ovarialkarzinoms	4
Tab. 3	Einteilung Rezidiv	7
Tab. 4	Reaktionsansatz für quant. Real-Time PCR	23
Tab. 5	PCR Programm Thermocycler.....	23
Tab. 6	Auswertung der Patientinnendaten	26
Tab. 7	Einteilung in low, intermediate, high expression	30
Tab. 8	Genexpression nach histologischem Subtyp	33
Tab. 9	Spearman's Rangkorrelation <i>BRCA1</i> mit klinischen Daten	34
Tab. 10	Spearman's Rangkorrelation <i>BRCA2</i> und klinische Daten	36
Tab. 11	Spearman's Rangkorrelation <i>HOOK2</i> und klinische Daten	36
Tab. 12	Spearman's Rangkorrelation <i>ACTN3</i> und klinische Daten	38

Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body-Mass-Index
BRCA1	Breast Cancer Susceptibility Gene-1
BRCA2	Breast Cancer Susceptibility Gene-2
CA-125	Cancer Antigen 125
cDNA	komplementäre DNA
CT	Computer Tomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribose-Nucleotidtriphosphat
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G1	Tumorzelle ist gut differenziert
G2	Tumorzelle ist mäßig differenziert
G3	Tumorzelle ist schlecht differenziert
gDNA	genomische DNA
HGSOC	high grade serous ovarian cancer
HNPCC	Hereditäres Nicht Polypöses Kolonkarzinom
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm
OvCA	Ovarialkarzinom

PARP Inhibitor	3-Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)- Inhibitor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PFI	progression free intervall
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaktion
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
WHO	World Health Organisation / Weltgesundheitsorganisation
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten (Robert Koch-Institut)

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom (ICD-10 C56) stellt, nach dem Endometriumkarzinom, unter den gynäkologischen Genitaltumoren die zweithäufigste Todesursache der Frau in Deutschland dar. Durchschnittlich erkrankt eine von 75 Frauen in ihrem Leben an einem Ovarialkarzinom. Dem Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Institutes werden jährlich mehr als 7000 Neuerkrankungen an einem bösartigen Tumor der Eierstöcke gemeldet. Im Durchschnitt sterben pro Jahr 5400 Frauen an den Folgen eines Ovarialkarzinoms (Buttmann-Schweiger and Kraywinkel, 2019).

Die WHO berichtet von 295 414 Neuerkrankungen und 184 799 Todesfällen im Jahr 2018 (Bray et al., 2018).

1.2 Risikofaktoren

Das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter. So liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 68 Jahren, bei steigender Inzidenz bis zum 85. Lebensjahr. Wie auch bei anderen gynäkologischen Tumoren gelten Übergewicht, Hormonersatztherapie und Nulliparität als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms (Kölbl and Bartl, 2020), (Wagner and Reuß, 2019). Die Datenlage zur Bedeutung einer frühen Menarche und/oder einer späten Menopause ist bisher nicht eindeutig. Die Relevanz genetisch unabhängiger Risikofaktoren für die Entwicklung eines Ovarialkarzinom zeigt sich dadurch, dass durch Migration aus einer Region mit niedrigerer Inzidenz in eine Region mit einer höheren Inzidenz auch das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, steigt (Brett M. et al., 2017).

Als protektive Faktoren gelten, je nach histologischem Subtyp, u.a. die bilaterale Salpingo-Oophorektomie (Daly, 2010) Hysterektomie und Tubenligation sowie die langjährige Einnahme oraler Kontrazeptiva (Cibula et al., 2011). Auch Laktationsphasen von mehr als zwölf Monaten (Babic et al., 2020), und Parität (Brett M. et al., 2017) konnten jeweils einen protektiven Effekt zeigen. Beides unterstützt

damit die Hypothese zur Auswirkung endogener Sexualhormone bei der Entwicklung eines Ovarialkarzinoms.

1.3 Ätiologie

Inzwischen wird davon ausgegangen, dass es nicht mehr das Ovaryepithel ist, das im Sinne einer Tumorgenese entartet und sich dann klassisch ausbreitet. Die unterschiedlichen histologischen Erscheinungsformen werden heute auch als voneinander unabhängige, eigenständige Entitäten eingestuft und gehen aus unterschiedlichen, teilweise extraovariellen Geweben hervor (Kurman and Shih, 2011). Basierend auf immunhistochemischen, molekularbiologischen und molekulargenetischen Erkenntnissen ist man dazu übergegangen, das Ovarialkarzinom in langsam wachsende (*low grade*) und schnell progrediente (*high grade*) Ovarialmalignome zu klassifizieren. Es hat sich auf molekulargenetischer Ebene gezeigt, dass sich bei den *low grade* Ovarialkarzinomen eher Mutationen im Bereich von KRAS und BRAF Kaskaden zeigen. Das *high grade* Ovarialkarzinom weist in den meisten Fällen Mutationen im Bereich von TP53 und auch BRCA in Form von klassischen Genmutation oder Methylierung der Promoterregion auf (Kurman and Shih, 2011).

Das seröse *high grade* Ovarialkarzinom ist der häufigste histologische Subtyp. Es wird davon ausgegangen, dass malignes Tubenepithel in das Deckepithel des Ovars integriert wird und ursächlich für das weitere neoplastische Geschehen ist. Dies würde auch den protektiven Effekt einer Salpingektomie oder Tubenligation erklären. Der Ursprung für den endometrioiden und klarzelligen Subtyp wird in einer retrograden Menstruation gesehen und auch mit dem Auftreten einer Endometriose assoziiert (Wallwiener et al., 2017).

Eine familiäre Häufung und ein früher Krankheitsbeginn geben dabei entscheidende Hinweise einer genetisch bedingten Krankheitsursache. So gehören Keimbahnmutationen im Bereich des BRCA1 und BRCA2 Gens, mit 10–15 % der Fälle, zu den häufigsten genetisch bedingten Ursachen für die Entwicklung eines Ovarial- und/oder Mammakarzinoms. Das HNPCC (hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom) ist ebenfalls mit dem Ovarialkarzinom assoziiert.

1.4 Histologie

Histologisch kann das Ovarialkarzinom grob in drei Subtypen je nach Ursprungszelltyp unterteilt werden. So kann der Tumor sowohl vom Epithel, vom Keimstrang-Stromagewebe als auch aus Keimzellen entstehen. In Industrienationen steht dabei mit über 90 % das vom epithelialen Gewebe ausgehende Ovarialkarzinom im Fokus (Brett M. et al., 2017).

Es werden dabei weitere Subtypen gemäß ihrer Histologie unterschieden: serös papillär (high and low grade), endometrioid, klarzellig und mucinös (Brett M. et al., 2017). Sogenannte Borderline-Tumoren stellen eine Besonderheit dar, die bei allen Subtypen auftreten können. Diese Tumoren zeichnen sich durch fehlendes invasives Wachstum bei gleichzeitiger Malignität der Zellen aus (Zheng et al., 2018). *Tabelle 1* stellt eine zusammenfassende Übersicht der histologischen Einteilung dar.

Tab. 1 Histologische Einteilung des Ovarialkarzinoms

Ursprungsgewebe	Häufigkeit (Industrieländer)	Subtypen
Epithel	> 90 %	High grade serös
		Low grade serös
		Endometrioid
		Klarzellig
		Mucinös
Keimstrang-Stroma	5-6 %	Granulosazelltumor
		Thekome
Keimzellen	2-3 %	Teratome
		Dysgerminome

1.5 Tumorklassifikation Ovarialkarzinom nach TNM und FIGO

Die *Tabelle 2* fasst die aktuelle Tumorklassifikation nach TNM- und FIGO-Stadium und zusammen.

Tab. 2 *TNM/ FIGO Klassifikation des Ovarialkarzinoms*

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt
T0		Kein Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
T1a	IA	Tumor unilateral Ovar oder Tube mit intakter Kapsel bzw. Serosa, Oberflächen tumorfrei, Spülzytologie negativ
T1b	IB	Bilateraler Tumorbefall der Ovarien oder Tuben bei intakter Kapsel bzw. intakter Serosa, Oberflächen tumorfrei, Spülzytologie negativ
T1c	IC	Tumorbefall einer oder beiden Ovarien bzw. Tuben mit Nachweis von:
T1c1	IC1	Iatrogene Ruptur der Kapsel (Ovar) oder Serosa (Tube)
T1c2	IC2	Ruptur der Kapsel oder der Serosa präoperativ oder Tumornachweis auch der Ovar- bzw. Tubenoberfläche
T1c3	IC3	Maligne Zellen im Aszites oder positive Spülzytologie
T2	II	Uni- oder bilateraler Tumorbefall des Ovars oder der Tube mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/ oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen ≤ 10 mm
N1b	IIIA1ii	Metastasen > 10 mm
T3a jedes N	IIIA2	Mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasierung; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	Iva	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und /oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

1.6 Klinik

Dieser Abschnitt dient der Erläuterung klinisch relevanter Punkte in Bezug auf Diagnose, Therapieoptionen, Rezidiv und Prognose des Ovarialkarzinoms.

1.6.1 Diagnostik

In den meisten Fällen wird das Ovarialkarzinom in einem bereits fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, da es im Regelfall erst durch verdrängendes Wachstum sowie Metastasierung symptomatisch wird. Ein typisches, wenngleich unspezifisches Symptom stellt hier die Umfangsvermehrung des Abdomens durch Aszitesbildung dar. Weitere Symptome sind gemäß AMWF Guidelines insbesondere bei Frauen ab dem fünften Lebensjahrzehnt Völlegefühl und Blähbauch, Zunahme der Miktionsfrequenz sowie unklare abdominelle Beschwerden (Wagner and Reuß, 2019).

Die transvaginale Sonographie bietet als flächendeckend verfügbare Methode weiterhin die erste Möglichkeit zur Diagnostik einer raumgreifenden Ovarpathologie. Im Mittelpunkt steht das operative Staging als weiterhin nicht zu ersetzender diagnostischer und auch prognostischer Schritt. Eine weitere Bildgebung erfolgt je nach Fragestellung mittels CT sowie ggf. MRT und PET. Das PET/CT steht mit einer Sensitivität von 90 % insbesondere in der Rezidivdiagnostik im Vordergrund, jedoch ohne belegten Vorteil für die Patientin (Gu et al., 2009).

Der Tumormarker CA-125 kann bei Vorliegen eines präoperativen Wertes in der Rezidivdiagnostik eingesetzt werden, führt aber nach aktueller Datenlage nicht zu einem verbesserten Outcome für die Patientinnen, sondern lediglich zu einer früheren Einleitung einer Therapie und wird daher auch in der aktuellen S3-Leitlinie nicht als Routineparameter empfohlen (Wagner and Reuß, 2019). Als Screeningparameter fehlt es dem CA-125 an Spezifität und Sensitivität, da er ebenso bei benignen Erkrankungen erhöht sein kann. Seit einiger Zeit besteht die Möglichkeit, HE4 (humanes Epididymis-Protein 4) in Kombination mit CA-125 für die Berechnung des sogenannten ROMA Index (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) mit deutlich erhöhter Sensitivität und Spezifität zu bestimmen (Wei et al., 2016).

1.6.2 Therapie

Weiterhin gilt das operative Staging mittels klassischer Längsschnittlaparotomie als prognostisch wichtigster erster therapeutischer Schritt. Hierbei wird das operative Vorgehen anhand der FIGO-Kriterien in eine Handlungsempfehlung für frühe und fortgeschrittene Ovarialkarzinome unterteilt. Der Tumorrest beeinflusst die Prognose maßgeblich und es wird – wenn operativ möglich – eine R0-Resektion, also eine komplette makroskopische Tumorentfernung, angestrebt. Im Anschluss erfolgt beim frühen Ovarialkarzinom eine platinbasierte Monotherapie, beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom eine Kombination eines Platin- und Taxanderivats (Wagner and Reuß, 2019). In der Regel werden aufgrund der Datenlage Carboplatin und Paclitaxel eingesetzt. Aufgrund der Fortschritte in der onkologischen Wirkstoffentwicklung wird auch hier konsequent an targeted therapies (zielgerichteten Wirkstoffen) gearbeitet. Einige von ihnen werden bereits mit positivem Ergebnis standardmäßig eingesetzt. Dazu gehören beispielsweise Bevacizumab als Angiogenesehemmstoff und der PARP-Inhibitor Olaparib. Letzterer wird z.B. beim rezidivierenden *BRCA*-positiven Ovarialkarzinom in Platinkombination eingesetzt. Neue Studien untersuchen aktuell die Wirkung von Olaparib als Monotherapie beim platin-sensitiven *BRCA*-positiven Rezidiv eines Ovarialkarzinoms (Penson et al., 2020). Auch eine sekundäre zyto reduktive Operation wird aktuell multizentrisch prospektiv im Rahmen der AGO-OVAR DESKTOP-III-Studie untersucht. Erste Ergebnisse weisen auf ein längeres Überleben hin (Pignata et al., 2017), (Margul et al., 2020).

1.6.3 Metastasierung und Rezidiv

Die peritoneale Aussaat, insbesondere im Bereich der Leber und des Zwerchfells sowie des Omentums und im Becken gelten als typische Metastasierungsorte. Auch eine Beteiligung der Pleura wird beobachtet (Berek et al., 2018).

Rezidive treten bei dreiviertel der Patientinnen auf, oftmals progredient unter laufender Therapie (Vargas-Hernández et al., 2014). Je nach Zeitpunkt des Rezidivs zum Endpunkt der ersten sechs Zyklen platinhaltiger Chemotherapie erfolgt die Einteilung in platinsensitive und platinrefraktäre Ovarialkarzinome (Wagner and

Reuß, 2019). *Tabelle 3* stellt die Unterteilung nach Platinsensitivität dar. Die intermediäre Untergruppe war zum Zeitpunkt der Auswahl der Patientinnen noch gängige Praxis. Heute gelten Rezidive ≥ 6 Monate als platinsensibel (Wallwiener et al., 2017).

Tab. 3 **Einteilung Rezidiv**

Zeit zum Rezidiv nach Platingabe (6 Zyklen)	Definition	Anteil (%)	Mediane Überlebenszeit
≥ 6 Monate	Platinsensibel	85–90	Variabel
< 6 Monate	Refraktär	10–15	10–12 Monate

1.6.4 Prognose

Trotz der intensiven Forschung gilt die Prognose des Ovarialkarzinoms, insbesondere aufgrund der späten Diagnosestellung, weiterhin als ungünstig. In den meisten Fällen wird das Karzinom erst in den Tumorstadien III und IV nach FIGO erkannt (Buttmann-Schweiger and Kraywinkel, 2019). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate betrug im Jahr 2016 laut ZfKD ca. 43 %. In den Stadien I und II lag die Überlebensrate noch bei 89 % bzw. 77 %.

Auch die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs ist mit einer medianen Dauer von 18–24 Monaten kurz (Ushijima, 2010). Weltweit stirbt laut Schätzung der FIGO eine von sechs Frauen innerhalb von drei Monaten nach Diagnosestellung (Urban et al., 2016).

1.7 Genetische Prädisposition / Untersuchte Gene

In den folgenden Abschnitten werden die Funktionen der in dieser Arbeit untersuchten Gene mit ihren physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften erläutert.

1.7.1 Bedeutung und Funktion von *BRCA1* und *BRCA2*

Die genetische Prädisposition für Brust – und Eierstockkrebs durch eine *BRCA1*-Mutation ist durch die Bekanntgabe der prophylaktischen bilateralen Mastektomie der amerikanischen Schauspielerin Angelina Jolie im Jahr 2013 bis in die Öffentlichkeit vorgedrungen. Entdeckt wurden *BRCA1* und *BRCA2* bereits 1994 und 1995 und werden seither intensiv untersucht.

Die beiden Gene *BRCA1* (Chromosom 17 (17q21)) und *BRCA2* (Chromosom 13 (13q12)) codieren für Proteine, die als Tumorsuppressoren in DNA-Reparaturmechanismen aktiv sind. Grundsätzlich muss eine Keimbahnmutation von einer somatischen Mutation unterschieden werden. Die klassisch erbliche *BRCA1/2*-Mutation ist bereits familiär angelegt. Sie wird autosomal dominant vererbt. Es handelt sich um eine Mutation, die in allen Zellen nachweisbar ist. Sie ist in 5–15 % ursächlich für das hereditäre Ovarialkarzinom (Ramus and Gayther, 2009). Trägerinnen einer *BRCA1*-Mutation haben ein kumulatives Risiko von 39 %, bis zum 69. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Bei *BRCA2* liegt das kumulative Risiko zwischen 11 und 22 % (Wagner and Reuß, 2019). Gemäß der aktuellen S3 Leitlinie sollte eine Beratung zur bilateralen Salpingo-Oophorektomie erfolgen. Diese Maßnahme sei bei nachweislicher Mutation mit einer Mortalitätssenkung und einer Risikoreduktion um 80–90 % die bisher effektivste Methode (Wagner and Reuß, 2019).

Somatische Mutationen entstehen im Laufe eines Lebens durch unterschiedliche Einflüsse. Diese Art der Genveränderungen kann mit einer veränderten Genexpression einhergehen und wird so z.B. beim sporadischen Ovarialkarzinom beobachtet. Ebenso spielen epigenetische Veränderungen eine Rolle. Bei ca. 50 % der Patientinnen mit sporadischem Ovarialkarzinom konnte eine veränderte *BRCA1*-Expression gezeigt werden (Sun et al., 2014). Eine reduzierte Genexpression von

BRCA1 führt zu einer verbesserten Platinsensitivität und einem längeren rezidivfreien Intervall (Quinn et al., 2007).

1.7.2 Bedeutung und Funktion von *HOOK2* und *ACTN3*

HOOK-Proteine und ihre Funktion im intrazellulären Transportgeschehen wurden erstmals 2001 von Walenta et al. beschrieben. Beim Menschen konnten bisher drei HOOK-Proteine identifiziert werden. Sie zeichnen sich durch eine konservierte N-terminale Domäne aus, die an den Mikrotubulusapparat bindet. Die Variabilität im Bereich der C-Domäne ermöglicht die spezifische Bindung von Organellen (Walenta et al., 2001). *HOOK2* wird ubiquitär exprimiert. Es codiert für ein Verbindungsprotein im Dynein-Dynactin-Komplex, und leistet einen entscheidenden Beitrag im Bereich des mikrotubulusgetriebenen intrazellulären Proteintransports sowie der Verankerung von Zellorganellen, insbesondere im Bereich des Zentrosoms (Dwivedi et al., 2019), (Szebenyi et al., 2007).

Bisher wurden vier Actinine (1–4) mit ihren unterschiedlichen Funktionen im menschlichen Organismus beschrieben (Murphy and Young, 2015). Alpha-Actinin-3 ist ein spezielles Verbindungsprotein. Seine Funktion steht im Zusammenhang mit der Muskelkontraktion. Actinine stabilisieren dabei die Actinfilamente der Muskulatur und sind insbesondere im Bereich der Z-Scheiben lokalisiert. In der Literatur wurde die Bedeutung von *ACTN3* maßgeblich in Bezug auf die Muskelkontraktilität und Leistungsfähigkeit von Sportlern untersucht und wird als „Gene for Speed“ beschrieben. Ca. 16 % der Bevölkerung sind homozygot für einen *ACTN3* Polymorphismus mit einem Nonsens-Proteinprodukt. Die Abwesenheit von alpha-Actinin-3 führt zu einem aeroben Muskelstoffwechsel, der mit größerer Ausdauer verbunden ist, während die Expression des Wildtyps mit Schnelligkeit assoziiert ist (Murphy and Young, 2015). Umfassende Untersuchungen zu *ACTN3* und Tumorgenese oder gar dem Ovarialkarzinom sind nicht publiziert.

Im Rahmen der Carcinogenesegrundlagenforschung wurden insbesondere bei schlecht differenzierten, rasch progredienten Ovarialkarzinomen unterschiedlichste chromosomale Veränderungen in Form unbalancierter Translokationen, zusätzlichen Anlagerungen genetischen Materials und Fusion von Genabschnitten beschrieben.

Onkes et al. (2013) hatte in der Ovariakarzinomzelllinie Skov-3 eine Fusion im Bereich der Chromosomen 19 und 11 ((der(19)t(11;19)(q13.2;p13.2)) darstellen können. Das Fusionsprotein bestand zu Teilen aus *HOOK2* und *ACTN3* mit unbekannter Funktionalität (Onkes et al., 2013).

1.8 Ziel der Arbeit

Vor dem Hintergrund der weiterhin fehlenden oder wenig spezifischen Screeningmethoden und der späten Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms ist jeder Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung und der klinischen Forschung wichtig.

Ziel dieser Arbeit war es, in einem ersten Schritt die Genexpression von *ACTN3*, *HOOK2*, *BRCA1* und *BRCA2* im Tumorgewebe zu untersuchen und diese dann im zweiten Schritt auf Zusammenhänge untereinander und auf Korrelationen mit den klinischen Parametern zu prüfen. *BRCA1* und *BRCA2* sind dabei prominente Vertreter der Tumorgenese des hereditären und auch des sporadischen Ovarialkarzinoms. *ACTN3* und *HOOK2* sind bisher in der Tumorgenese untypische Vertreter. Die beiden Gene waren bei Untersuchungen der SKOV-3-Zelllinie von Onkes et al. als Fusionsprodukt aufgefallen. In dieser Arbeit sollte darauf basierend, das Expressionsverhalten der unfusionierten Gene im sporadischen Ovarialkarzinom untersucht werden.

Eine zusätzliche weiterführende Untersuchung wurde von Wang et al. 2014 mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an 49 Tumorproben von sporadischen Ovarialkarzinomen durchgeführt. In dem untersuchten Kollektiv konnte zwar das o.g. Fusionsprodukt nicht reproduziert werden, jedoch zeigten sich unterschiedliche chromosomale Veränderungen im Bereich der Chromosomen 19 und 11 (Wang et al., 2014).

2 Methoden

2.1 Beschreibung Patientenkollektiv

Für die Untersuchung wurden zufällig 100 Patientinnen, die in den Jahren 1992 bis 2013 mit Verdacht auf Ovarialkarzinom in der Universitätsklinik operiert wurden und bei denen ausreichend Tumorgewebe vorhanden war, ausgewählt.

2.2 Probenmaterial

Die Tumorproben stammen aus den Jahren 1992 bis 2013. Das intraoperativ entnommene Tumormaterial wurde nach der histopathologischen Untersuchung durch das pathologische Institut der Universitätsklinik Kiel entsprechend der gängigen TNM/FIGO-Kriterien klassifiziert und bei - 80°C in Tanks in flüssigem Stickstoff gelagert. Einen Anteil des Tumorgewebes erhielt das onkologische Labor der Universitätsfrauenklinik Kiel für Forschungszwecke unter Einhaltung der jeweils geltenden datenschutzrechtlichen Vorgaben inklusive der Einhaltung der Vorgaben zur Patienteneinwilligung.

Die Patientendaten wurden im Rahmen vorheriger Arbeiten aus der Klinikdatenbank bzw. der jeweiligen Papierakte herausgesucht. Für die vorliegende Untersuchung sollten folgende Parameter dabei für die anschließende Korrelation mit den Expressionsdaten – soweit dokumentiert – herausgefiltert werden:

- Alter bei Erstdiagnose, Operationsdatum, Sterbedatum, postoperativer Überlebenszeitraum, Zeitraum bis zum Rezidiv
- FIGO-Stadium, Histologie, Grading
- CA-125, BMI, Angaben zum Befall des Peritoneums und zur Aszitesmenge
- Art der Chemotherapie, Platinsensibilität

2.3 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Aufarbeitung und Analyse der Gene erfolgte wiederkehrend mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (englisch polymerase chain reaction, PCR), deren Prinzip zunächst erklärt werden soll.

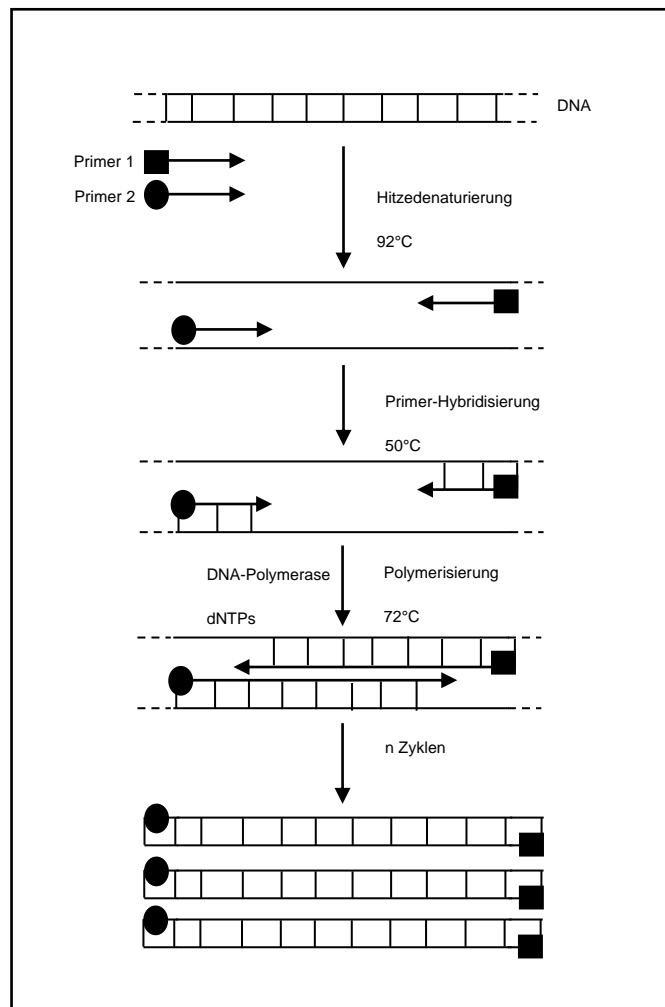


Abb. 1 Mechanismus der PCR, vereinfachte Darstellung

Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird durch Einwirkung von Wärme denaturiert. Im Rahmen der Primer-Hybridisierung lagern sich die komplementären Primerpaare an den DNA-Einzelstrang an. Mittels enzymatischer Einwirkung durch die DNA-Polymerase werden neue Nukleotide (dNTPs) angelagert und der Einzelstrang wird wieder zum Doppelstrang. Dieser Prozess wird n -fach wiederholt. Es kommt zur exponentiellen Vervielfältigung des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. (https://www.spektrum.de/lexika/images/bio/f7f5426_w.jpg zuletzt aufgerufen 14.11.2020)

Die Methode ist für die molekularbiologische Forschung so bedeutend, dass Kary Mullis im Jahr 1993 der Nobelpreis für die Entwicklung der PCR verliehen wurde. *Abbildung 1* stellt das Prinzip graphisch dar.

Die Methode ermöglicht die Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts. Es reichen kleinste DNA-Proben aus, um daraus mittels PCR eine analysierbare DNA-Menge zu generieren. Durch Temperatureinwirkung wird der DNA-Doppelstrang in seine beiden Einzelstränge denaturiert. Entscheidend für die Amplifikation ist das sogenannte Primerpaar. Primer sind für den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt speziell ausgewählte Oligonukleotide, die sich beim Abkühlen des Reaktionsgemisches an den gewünschten DNA-Abschnitt anlagern (Annealing) und so ein DNA-Primer-Hybrid bilden. Ausgehend von diesem nun doppelsträngigen DNA-Abschnitt werden durch das Enzym DNA-Polymerase weitere komplementäre Nukleotide angelagert, bis der DNA-Strang erneut komplett doppelsträngig vorliegt. Dieser Prozess wird n-fach wiederholt. Es kommt zur exponentiellen Vervielfältigung des DNA-Templates.

2.3.1 Reverse Transkriptase-PCR

Eine weitere Form der PCR ist die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR). Das Grundprinzip ist gleich. Im Unterschied zur klassischen PCR wird jedoch mit RNA statt mit DNA gearbeitet. Die Analyse der mRNA ermöglicht – wie in dieser Arbeit – u.a. die Untersuchung der Genexpression. Die mRNA muss unter Zugabe von Primern mittels Reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in komplementäre DNA umgeschrieben werden (cDNA). Diese entspricht in der Abfolge der Nukleotide dann der mRNA, ist aber für das weitere Arbeiten deutlich unempfindlicher und wird dann nach dem Prinzip der klassischen PCR amplifiziert. Der Ablauf ist schematisch in *Abbildung 2* dargestellt.

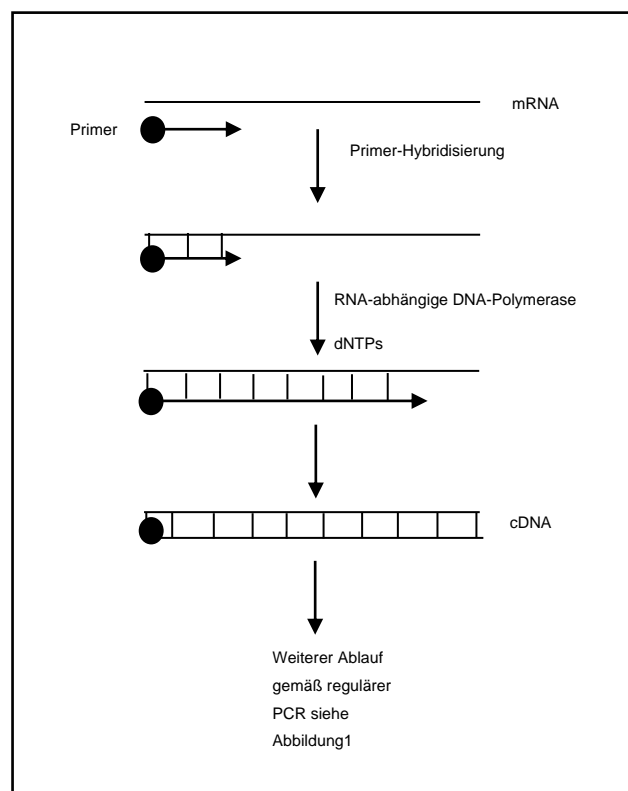


Abb. 2 Mechanismus der RT-PCR; vereinfachte Darstellung

Abbildung 2 stellt schematisch die Umwandlung der mRNA in cDNA dar. Entscheidend ist bei dieser PCR der Einsatz einer Reversen Transkriptase, einer sog. RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die in der Lage ist, RNA in DNA umzuschreiben. Das so entstandene cDNA Template kann dann im folgen Schritt analog zu dem in Abbildung 1 dargestellten PCR-Mechanismus n-fach exponentiell vervielfältigt werden. (basierend auf https://www.spektrum.de/lexika/images/bio/f7f5426_w.jpg zuletzt aufgerufen 14.11.2020)

2.3.2 Real-Time PCR

Das Prinzip der Real-Time PCR beruht ebenfalls auf der klassischen Polymerase Kettenreaktion. Diese besondere Methode ermöglicht eine quantitative Bestimmung des DNA-Abschnittes. Die Kombination der Real-Time PCT mit der RT-PCR erlaubt die quantitative Bestimmung von spezifischer mRNA und ist Grundlage für Genexpressionsanalysen, so auch in dieser Arbeit. Die quantitative Bestimmung wird mit Hilfe von Farbstoffen ermöglicht, die sich in doppelsträngige DNA einlagern (interkalieren). Ein Beispiel für einen fluoreszierenden interkalierenden Farbstoff ist das SYBR Green I. Je mehr doppelsträngige DNA durch die sich wiederholenden PCR-Zyklen entsteht, desto mehr SYBR-Green I lagert sich an und desto höher wird die Intensität der Fluoreszenz. Diese zunehmende Intensität wird gemessen und dient als Korrelat für die jeweilige Konzentration. Es ergeben sich zwei grundsätzliche Analysewege. Erstens die absolute Quantifikation und zweitens die relative Quantifikation. Im ersten Fall wird ein Produkt mit einer bekannten Konzentration in Relation gesetzt, sodass eine absolute Konzentrationsbestimmung erfolgen kann. Im Fall der relativen Quantifizierung gibt es kein Produkt mit bekannter absoluter Konzentration, sodass alle Expressionsdaten miteinander durch Verwendung von Referenzgenen und Standardkurven ins Verhältnis gesetzt werden müssen. Referenzgene zeichnen sich dabei durch eine konstante ubiquitäre Expression aus. In dieser Arbeit wurde *ACTB* als Referenzgen für die relative Quantifizierung eingesetzt.

2.4 mRNA-Gewinnung

Die mRNA stammt aus dem Tumorgewebe der Ovarialkarzinome der 100 ausgewählten Patientinnen. Die Tumorstücke wurden, direkt nach der operativen Entnahme und der anschließenden Begutachtung durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Kiel, in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Gewinnung der mRNA erfolgte mittels RNeasy Micro- bzw. RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen. Bei einigen Proben war die benötigte Menge an mRNA-Lösung für die weitere Analyse nicht ausreichend, da zunächst mit einem Kollektiv Vorproben zur Etablierung der Methode nötig waren. Daher mussten diese Proben mittels RNeasy Mini Kit gewonnen werden. Der Ablauf der mRNA-Gewinnung gestaltet sich bei beiden Kits

gleich, nur die Mengen der verwendeten Reagenzien waren für das Mini Kit höher und sind jeweils in Klammern hinter der geforderten Menge des RNeasy Micro Kits zu finden.

2.4.1 Ablauf der mRNA-Gewinnung aus Tumorgewebe

Direkt nach der Entnahme aus dem Stickstofftank wurde entsprechend den Anforderungen des Kits die Tumorprobe mittels steriler Pinzette in eine Petrischale überführt und dort ein Gewebestück mit einem Gewicht von maximal 5 mg (30 mg) mittels Einmalskalpell aus dem Tumorgewebe ausgeschnitten und sofort in eine mit 350 µl (600 µl) RLT-Puffer befüllte Lysing Matrix A Tube (Schreddertube) überführt. Im Anschluss erfolgte die Zerkleinerung der Gewebeprobe mittels Fast Prep FP 120. Dazu wurden drei Zerkleinerungszyklen über jeweils 45 Sekunden auf höchster Gerätestufe (6) durchgeführt. Die so zerkleinerten Tumorproben ruhten dann bei Raumtemperatur für zwei Minuten. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei RT und einer Geschwindigkeit von 13 200 rpm wurde der mRNA-enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte, gemäß der Beschreibung des verwendeten Kits, eine 1:1-Verdünnung mit 350 µl Ethanol (70 %) (700 µl) und das Aufbringen der Probe auf die im Kit enthaltene Säule (RNeasy MinElute), die in einem passenden Auffanggefäß platziert wurde. Die Eluation über die Säule erfolgte per Zentrifugation (15 s bei 10 000 rpm). Das Eluat selbst war zu verwerfen, da die mRNA an der Säule adsorbiert. Die finale Aufreinigung wurde protokollgemäß wie folgt durchgeführt:

- 1) Auswaschen der Säule von möglichen Verunreinigungen mittels 350 µl RW1 Puffer, der über 15 Sekunden bei 10 000 rpm über die Säule fließt: Das Eluat wird danach verworfen.

- 2) Entfernung von DNA-Resten mittels DNase-Verdau-Lösung (10 µl DNase wird dazu mit 70 µl RDD-Puffer gelöst). Dazu wird die hergestellte Lösung direkt auf die Säule pipettiert und der Ansatz bei 20-30°C für 15 Minuten inkubiert.

- 3) Reinigen der Säule von DNA-Bestandteilen nach Verdau mit Hilfe von 350 µl RW1 Puffer und erneuter Zentrifugation über 15 Sekunden bei 10 000 rpm. Das

Auffanggefäß und die eluierte Lösung müssen nun entsorgt werden und die Säule wird in ein frisches Auffanggefäß überführt.

4) Es werden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und ein weiteres Mal über 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert, um die Probe weiter aufzureinigen. Der RPE-Puffer muss vor Gebrauch mit vier Teilen Ethanol (96 %) verdünnt werden. Das Eluat wird verworfen. Dieser Schritt wird bei Verwendung des RNeasy Mini Kits zweimal durchgeführt, dafür entfällt die Aufreinigung mit Ethanol.

5) In einem letzten Reinigungsschritt wird Ethanol (80 %) (500 µl) auf die Säule gebracht und über zwei Minuten bei 10 000 rpm in das Auffanggefäß abzentrifugiert. Die RNA befindet sich weiterhin auf der Säule, somit kann die Waschflüssigkeit verworfen werden. Zur Entfernung restlichen Ethanols wird im Anschluss über fünf Minuten bei höchster Umdrehungszahl zentrifugiert.

Die Reinigung der Tumor-mRNA ist damit abgeschlossen und sie kann mittels 14 µl RNase-freiem Wasser (50 µl) von der Säule eluiert werden.

2.4.2 Überprüfung der Reinheit und Konzentrationsbestimmung der mRNA

Die Qualität und Quantität wurde mittels UV-Spektrometrie (NanoDrop2000, Ultrospec 3000 UV) überprüft. Die Bestimmung der Absorptionsmaxima erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm. Einschlusskriterien für die Weiterverwendung der Tumor-mRNA-Proben war eine Ratio OD_{260}/OD_{280} von 1,85 – 2,15. Nachfolgend wurden die mRNA-Extrakte auf die für die Analyse erforderliche Konzentration von 250 ng/ul verdünnt, in PCR Cups aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.5 Herstellung der cDNA

Die extrahierte mRNA wurde mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit (Fa. Qiagen) zunächst in komplementäre DNA umgeschrieben. Mithilfe des Kits ließen sich DNA-Verunreinigungen durch Einsatz eines gDNA-Wipeout Buffer eliminieren. Pro Mikrogramm mRNA wurden 2 µl gDNA Wipeout Buffer, (7x) sowie RNase-freies

Wasser (ad 14 µl Endvolumen) hinzu pipettiert. Im Anschluss erfolgte die zweiminütige Inkubation der Mischung bei 42°C und die Lagerung auf Eis bis zur weiteren Verwendung.

Es folgte die eigentliche Transkription der gereinigten mRNA in cDNA entsprechend der Vorgaben des dazugehörigen Protokolls. Dafür wurden pro 1 µg RNA, je 1 µl Reverse Transkriptase (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen), sowie 4 µl RT-Buffer (Quantiscript RT Buffer, 5x) und RT Primer Mix mit der Template RNA zu einem Reaktionsansatz zusammengefügt und anschließend in einem PCR-Gerät (PEQLAB) in cDNA umgeschrieben. Folgendes PCR-Programm wurde eingestellt:

Inkubation: 15 Minuten bei 42°C, im Anschluss drei Minuten bei 95°C zur Inaktivierung des Enzyms. Die gewonnene cDNA ist bei geplanter kurzfristiger Weiterverarbeitung bei 4°C aufzubewahren. Bei längerem Zeitraum zwischen Herstellung und Analyse erfolgt die Lagerung bei -20°C.

2.6 Herstellung der Primeraliquots für die Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR als Zielanalysemethode der Arbeit mussten zunächst die geplanten Primerpaare (*BRCA1*, *BRCA2*, *HOOK2*, *ACTN3*, *ACTB*, Firma Qiagen, QuantiTect Primer Assay) für die Anwendung vorbereitet werden. Die Lagerung erfolgte bis zur Aufbereitung im lyophilisierten Zustand bei -20°C. Vor Gebrauch wurde das Lyophilisat mit 1,1 ml TE Puffer pH 8,0 in Lösung gebracht, im Vortexer homogenisiert und entsprechend der später benötigten Mengen aliquotiert. Die tatsächlichen Primersequenzen werden von der Firma Qiagen nicht veröffentlicht. Folgende Primerpaare wurden für die Analyse eingesetzt:

BRCA1: Hs_BRCA1_1_SG Cat. no.: QT00039305

BRCA2: Hs_BRCA2_1_SG Cat. no.: QT00008449

HOOK2: Hs-HOOK2_1_SG Cat. no.: QT00007952

ACTN3.: Hs_ACTN3_1_SG Cat. no.: QT00996429

ACTB: Hs_ACTB_1_SG Cat. no.: QT00095431

2.7 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR

Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen und Vorbereitungsschritte sowie die Konzeption der Analyse erläutert.

2.7.1 Analyse der Eignung der Referenzgene für die Normalisierung

Für eine relative quantitative Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR werden Referenzgene eingesetzt. Sie dienen der Normalisierung und ermöglichen den Nachweis von intakter cDNA sowie den Ausgleich von Qualitäts- und Quantitätsunterschieden. Die Verwendung von Referenzgenen erhöht damit die Genauigkeit der Methode. Anforderung an Referenzgene ist die stabile Genexpression im zu untersuchenden Gewebe, auch unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (Fu et al., 2010). Aus jeder Probe wird daher sowohl das Ziel- als auch das Referenzgen bestimmt. Der Quotient bildet dann die normalisierte Zielgenexpression (Roche Applied Science, Technical Note No. LC 15/2002).

Normalisierte Ratio Zielgen=	$\frac{c \text{ (Zielgen Probe)}}{c \text{ (Referenzen Probe)}}$
------------------------------	--

Für die Normalisierung wurde für diese Untersuchung das Referenzgen *ACTB* ausgewählt. *ACTB* wird seit langem standardmäßig als Referenz in der RT-PCR eingesetzt. Wie bei einem Großteil der für diesen Zweck eingesetzten Gene gilt auch *ACTB* nicht als ideales Referenzgen. Ein ideales Referenz- oder Housekeeping-Gen zeichnet sich durch stabile Expression in unterschiedlichen Gewebstypen und bei unterschiedlichen Einflüssen z.B. beim Einsatz von Wirkstoffen aus (Fu et al., 2010). In dieser Arbeit wird *ACTB* jedoch unter jeweils gleichen experimentellen Bedingungen in einem Gewebetyp verwendet und nicht in einer zweizeitigen Untersuchung, in der z.B. die Auswirkung eines Medikamentes analysiert oder gesundes Ovargewebe im Vergleich zum malignen Tumor des Ovars betrachtet

werden soll. Die Anforderung war daher ausschließlich eine stabile Expression im nativen Tumormaterial.

2.7.2 Verwendung eines Kalibrators

Aufgrund der Anzahl der Patientinnen und der zu untersuchenden Gene mussten letztere auf einer größeren Anzahl an PCR-Platten im Light Cycler analysiert werden. Um die Ergebnisse der einzelnen PCR-Platten vergleichbar zu machen, wurde ein sogenannter Kalibrator verwendet. Dabei handelt es sich um eine cDNA- Probe, die in Vortests ihre stabile Genexpression sowohl des Ziel- als auch des Referenzgens gezeigt hat. Dieser Kalibrator wird dann auf jede neue PCR-Platte mit aufgebracht und ebenfalls vom zugrundeliegenden Rechenprogramm für die relative Quantifizierung einbezogen. Seine relative Expression wird als 1 bzw. 100 % angesetzt und als Bezugsgröße für alle anderen Proben genutzt. Durch den Einsatz eines Kalibrators muss nicht in jedem Analyselauf eine separate Standardkurve erzeugt werden.

Normalisierte Ratio = $\frac{c \text{ (Zielgen Probe)}}{c \text{ (Referenzen Probe)}} : \frac{c \text{ (Zielgen Kalibrator)}}{c \text{ (Referenzgen Kalibrator)}}$
--

Die Verwendung eines Referenzgens, eines Kalibrators und der weiter unten beschriebene Einsatz von Standardkurven, ermöglichen am Ende eine sehr genaue relative Quantifizierung (Technical Note No. LC 13/2001, S. 12, Roche Applied Science).

2.7.3 Erstellung von Standardkurven

Für jedes Ziel- und Referenzgen ist vor Beginn der Expressionsanalyse eine sogenannte Standardkurve zu generieren. Diese wird im Analysegerät, dem Light Cylcer LC 480 (Fa. Roche), ausgewertet und als Grundlage für die spätere Quantifizierung im Programm hinterlegt. Für die Erstellung einer Standardkurve wird

eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 erstellt. Eine Reihe mit den Konzentrationen 1, 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10 000 wird dann im dafür vorgesehen Programm des Light Cyclers als Standardkurve berechnet. Die Verwendung von Standardkurven dient ebenfalls einem Fehlerausgleich, da nicht automatisch von einer PCR-Effizienz von 2 ausgegangen werden kann. Eine Effizienz von 2 stellt einen Idealfall dar und bedeutet, dass sich die Anzahl der untersuchten Moleküle pro PCR-Zyklus genau verdoppelt. Dieser theoretische Idealwert ist aber nicht in jedem Fall zu erzeugen. Der Einsatz von Standardkurven ermöglicht eine Effizienzkorrektur, die durch das hinterlegte Rechenprogramm berücksichtigt wird.

Grundlegend für die relative Quantifizierung ist folgende Formel (Technical Note No. LC 13/2001, Relative Quantification, S.14, Roche Applied Science):

$$N = N_0 \times E^n$$

N = Anzahl der Moleküle im PCR-Zyklus n

N_0 = Ausgangsmenge Moleküle

E = Amplifikationseffizienz

n = Zyklus, in dem das Signal aus dem Hintergrund tritt (Crossing Point, Cp)

Der Crossing Point (Cp) stellt den PCR-Zyklus im Analyseprozess dar, in dem die exponentielle Steigung das erste Mal die Detektionsschwelle überschreitet. Dies zeigt vereinfacht die *Abbildung 3*.

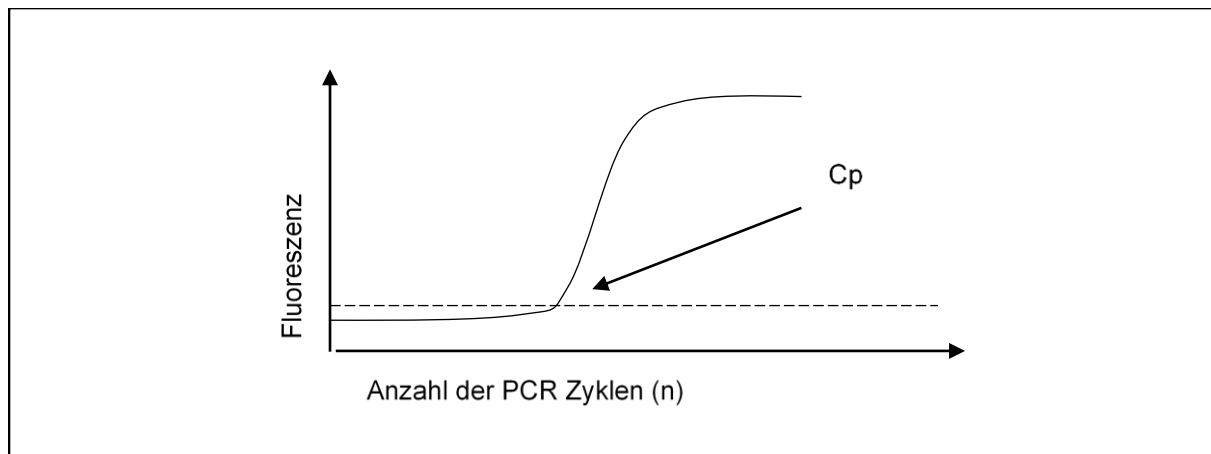


Abb. 3 Vereinfachte Darstellung einer Real-Time PCR

Der Fluoreszenzmarker (SYBR Green I) interkaliert in den Doppelstrang. Bei zunehmender Amplifikation wird die Detektionsgrenze überschritten und der lineare Anstiegsbereich der Amplifikationskurve wird erreicht. Dieser Punkt wird als Crossing Point (Cp) klassifiziert.

2.7.4 Konzeption der Analyseplatte für den Light Cycler

Aus den oben beschriebenen Konventionen für die Planung und Umsetzung einer Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR im Light Cycler waren nach Erstellung aller Standardkurven für die finale Konzeption der PCR-Platten folgende Punkte zu beachten:

- Dreifachbestimmung einer jeden cDNA-Probe (Zielgen und Referenzgen)
- Dreifachbestimmung Kalibrator cDNA (fungiert zusätzlich als Positivkontrolle)
- Dreifachbestimmung Negativkontrolle (H₂O)

2.7.5 Genexpressionsanalyse im Thermocycler

Die quantitative Real-Time PCR erfolgte in einem PCR Thermocycler (Light Cycler LC480, Roche).

Es wurde mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) gearbeitet. Dieses Kit enthält einen bereits vorgefertigten Mastermix mit Farbstoff (SYBR Green I) und

DNA-Polymerase (HotStarTaq DNA-Polymerase). Die Zusammensetzung des Probenansatzes, entsprechend der Vorschrift des Kits, zeigt *Tabelle 4*.

Tab. 4 Reaktionsansatz für quant. Real-Time PCR

Komponente	Volumen
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl
10x QuantiTect Primer Assay	2,5 µl
Template cDNA	2,5 µl
RNase freies H ₂ O	ad 25 µl

Pro 96-Well-PCR Platte kann im geplanten Plattendesign jeweils cDNA von dreißig Tumorproben analysiert werden. Die eingestellten PCR-Bedingungen, gemäß des QuantiTect Primer Assay Handbook 07/2011 der Firma Roche, zeigt *Tabelle 5*.

Tab. 5 PCR Programm Thermocycler

Prozess	Temperatur (°C)	Zeit	
Aktivierung der DNA-Polymerase	95	15 min	
Denaturierung	94	15 s	} 40 Zyklen
Annealing	55	30 s	
Polymerisierung	72	30 s	

Nach Aufbringen aller Proben auf die 96-Well-PCR-Platte wird diese mit dazugehöriger Folie versiegelt und im vorgesehenen Slot des Light Cyclers platziert. Im Programm des Thermocyclers werden die einzelnen Proben benannt, sodass in der anschließenden Berechnung die Ziel- und Referenzgene sowie die Kalibratoren und Standardkurven einander zugeordnet werden können. Die Analyse wird gemäß des o.g. Programms gestartet.

2.8 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen wurden mittels Statistica 6 (StatSoft, Hamburg) im onkologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Kiel durchgeführt.

Die relative Genexpression der Tumorproben wurde mittels Perzentile in *low expression*, *intermediate expression* und *high expression* klassifiziert. Die Korrelationsanalysen wurden je nach Fragestellung entweder mit dem o.g. Perzentilencluster oder mit den absoluten Expressionsdaten einer jeden Probe durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientinnendaten

Insgesamt konnte Tumorgewebe von 100 Patientinnen untersucht werden. *Tabelle 6* fasst die Auswertung der klinischen Dokumentation zusammen. Bei 81 Fällen wurde ein klassisches Ovarialkarzinom, bei 13 ein Borderlinetumor und bei 4 ein extraovarielles Auftreten eines Ovarialkarzinoms festgestellt. Histologisch dominierte der serös papilläre Subtyp sowie in 57 % der dokumentierten Fälle ein schlecht differenzierter G3 Status. Der Tumormarker CA-125 wurde präoperativ bestimmt. Bei 77 Proben (93 % der dokumentierten Werte) lag der Marker über dem Grenzwert von 35 U/ml. Insgesamt wurde bei 59 Patientinnen eine Angabe zur Peritonealkarzinose gemacht. In 71 % der Fälle war diese intraoperativ nachweisbar. Eine Aszitesmenge über 500 ml war in 49 % ($n = 35$) dokumentiert. Das mediane Erkrankungsalter bei Erstdiagnose lag bei 68 Jahren. Bei 70 % der dokumentierten Fälle wurde die Erstdiagnose in den FIGO Stadien III und IV gestellt. Auch die Altersverteilung mit 76 % der Patientinnen über 50 Jahren, der überwiegende Anteil davon mit einem Alter über 60, unterstreicht das zunehmende Erkrankungsrisiko mit fortschreitendem Alter. Der Body Mass Index (BMI in kg/m^2) war bei 45 Patientinnen dokumentiert. Die Einteilung der Subgruppen erfolgte gemäß WHO. Vereinfacht dargestellt, zeigen unter den dokumentierten Fällen 47 % der Patientinnen ein Übergewicht, 49 % waren normalgewichtig und 4 % galten mit einem BMI unter $18,5 \text{ kg/m}^2$ als untergewichtig. Der überwiegende Anteil der Patientinnen erlitt innerhalb der ersten 24 Monate ein Rezidiv. Zum Zensusdatum waren 47 % der dokumentierten Patientinnen ($n = 34$) tumorbedingt verstorben. Bei 28 % war zu diesem Zeitpunkt keine Krankheit nachweisbar ($n = 20$), weitere 17 % lebten mit der Erkrankung. Insgesamt zeigte sich der heterogene Krankheitsverlauf auch in der Zeit bis zum Tod nach der Operation. Der Median für die Überlebenszeit lag bei 30,5 Monaten mit einem Minimum von 2 und einem Maximum von 168 Monaten.

Tab. 6 Auswertung der Patientinnendaten

	Kategorien	Wert
Alter bei ED (Jahren)	Median (Min-Max)	68 (29-85)
BMI (kg/m²)	< 18,5	2
	18,5-24,9	22
	25-25,9	14
	30-34,9	6
	>35	1
	n.a.	55
Tumor	Ovarialkarzinom	81
	Borderline	13
	Extraovarielles OvCA	4
	n.a.	2
FIGO Stadium bei ED	I	18
	II	10
	III	48
	IV	17
	n.a.	7

Histologie	serös/papillär	67
	endometrioid	12
	mucinös	4
	Mischformen	15
	n.a.	2
Grading	G1	3
	G2	28
	G3	50
	G Borderline	5
	n.a.	12
Perioperativer Aszites >500 ml	+	35
	-	37
	n.a.	28
Peritonealkarzinose	+	42
	-	17
	n.a.	41
CA-125 (U/ml) präoperativ	≤ 35	6
	> 35	77
	n.a.	27

Platinbasierte Firstline-Chemotherapie	+	70
	-	2
	entfällt	15
	n.a.	13
Wirkstoffe	Carboplatin	3
	Cisplatin	1
	Carboplatin/Paclitaxel	60
	Carboplatin/Paclitaxel/ Gemcitabin	6
	Carboplatin/Paclitaxel/Bevacizumab	1
	Carboplatin/Paclitaxel/Topotecan	1
	andere/entfällt/n.a.	28
Platinansprechen	sensibel	18
	intermediär	6
	refraktär	13
	n.a.	43
Monate bis Rezidiv (post-OP)	≤ 6	4
	7-12	18
	13-24	14
	> 24	8
	n.a.	56
Postoperatives Überleben in Monaten	Median (Min-Max)	30,5 (2 - 168)

Status zum Zensus	tumorbedingt verstorben	34
	nicht tumorbedingt verstorben	2
	lebt mit Erkrankung	12
	lebt rezidivfrei	20
	n.a.	38

3.2 Genexpressionsanalysen

Dieser Abschnitt beschreibt die Ergebnisse der Expressionsanalysen. Zum einen wird die Einteilung der Genexpression in Perzentilen erläutert, zum anderen der Vergleich der Expressionen untereinander sowie die Korrelation mit den klinischen Parametern dargestellt.

3.2.1 Klassifizierung der Genexpression

Abbildung 4 zeigt die mittels Box Plot dargestellte Verteilung der relativen Genexpressionswerte einer jeden Probe. Zur weiteren Datenanalyse wurden die Expressionen der vier untersuchten Gene mittels Perzentile (+/- 25 %) in *low expression*, *intermediate expression* und *high expression* klassifiziert.

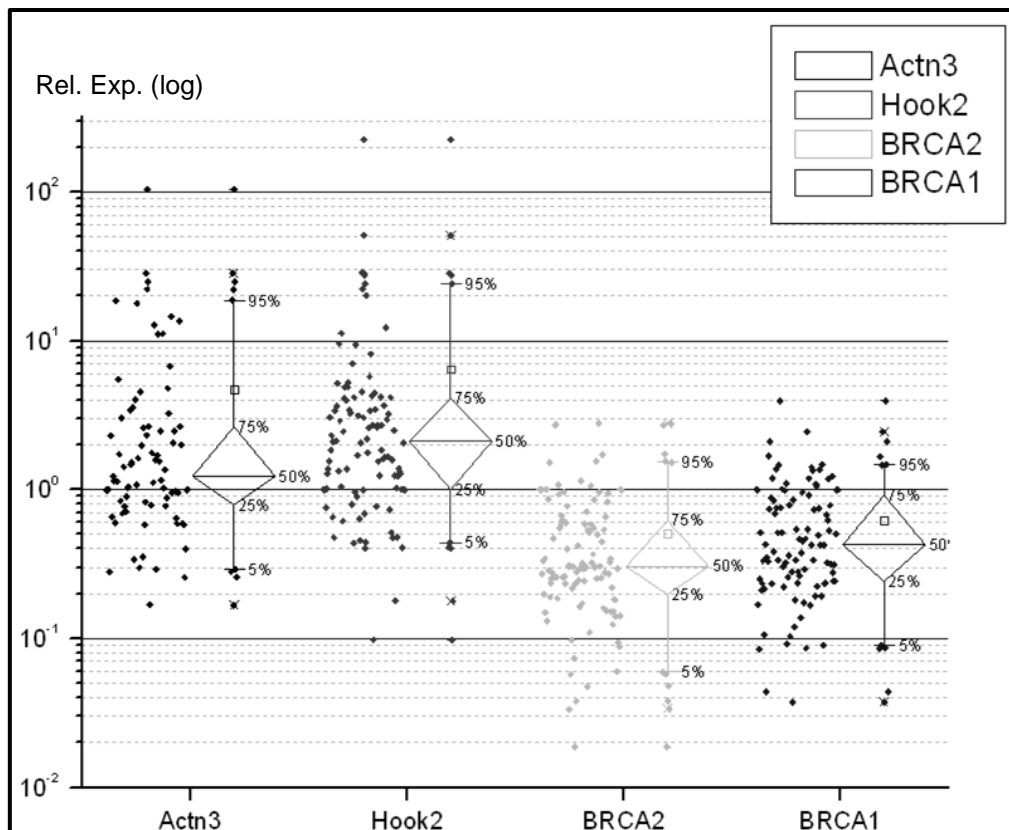


Abb. 4 Einteilung der Genexpression in Perzentilen mittels Box Plot

Jeder Punkt stellt eine individuelle relative Genexpression einer Patientin im Tumorgewebe in logarithmischer Skalierung dar. Es erfolgte zur Kategorisierung eine Perzentileneinteilung in low (< 25 Perz.), intermediate (25-75 Perz.) und high (> 75 Perz.)

In *Tabelle 7* ist die Verteilung gelistet. Die Expressionswerte oberhalb der 75 Perzentile wurden als *high expression*, die Werte unterhalb der 25 Perzentile als *low expression*, und der mittlere Bereich 25–75 Perzentile als *intermediate expression* klassifiziert.

Tab. 7 Einteilung in low, intermediate, high expression

Gen	Low expression	Intermediate expression	High expression
BRCA1 (n = 97)	25	50	22
BRCA2 (n = 98)	29	46	23
HOOK2 (n = 100)	26	49	25
ACTN3 (n = 76)	17	39	20

3.2.2 Korrelation der Expression der Gene untereinander

Die Korrelationsanalyse zwischen der relativen Genexpression von *BRCA1* und *BRCA2* mittels Spearmans Rangkorrelation zeigte eine hochsignifikante positive Korrelationstendenz beider Gene. In *Abbildung 5* ist die Korrelation graphisch im Punktdiagramm dargestellt. Patientinnen mit einer erhöhten *BRCA1*-Expression weisen statistisch signifikant auch eine erhöhte *BRCA2*-Expression auf.

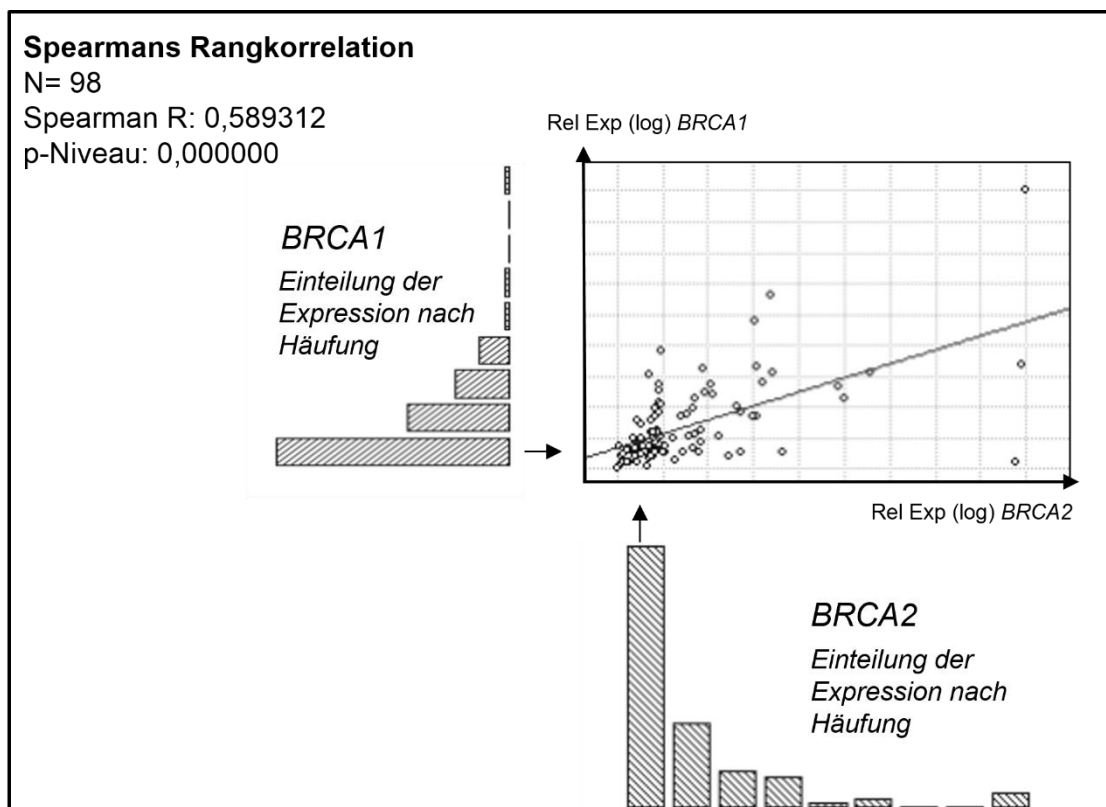


Abb. 5 Spearman's Rangkorrelation *BRCA1* und *BRCA2*

Graphische Darstellung der signifikanten Korrelation der Genexpression von *BRCA1* und *BRCA2*. Der Spearman-Rangkorrelations-Koeffizient ist ein Maß für die Stärke eines Zusammenhanges zweier Variablen, hier die Paarung der jeweiligen Expression einer Patientin von *BRCA1* und *BRCA2*. Die Einteilung erfolgt zuvor in Ränge. Diese Abbildung zeigt, dass ein Großteil der Proben bei einer niedrigen *BRCA1* Expression ebenfalls eine niedrige *BRCA2* Expression aufweist. Die Pfeile an den beiden stärksten Balken sollen beispielhaft auf die dazugehörige Häufung der Werte im Graphen hinweisen.

Eine ebenfalls positive signifikante Korrelation ließ sich zwischen der relativen Genexpression von *BRCA1* und *ACTN3* zeigen, graphisch dargestellt in *Abbildung 6*. Hierbei muss jedoch der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient von 0,45 mit in die Betrachtung einbezogen werden. Aufgrund des niedrigen Wertes relativiert sich die Signifikanz in ihrer Aussagekraft.

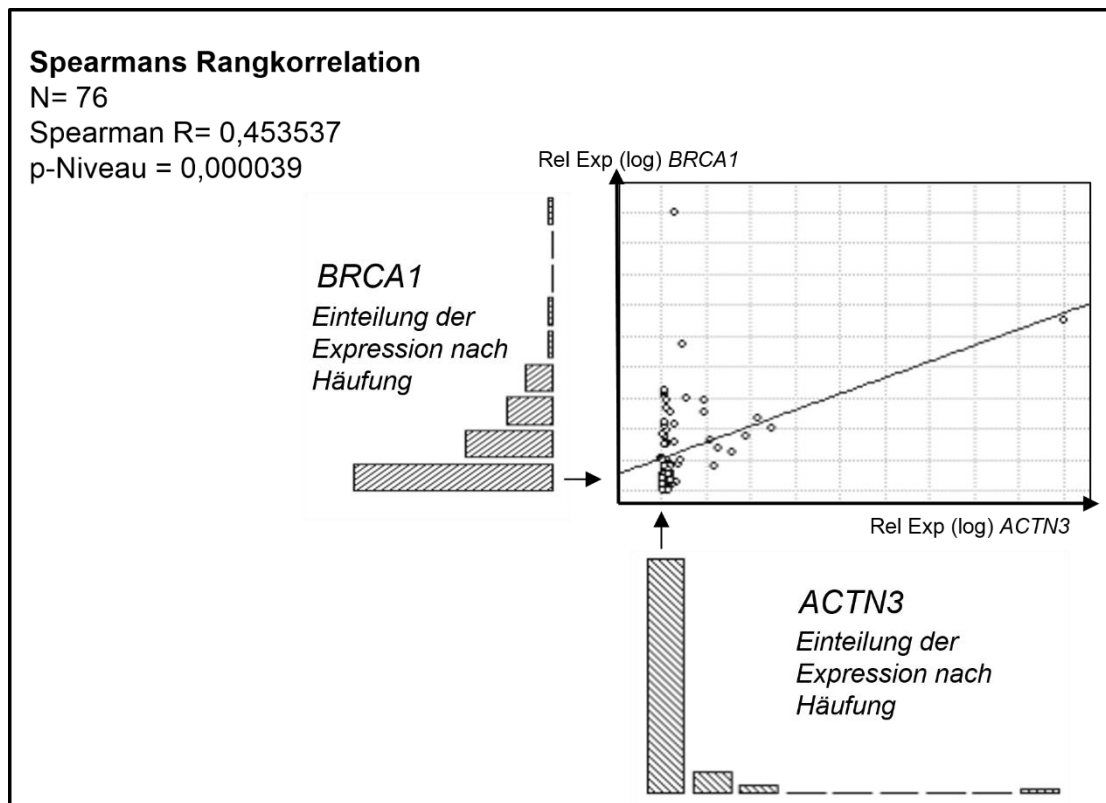


Abb. 6 **Spearmans Rangkorrelation *BRCA1* und *ACTN3***

Graphische Darstellung der signifikanten Korrelation der Genexpression von *BRCA1* und *ACTN3*. Der Spearman-Rangkorrelation-Koeffizient ist ein Maß für die Stärke eines Zusammenhanges zweier Variablen, hier jeweils die Paarung der jeweiligen Expression einer Patientin von *BRCA1* und *ACTN3*. Die Einteilung erfolgt zuvor in Ränge. Diese Abbildung zeigt, sowohl die jeweiligen Werte der rel. Expression (in log) als auch die Verteilung der jeweiligen Häufigkeiten in Balkenform. Die Pfeile an den beiden stärksten Balken sollen beispielhaft auf die dazugehörige Häufung der Werte im Graphen hinweisen. Ein Großteil der Proben weist bei einer niedrigen *BRCA1* Expression ebenfalls eine niedrige *ACTN3* Expression mit einem statistisch signifikantem p-Niveau jedoch einem R-Wert unter 0,6.

Weitere Korrelationen der untersuchten Gene konnten nicht festgestellt werden.

3.3 Korrelation der Genexpression mit klinischen Parametern

In Kapitel 3.3 werden die Ergebnisse der Korrelationsanalysen der Genexpression mit den klinischen Parametern dargestellt.

3.3.1 Genexpression nach Histologie

Die Genexpression aller vier Zielgene wurde analog zu den anderen klinischen Daten ebenfalls untersucht. In die Betrachtung wurden das seröse, das endometrioid und das mucinöse Ovarialkarzinom eingeschlossen. *Tabelle 8* zeigt, bei welchem prozentualen Anteil der Patientenhistologie eine Genexpression nachgewiesen werden konnte. Alle vier Gene werden in den drei untersuchten histologischen Subtypen in hohem Prozentsatz exprimiert.

Tab. 8 ***Genexpression nach histologischem Subtyp***

Histologie	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>HOOK2</i>	<i>ACTN3</i>
serös papillär	92,2 %	98,4 %	96,9 %	76,3 %
Endometrioid	91,7 %	81,8 %	91,7 %	58,3 %
Mucinös	100 %	100 %	100 %	75 %

Innerhalb jedes einzelnen histologischen Subtyps wurde überprüft, ob sich ein Expressionsmuster erkennen lässt, das Rückschlüsse auf die Höhe der Expression zur Histologie ermöglicht. Es ließ sich bei keinem Subtyp ein statistisch signifikantes Ergebnis zeigen.

3.3.2 Korrelationsanalyse zwischen *BRCA1* und klinischen Daten

Die Überprüfung eines möglichen Zusammenhanges der Expressionsrate von *BRCA1* und dem Ansprechen auf die platinbasierte Chemotherapie (zur Definition vergl. Tabelle 3) erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA). Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang einer *low expression* zur Platinsensitivität ($p=0,02753$). Patientinnen mit einer im Vergleich niedrigeren Expression zeigten ein besseres Ansprechen auf eine platinbasierte Therapie im Vergleich zum Kollektiv mit einer erhöhten relativen Genexpression.

Tabelle 9 fasst die Korrelationsanalyse der weiteren untersuchten klinischen Parameter mit der nach Perzentilen klassifizierten Genexpression von *BRCA1* zusammen. Ein signifikanter Zusammenhang zeigte sich zwischen der Expression von *BRCA1* und dem Alter bei Erstdiagnose (ED). Die übrigen klinischen Parameter zeigen keinen Zusammenhang zur relativen Genexpression von *BRCA1*.

Tab. 9 ***Spearman's Rangkorrelation BRCA1 mit klinischen Daten***

Gen	Klin. Parameter	gültige N	Spearman R	p-Niveau
<i>BRCA1</i>	Alter ED	95	0,209770	0,041322
	Überleben post-OP	85	0,074380	0,497802
	FIGO-Stadium	86	-0,046269	0,6722763
	Grading	86	-0,04388	0,688244
	CA-125 U/ml	78	-0,028884	0,801794
	BMI (kg/m ²)	42	-0,091010	0,566505
	Zeit bis Rezidiv	64	-0,090476	0,477081

Abbildung 7 zeigt die Korrelationsgraphik. Je höher das Alter, desto höher ist die Expression von *BRCA1*.

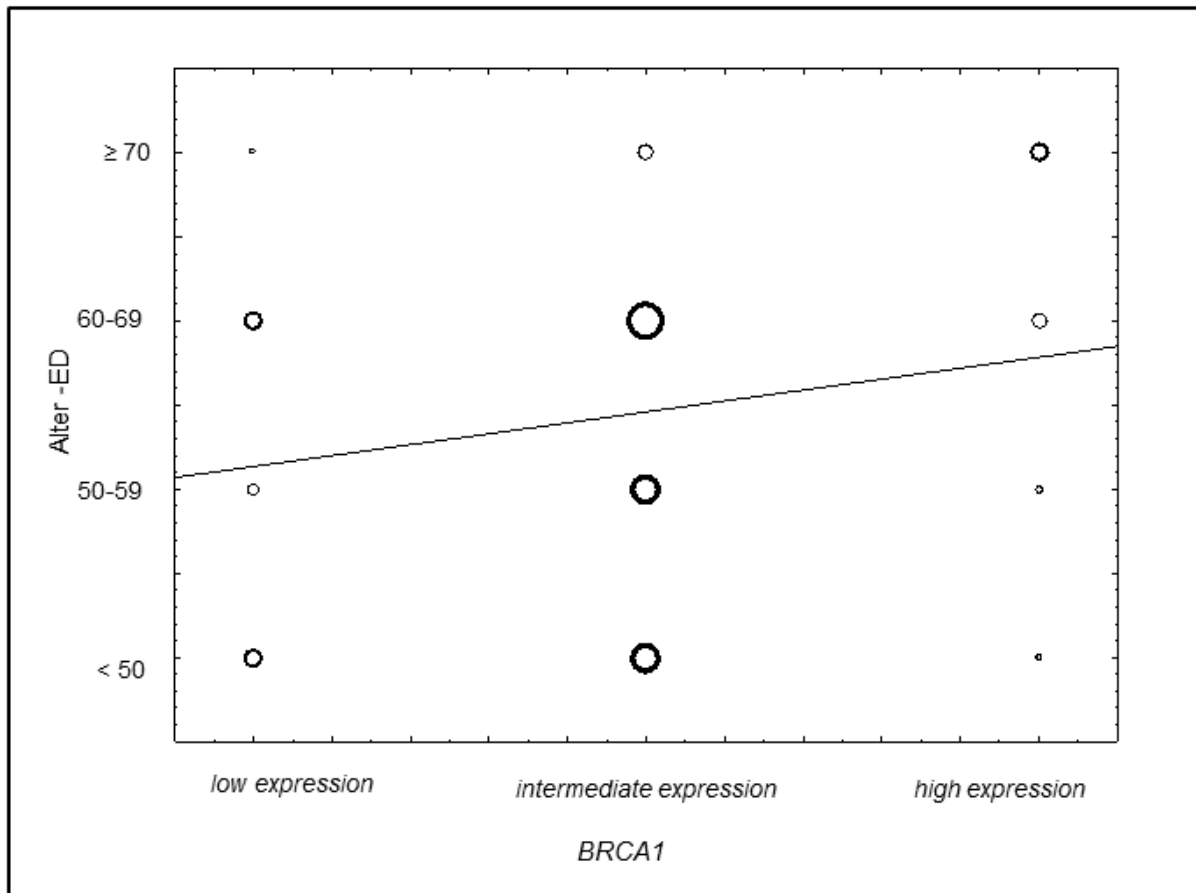


Abb. 7 Korrelationsgraphik *BRCA1* und Alter bei ED

Graphische Darstellung der signifikanten Korrelation der Genexpression von *BRCA1* und dem Alter bei Erstdiagnose, $p=0,041322$, die Größe der Kreise ist ein Maß für die Patientenzahl. Die Expression ist dabei gemäß den vorgeschriebenen Perzentilen eingeteilt.

3.3.3 Korrelationsanalyse zwischen *BRCA 2* und klinischen Daten

Zwischen der *BRCA2*-Expression und den klinischen Parametern konnte kein statistischer Zusammenhang gefunden werden, siehe *Tabelle 10*. Die Varianzanalyse mittels ANOVA zur Prüfung eines Zusammenhanges zwischen Expression und Platinansprechen zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang.

Tab. 10 Spearmans Rangkorrelation BRCA2 und klinische Daten

Gen	Klin. Parameter	gültige N	Spearman R	p-Niveau
BRCA2	Alter ED	96	0,168087	0,101630
	Überleben post-OP	85	-0,060294	0,583585
	FIGO-Stadium	87	-0,057284	0,598186
	Grading	87	0,059786	0,582267
	CA-125 U/ml	79	0,048057	0,674065
	BMI (kg/m ²)	46	-0,179476	0,249483
	Zeit bis Rezidiv	65	0,105575	0,4,2595

3.3.4 Korrelationsanalyse zwischen *HOOK2* und klinischen Daten

Die Expression von *HOOK2* im Tumorgewebe zeigte keine Korrelation zu den klinischen Parametern, siehe *Tabelle 11*. Die Varianzanalyse mittels ANOVA zur Prüfung eines Zusammenhanges zwischen Expression und Platinansprechen zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang.

Tab. 11 Spearmans Rangkorrelation HOOK2 und klinische Daten

Gen	Klin. Parameter	gültige N	Spearman R	p-Niveau
HOOK2	Alter ED	98	-0,098277	0,335675
	Überleben post-OP	87	0,044696	0,681018
	FIGO-Stadium	89	-0,016973	0,874555
	Grading	89	0,083415	0,437063
	CA-125 U/ml	81	0,095709	0,395354
	BMI (kg/m ²)	45	-0,039902	0,794677
	Zeit bis Rezidiv	67	-0,058800	0,636460

3.3.5 Korrelationsanalyse zwischen *ACTN3* und klinischen Daten

Die *ACTN3*-Expression im Tumorgewebe zeigte eine positive Korrelation zum Alter bei Erstdiagnose. *Abbildung 8* stellt den Zusammenhang graphisch dar. Zwischen den sonstigen klinischen Parametern und der Genexpression konnte kein statistischer Zusammenhang gefunden werden, wie *Tabelle 12* anhand der Korrelationsparameter zeigt. Die Varianzanalyse mittels ANOVA zur Prüfung eines Zusammenhanges zwischen Expression und Platinansprechen zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang.

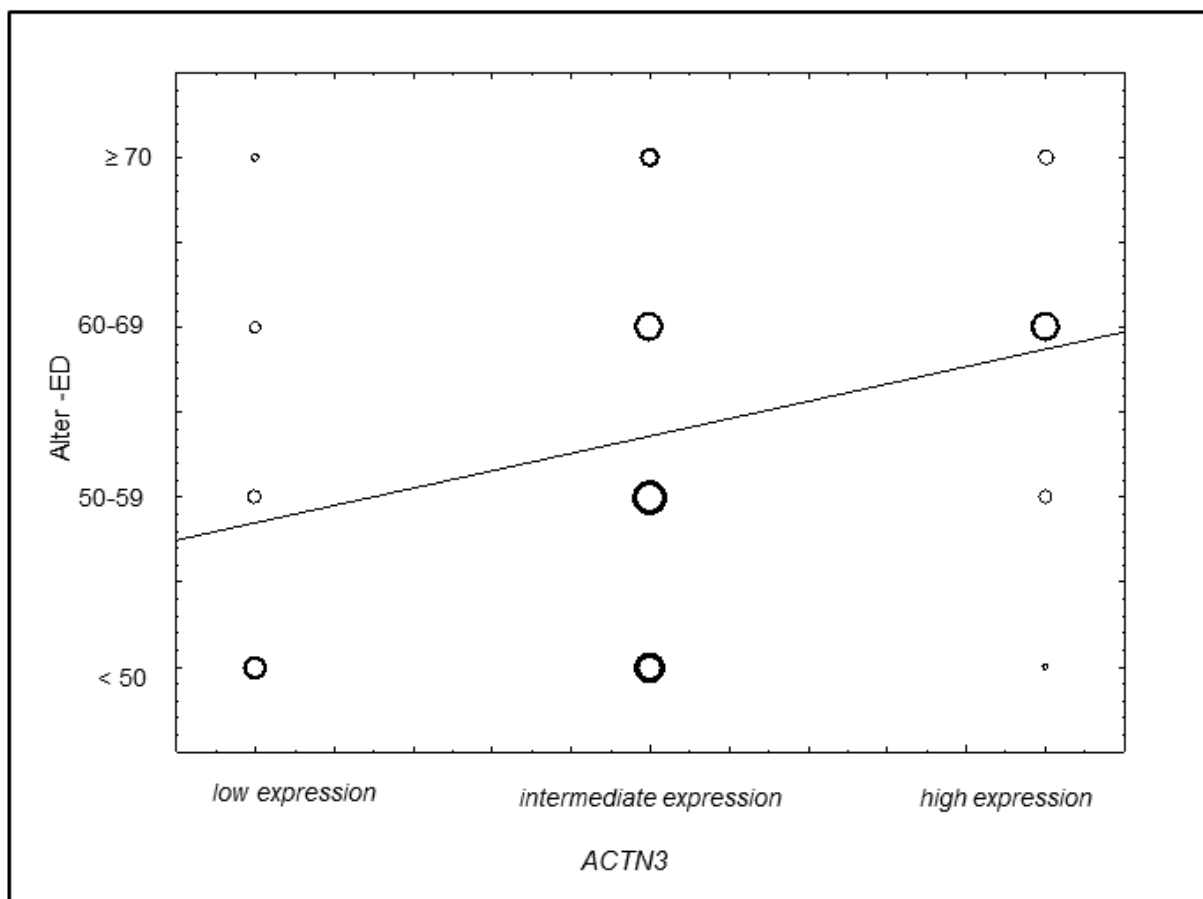


Abb. 8 **Korrelationsgraphik *ACTN3* und Alter bei ED**

Graphische Darstellung der signifikanten Korrelation der Genexpression von *ACTN3* und dem Alter bei Erstdiagnose, $p=0,002274$, die Größe der Kreise ist ein Maß für die Patientenzahl. Die Expression ist gemäß den vorbeschriebenen Perzentilen eingeteilt.

Tab. 12 ***Spearman's Rangkorrelation ACTN3 und klinische Daten***

Gen	Klin. Parameter	gültige N	Spearman R	p-Niveau
ACTN3	Alter ED	76	0,344977	0,002274
	Überleben post-OP	70	-0,133054	0,272180
	FIGO-Stadium	68	-0,048615	0,693811
	Grading	69	0,029463	0,810083
	CA-125 U/ml	63	-0,077758	0,544682
	BMI (kg/m ²)	34	-0,186138	0,291877
	Zeit bis Rezidiv	53	-0,130541	0,351499

4 Diskussion

Die Daten der Patientinnen spiegeln die typischen klinischen Charakteristika des Ovarialkarzinoms wider. Sowohl das mediane Alter bei Erstdiagnose als auch die späte Diagnosestellung in einem FIGO III- und IV-Stadium lassen sich im untersuchten Patientinnenkollektiv reproduzieren. Der überwiegende Anteil der Patientinnen erhielt leitlinienkonform nach der Staging Operation eine platinbasierte First-Line-Chemotherapie. Auch der heterogene Verlauf mit sehr kurzer Zeit zum Rezidiv und zum Tod sowie lange progressionsfreie Intervalle und Langzeitüberleben ließen sich zeigen.

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Analyse der Expression der untersuchten vier Gene untereinander. Hier zeigte sich eine positive hochsignifikante Korrelation der Expressionen von *BRCA1* und *BRCA2*. Eine Studie aus 2002, die die Genexpression von *BRCA1* und *BRCA2* im sporadischen Ovarialkarzinom untersuchte, zeigte einen entgegengesetzten Zusammenhang. Eine niedrige Expression von *BRCA1* war assoziiert mit einer hohen *BRCA2*-Expression (Chan et al., 2002). Zhang et al. konnten 2009 eine direkte Verbindung beider BRCA-Proteine über PALB2 in einem Reparaturkomplex zeigen. Die Arbeitsgruppe postulierte eine übergeordnete Rolle von *BRCA1* in der Regulation von *BRCA2* und *PALB2* (Zhang et al., 2009). Dieser regulative Zusammenhang würde auch die hochsignifikante Korrelation der Genexpression von *BRCA1* und *BRCA2* dieser Arbeit erklären.

Eine weitere ebenfalls signifikante Korrelation ließ sich zwischen der Genexpression von *BRCA1* und *ACTN3* zeigen. Der niedrige Spearman-Rangkorrelationskoeffizient muss dabei jedoch mit in Betracht gezogen werden und relativiert die Aussagekraft. Die Expressionskorrelation von *BRCA1* und *ACTN3* ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Die Expression von *ACTN3* wurde basierend auf den Arbeiten von Onkes et al. (2013) und Wang et al. (2014) untersucht. Bisher erscheint *ACTN3* maßgeblich in Arbeiten zur Leistungsfähigkeit von Athleten (Roth et al., 2008). *ACTN3* kommt spezifisch bei Säugetieren im Bereich der Skelettmuskulatur vor. Es ermöglicht in seiner Proteinform (alpha-Actinin 3) die Bindung von Actin an die Z-Scheibe des Sarkomers. Die Expression von *ACTN3* ist assoziiert mit einer erhöhten Sprintfähigkeit bei Athleten. Ein Polymorphismus des *ACTN3*, bei dem der Wildtyp

nicht exprimiert wird, wird ebenfalls untersucht. Hier zeigt sich reduzierte athletische Leistungsfähigkeit (Roth et al., 2008). Arbeiten zum Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom oder dem Auftreten im gesunden Ovar konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Zu hinterfragen wäre eine Verunreinigung der Proben mit Gewebe der Skelettmuskulatur. Die untersuchten Gewebestücke wurden nach der Staging Operation durch das Pathologische Institut des Universitätsklinikums Kiel untersucht und klassifiziert. Die Proben zur Gewinnung der m-RNA stammen mittig aus dem gefrorenen Tumorgewebe. Bei 76 % der Patientinnen konnte eine *ACTN3*-Expression gezeigt werden. Eine Verunreinigung kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, ist in dieser Häufigkeit aber eher fraglich. Die Korrelation mit der Expression von *BRCA1* muss ebenfalls mit in die Betrachtung einbezogen werden. Die Funktionen von *BRCA1* im DNA-Reparaturmechanismus, im Zellzyklus und im Erhalt der Chromosomenstabilität sind vielfältig und durch Interaktion mit diversen Proteinen gekennzeichnet (Yoshida and Miki, 2004). Eine Hyperphosphorylierung nach DNA-Schädigung führt zur Aktivierung. Es wurden unterschiedliche Kinasen beschrieben, die je nach Schädigung der DNA an unterschiedlichen Aminosäuren zur Phosphorylierung von *BRCA1* führen (Yoshida and Miki, 2004). Zu diskutierende Ursachen der unerwarteten Expression von *ACTN3* könnten ebenfalls die Aktivierung von Promotorregionen oder auch epigenetische Veränderungen sein, die die Regulation dieses Gens beeinflussen. Vor dem Hintergrund der vielfältigen und unterschiedlichen Entartungen, insbesondere beim HGSOE, wäre dies eine naheliegende Erklärung. Interessanterweise ist festzuhalten, dass alle vier untersuchten Gene in den drei histologischen Subtypen (serös-papillär, endometrioid, mucinös) exprimiert werden.

Anhand der Untersuchungen dieser Arbeit lässt sich das ungewöhnliche Auftreten von *ACTN3* im Ovarialkarzinom jedoch nicht abschließend klären.

HOOK2, ebenfalls basierend auf den Arbeiten von Onkes et al. (2013) und Wang et al. (2014) untersucht, zeigte keine Zusammenhänge, weder in der Genexpressionvergleichsanalyse noch in der Korrelationsanalyse mit den klinischen Daten. Es wird daher für die weitere Diskussion vernachlässigt. Aufgrund seiner entscheidenden Proteinfunktion im Bereich der Stabilität des Zentrosoms und des mikrotubulusgetriebenen retrograden Transports wären Auffälligkeiten im Expressionsverhalten in malignem Gewebe durchaus denkbar. Szebenyi et al. haben

2007 ein ubiquitäres Auftreten von *HOOK2* in unterschiedlichen Geweben zeigen können. So ist die hier gezeigte Expression (s. *Tabelle 8*) im Ovar vor dem Hintergrund der Funktionalität von *HOOK2* nicht als ungewöhnlich, sondern eher als wahrscheinlich einzustufen (Szebenyi et al., 2007).

In der Untersuchung der Patientenparameter und Genexpression zeigte sich für *BRCA1* und *ACTN3* eine Korrelation mit dem Alter bei Erstdiagnose. In *Abbildung 7* und *Abbildung 8* wird dieser Zusammenhang graphisch dargestellt. Für beide Gene zeigt sich eine höhere Expression bei jeweils höherem Alter bei Erstdiagnose.

Die altersabhängige Expression von *ACTN3* wird zwar seit einigen Jahren untersucht, dabei steht allerdings die Untersuchung der Auswirkungen des Polymorphismus R577X SNP von *ACTN3* im Rahmen der Erforschung der muskulären Leistungsfähigkeit im Vordergrund (Delmonico et al., 2008). Eine signifikante Korrelation zwischen Alter und *ACTN3* bzw. seiner Variante konnte bisher nicht gezeigt werden, dennoch gibt es Hinweise, dass die Expressionshöhe von *ACTN3* mit einer besseren Leistungsfähigkeit im Alter assoziiert ist und sich aufgrund einer höheren Muskelmasse positive Stoffwechselauswirkungen ergeben (Pickering and Kiely, 2018). Im Rahmen von malignen Erkrankungen ist die Bedeutung bisher nicht untersucht. Eine erhöhte Resilienz aufgrund einer besseren Stoffwechselaktivität und ggf. reduzierter Komorbidität wären in einem solchen Zusammenhang denkbar.

Eine niedrige Genexpression von *BRCA1* entspricht im weitesten Sinne einem geringeren Schutz vor Irreparabilität von DNA-Schäden und lässt somit auch eine Assoziation mit einem früheren Erkrankungsbeginn zu. Das im Mittel deutlich niedrigere Alter bei Erstdiagnose eines *BRCA1*-positiven Ovarialkarzinoms ist bereits seit über 20 Jahren bekannt (Rubin et al., 1996) und wird u.a. auch anamnestisch für die Evaluation einer möglichen Keimbahnmutation eingesetzt (Wagner and Reuß, 2019).

Auch das verbesserte Platinansprechen bei niedrigerer Expression von *BRCA1* wurde bereits beim spontanen Ovarialkarzinom u.a. von Weberpals und Quinn et al. gezeigt und lässt sich in dieser Arbeit reproduzieren (Weberpals, 2011), (Quinn et al., 2007). Der Wirkmechanismus der Platinderivate beruht auf einer kovalenten Bindung

an den DNA-Doppelstrang und führt zu Strangabbrüchen mit Apoptoseinduktion (Lüllmann et al., 2004), (Foulkes, 2006). Somit wäre es nachvollziehbar, dass die Ursprungsfunktion des Tumorsuppressors *BRCA1* im Therapiegeschehen eher kontraproduktiv ist, da *BRCA* und Platin in ihrer Funktionalität letztlich Gegenspieler sind.

Zusätzlich stellt sich die Frage, inwieweit auch Patientinnen mit sporadischem Ovarialkarzinom und reduzierter *BRCA*-Expression von targeted therapies profitieren. Bolton et al. fordern dazu in ihrem Review eine deutlich höhere Patientinnenzahl als in den bis dato erfolgten Studien, um die Bedeutung der Therapie beim sporadischen Ovarialkarzinom mit somatischer Mutation oder epigenetischer Downregulation im Bereich von *BRCA1/2* weiter zu untersuchen (Bolton, 2012). In ihrem Review zur Bedeutung des *BRCA*-Status zum Patientenoutcome beschreiben Sun et al. 2014 einen vergleichbaren Effekt zwischen Keimbahnmutation und erniedrigter *BRCA*-Expression im spontanen Ovarialkarzinom, in Bezug auf das PFI und Gesamtüberleben (Sun et al., 2014).

Die statistischen Analysen der sonstigen untersuchten klinischen Parameter mit den vier Genen *BRCA1*, *BRCA2*, *HOOK2* und *ACTN3* zeigten keine Assoziationen, wobei wir einen Zusammenhang mit der Genexpression von *BRCA1* und dem PFI entsprechend der bisherigen Erkenntnisse zum sporadischen Ovarialkarzinom mit reduzierter *BRCA1*-Expression erwartet hätten. Dies ließ sich im untersuchten Kollektiv dieser Arbeit, trotz der Korrelation zwischen Platinsensitivität und Genexpression, nicht reproduzieren. Interessant wären auch Korrelationen zu weniger untersuchten Parametern wie dem BMI – insbesondere vor dem Hintergrund metabolischer Effekte von Fettzellen und der Tatsache, dass ein erhöhter BMI zu den Risikofaktoren der Ausbildung eines Ovarialkarzinoms gehört (Kölbl and Bartl, 2020).

Abschließend ist als Novum die Genexpression von *ACTN3* im sporadischen Ovarialkarzinom, sowohl im serösen und mucinösen als auch im endometrioiden Subtyp, herauszustellen. Ebenso wirft die Korrelation der Expressionen von *ACTN3* mit *BRCA1* ggf. weiteren Untersuchungsbedarf hervor, jedoch unter der Berücksichtigung der eingeschränkten Aussagekraft bei Beachtung des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten. Zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch kein Anhalt für eine klinische Relevanz zu sehen. Das Fusionsgen aus *ACTN3* und *HOOK2* ist als

Ideengeber der Arbeit von Wang und dieser Arbeit zu sehen. Wang et al konnte das Fusionen im sporadischen Ovarialkarzinom nicht detektieren und auch die Untersuchung der Expression der unfusionierten Gene brachte keinen erheblichen neuen Erkenntnisgewinn mit klinischer Relevanz.

5 Zusammenfassung

Die Entdeckung eines *HOOK2-ACTN3*-Fusionsgens in der SKOV-3-Zelllinie im onkologischen Labor der Frauenklinik am UKSH, Kiel durch Onkes et al im Jahr 2013 brachte die beiden im Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom unbekannten Gene *HOOK2* und *ACTN3* in den Fokus. So versuchte zum einen Wang et al 2014 das Fusionsprodukt mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im sporadischen Ovarialkarzinom zu detektieren. Parallel dazu ging diese Arbeit der Frage nach der eigentlichen Expression der Gene *HOOK2* und *ACTN3* im sporadischen Ovarialkarzinom nach, um unabhängig von der o.g. Fusion im ersten Schritt zu prüfen, ob es überhaupt eine Expression im Tumorgewebe gibt, und dann weiterführend eine ggf. Korrelationen mit der Expression bekannter Tumorsuppressoren *BRCA1* und *BRCA2* sowie klinischen Parametern.

HOOK2 wurde in nahezu jeder untersuchten Tumorprobe exprimiert. Das Ausmaß der Expression zeigte keine statisch erkennbaren Zusammenhänge zu den anderen untersuchten Genen oder klinischen Daten. Das ansonsten spezifisch im Skelettmuskel vorkommende *ACTN3* ließ sich im Rahmen dieser Arbeit in einem großen Anteil der Tumorproben nachweisen, unabhängig vom histologischen Subtyp. Darüber hinaus zeigte die Genexpression von *ACTN3* eine positive hochsignifikante Korrelation mit dem Tumorsuppressorgen *BRCA1*, mit aktuell unklarer Ursache und Bedeutung. Eine weitere hochsignifikante Korrelation konnte zwischen der Genexpression von *BRCA1* und *BRCA2* gezeigt werden. Die Analyse der Genexpression im Zusammenhang mit den klinischen Parametern ergab eine signifikante Korrelation zwischen Höhe der Expression und Alter bei Erstdiagnose sowohl von *BRCA1* als auch von *ACTN3*, allerdings mit einem niedrigen Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten, sodass dieser Zusammenhang nicht als sicher einzustufen ist. Die bereits in der Literatur beschriebene Platinsensitivität bei reduzierter *BRCA1*-Expression konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Weitere signifikante Zusammenhänge zwischen Klinik und Genexpression konnten nicht gefunden werden.

Die hier untersuchten Tumorproben werden im Rahmen weiterer Arbeiten im onkologischen Labor der Frauenklinik des UKSH Kiel analysiert, sodass ggf. im

Verlauf weitere Korrelationen und Daten mit Bedeutung für die Klinik des Ovarialkarzinoms zusammengeführt werden können.

6 Literaturverzeichnis

1. Babic, A., Sasamoto, N., Rosner, B.A., Tworoger, S.S., Jordan, S.J., Risch, H.A., Harris, H.R., Rossing, M.A., Doherty, J.A., Fortner, R.T., Chang-Claude, J., Goodman, M.T., Thompson, P.J., Moysich, K.B., Ness, R.B., Kjaer, S.K., Jensen, A., Schildkraut, J.M., Titus, L.J., Cramer, D.W., Bandera, E.V., Qin, B., Sieh, W., McGuire, V., Sutphen, R., Pearce, C.L., Wu, A.H., Pike, M., Webb, P.M., Modugno, F., Terry, K.L., 2020. Association Between Breastfeeding and Ovarian Cancer Risk. *JAMA Oncol.* 6, e200421–e200421. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.0421>
2. Berek, J.S., Kehoe, S.T., Kumar, L., Friedlander, M., 2018. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 143, 59–78. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12614>
3. Bolton, K.L., 2012. Association Between BRCA1 and BRCA2 Mutations and Survival in Women With Invasive Epithelial Ovarian Cancer. *JAMA* 307, 382. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.20>
4. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
5. Brett M., R., Jennifer B., P., Thomas A., S., Brett M., R., Jennifer B., P., Thomas A., S., 2017. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol. Med.* 14, 9–32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>
6. Buttmann-Schweiger, N., Kraywinkel, K., 2019. Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland. *Onkol.* 25, 92–98. <https://doi.org/10.1007/s00761-018-0507-8>
7. Chan, K.Y.K., Ozcelik, H., Cheung, A.N.Y., Ngan, H.Y.S., Khoo, U.-S., 2002. Epigenetic Factors Controlling the BRCA1 and BRCA2 Genes in Sporadic Ovarian Cancer 7.
8. Cibula, D., Widschwendter, M., Majek, O., Dusek, L., 2011. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 17, 55–67. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq030>
9. Daly, M.B., 2010. Oophorectomy as a preventative measure for ovarian cancer. *Therapy* 7, 241–247. <https://doi.org/10.2217/thy.10.25>
10. Delmonico, M.J., Zmuda, J.M., Taylor, B.C., Cauley, J.A., Harris, T.B., Manini, T.M., Schwartz, A., Li, R., Roth, S.M., Hurley, B.F., Bauer, D.C., Ferrell, R.E., Newman, A.B., n.d. Association of the ACTN3 Genotype and Physical Functioning With Age in Older Adults 8.
11. Dwivedi, D., Kumari, A., Rathi, S., Mylavarapu, S.V.S., Sharma, M., 2019. The dynein adaptor Hook2 plays essential roles in mitotic progression and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 218, 871–894. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804183>
12. Foulkes, W.D., 2006. BRCA1 and BRCA2: Chemosensitivity, Treatment Outcomes and Prognosis. *Fam. Cancer* 5, 135–142. <https://doi.org/10.1007/s10689-005-2832-5>

13. Fu, J., Bian, L., Zhao, L., Dong, Z., Gao, X., Luan, H., Sun, Y., Song, H., 2010. Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues 8.
14. Gu, P., Pan, L.-L., Wu, S.-Q., Sun, L., Huang, G., 2009. CA 125, PET alone, PET–CT, CT and MRI in diagnosing recurrent ovarian carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Radiology* 71, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.02.019>.
15. Kölbl, H., Bartl, T., 2020. Obesity in Gynecologic Oncology. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 80, 1205–1211. <https://doi.org/10.1055/a-1124-7139>
16. Kurman, R.J., Shih, I.-M., 2011. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer—Shifting the paradigm. *Hum. Pathol.* 42, 918–931. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.003>
17. Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., 2004. *Taschenatlas Pharmakologie*, 5th ed. Stuttgart.
18. Margul, D., Coleman, R.L., Herzog, T.J., 2020. The Current Status of Secondary Cytoreduction in Ovarian Cancer: A Systematic Review 12.
19. Murphy, A.C.H., Young, P.W., 2015. The actinin family of actin cross-linking proteins – a genetic perspective. *Cell Biosci.* 5, 49. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0029-7>
20. Onkes, W., Fredrik, R., Micci, F., Schönbeck, B.J., Martin-Subero, J.I., Ullmann, R., Hilpert, F., Bräutigam, K., Janssen, O., Maass, N., Siebert, R., Heim, S., Arnold, N., Weimer, J., 2013. Breakpoint characterization of the der(19)t(11;19)(q13;p13) in the ovarian cancer cell line SKOV-3. *Genes. Chromosomes Cancer* 52, 512–522. <https://doi.org/10.1002/gcc.22048>
21. Penson, R.T., Valencia, R.V., Cibula, D., Colombo, N., Leath, C.A., Bidziński, M., Kim, J.-W., Nam, J.H., Madry, R., Hernández, C., Mora, P.A.R., Ryu, S.Y., Milenkova, T., Lowe, E.S., Barker, L., Scambia, G., 2020. Olaparib Versus Nonplatinum Chemotherapy in Patients With Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation (SOLO3): A Randomized Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* 38, 1164–1174. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02745>
22. Pickering, C., Kiely, J., 2018. ACTN3, Morbidity, and Healthy Aging. *Front. Genet.* 9, 15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00015>
23. Pignata, S., C Cecere, S., Du Bois, A., Harter, P., Heitz, F., 2017. Treatment of recurrent ovarian cancer. *Ann. Oncol.* 28, viii51–viii56. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx441>
24. Quinn, J.E., James, C.R., Stewart, G.E., Mulligan, J.M., White, P., Chang, G.K.F., Mullan, P.B., Johnston, P.G., Wilson, R.H., Harkin, D.P., 2007. BRCA1 mRNA Expression Levels Predict for Overall Survival in Ovarian Cancer after Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 13, 7413–7420. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1083>
25. Ramus, S.J., Gayther, S.A., 2009. The Contribution of *BRCA1* and *BRCA2* to Ovarian Cancer. *Mol. Oncol.* 3, 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.02.001>

26. Roth, S.M., Walsh, S., Liu, D., Metter, E.J., Ferrucci, L., Hurley, B.F., 2008. The ACTN3 R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 391–394. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201964>
27. Rubin, S.C., Benjamin, I., Behbakht, K., Takahashi, H., Morgan, M.A., LiVolsi, V.A., Berchuck, A., Muto, M.G., Garber, J.E., Weber, B.L., Lynch, H.T., Boyd, J., 1996. Clinical and Pathological Features of Ovarian Cancer in Women with Germ-Line Mutations of *BRCA1*. *N. Engl. J. Med.* 335, 1413–1416. <https://doi.org/10.1056/NEJM199611073351901>
28. Sun, C., Li, N., Ding, D., Weng, D., Meng, L., Chen, G., Ma, D., 2014. The Role of BRCA Status on the Prognosis of Patients with Epithelial Ovarian Cancer: A Systematic Review of the Literature with a Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9, e95285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095285>
29. Szebenyi, G., Hall, B., Yu, R., Hashim, A.I., Krämer, H., 2007. Hook2 Localizes to the Centrosome, Binds Directly to Centriolin/CEP110 and Contributes to Centrosomal Function. *Traffic* 8, 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00511.x>
30. Urban, R.R., He, H., Alfonso, R., Hardesty, M.M., Gray, H.J., Goff, B.A., 2016. Ovarian cancer outcomes: Predictors of early death. *Gynecol. Oncol.* 140, 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.12.021>
31. Ushijima, K., 2010. Treatment for Recurrent Ovarian Cancer—At First Relapse. *J. Oncol.* 2010, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2010/497429>
32. Wagner, U., Reuß, A., 2019. S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren“: Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: Langversion 3.0, 2019, AWMF-Registernummer: 032/035OL. *Forum (Genova)* 34, 413–415. <https://doi.org/10.1007/s12312-019-00671-4>
33. Walenta, J.H., Didier, A.J., Liu, X., Krämer, H., 2001. The Golgi-Associated Hook3 Protein Is a Member of a Novel Family of Microtubule-Binding Proteins. *J. Cell Biol.* 152, 923–934. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.5.923>
34. Wallwiener, D., Grischke, E.-M., Brucker, S.Y., Taran, F.-A., Bastert, G., 2017. *Gynäkologische Onkologie*, 8th ed. Schattauer, Stuttgart.
35. Wang, L., Wenners, A., Hilpert, F., Fredrik, R., Micci, F., Onkes, W., Caliebe, A., Maass, N., Weimer, J., Arnold, N., 2014. Frequent translocations of 11q13.2 and 19p13.2 in ovarian cancer: Fusions Of 11Q13.2 and 19P13.2 in Ovarian Cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 53, 447–453. <https://doi.org/10.1002/gcc.22152>
36. Weberpals, J.I., 2011. Breast cancer 1 (BRCA1) protein expression as a prognostic marker in sporadic epithelial ovarian carcinoma: an NCIC CTG OV.16 correlative study. *Ann. Oncol.* 22, 8.
37. Wei, S., Li, H., Zhang, B., 2016. The diagnostic value of serum HE4 and CA-125 and ROMA index in ovarian cancer. *Biomed. Rep.* 5, 41–44. <https://doi.org/10.3892/br.2016.682>
38. Yoshida, K., Miki, Y., 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 95, 866–871. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x>

39. Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., Yu, X., 2009. PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Curr. Biol.* 19, 524–529. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.018>
40. Zheng, G., Yu, H., Kanerva, A., Försti, A., Sundquist, K., Hemminki, K., 2018. Borderline Ovarian Tumors Share Familial Risks with Themselves and Invasive Cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 27, 1358–1363. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0503>

7 Danksagung

Mein Dank gilt Professor Dr. Norbert Arnold und Dr. Jörg Weimer. Sie haben mich sowohl im Labor als auch auf dem Weg der Auswertung, der Analyse und des Schreibens meiner Dissertation begleitet, motiviert und unterstützt. Ich möchte auch meinen Mitdoktoranten Friederike Mengelkamp und Dr. Jacob Kölln für die gemeinsame Zeit im „Onkolabor“ der Frauenklinik in Kiel danken. Regina Fredrik danke ich für ihre Anleitung im Labor und für ihre herzliche und persönliche Begleitung.

Einen besonderen Dank möchte ich all den Frauen aussprechen, die ihre Einwilligung zur Nutzung ihrer Daten gegeben und ihr Tumorgewebe der Forschung zur Verfügung gestellt haben. Der überwiegende Anteil wird diese Erkrankung nicht überlebt haben.

Ich danke Euch, meinen wunderbaren Eltern für all die Möglichkeiten, die Ihr mir eröffnet habt. Ihr habt mich immer bestärkt, alles zu versuchen und meinen Wünschen zu folgen.

Ich danke Dir, Kristine, dafür, dass Du mich anregst, immer wieder bestehende Normen und Konventionen zu hinterfragen.

Ich danke Dir, Jakob, dafür, dass es Dich gibt und Du meine Ideen und Lebensträume mitträgst und manchmal meine Bodenhaftung sicherstellst.

Ich danke Euch, Matilda und Juna, dafür, dass ich Eure Mutter sein darf. Ihr seid mein großes Glück.

„Das Erste, das der Mensch im Leben vorfindet, das Letzte, wonach er die Hand ausstreckt, das Kostbarste, was er im Leben besitzt, ist die Familie.“ (unbekannt)

8 Akademischer Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist diese Seite leer.

9 Veröffentlichung

Knolle C, Weimer J, Maass N, Jonat W, Arnold N. Appearance of *ACTN3* in ovarian cancer tissue and its correlation with *BRCA1*. Abstract und Präsentation im Rahmen des 12. Wissenschaftlichen Online-Symposiums der Kommission Translationale Forschung vom 27.-28. November 2020 unter der Leitung von Prof. Dr. P. Fasching, Prof. Dr. N. Arnold, Prof. Dr. T. Fehm