

Frauenklinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Tumorgenetische Abteilung
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. Kiechle)

**Der Tumorsuppressor KAI1 und seine Spleißvariante
im Ovarialkarzinom
Genexpressionsanalysen**

Julia Simone Jüssen

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Meindl
2. Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 02.10.2015 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.09.2016
angenommen.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Poster:

Julia Rothmeier, Stephanie Schlaugk, Viktor Magdolen, Matthias Kotsch, Marion Kiechle, Alfons Meindl, Ute Reuning, Eva Gross. Prognostische Rolle des Metastasierungssuppressors KAI1 (CD82) beim Ovarialkarzinom. 60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie, München (2014)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Ovarialkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klassifikation	2
1.1.2.1 Histopathologische Einteilung	2
1.1.2.2 Stadieneinteilung	2
1.1.2.3 Grading	4
1.1.2.4 Klassifikation nach Karzinogenese	4
1.1.3 Karzinogenese	5
1.1.3.1 Veränderungen der Genaktivität.....	5
1.1.3.2 Endokrinologische Faktoren	8
1.1.3.3 Umweltfaktoren	8
1.1.3.4 Metastasenbildung.....	9
1.2 Untersuchte Gene	10
1.2.1 KAI1	10
1.2.1.1 Struktur und Funktion.....	10
1.2.1.2 Bedeutung im Ovarialkarzinom.....	12
1.2.2 KAI1 Spleißvarianten	14
1.2.2.1 Der Spleißprozess	14
1.2.2.2 Die Spleißvariante delta-7 von KAI1	16
1.2.3 Das Integrin $\alpha v \beta 3$	18
1.2.3.1 Integrine	18
1.2.3.2 Die Rolle der Integrine im Ovarialkarzinom	18
1.2.3.3 Interaktion von KAI1 mit Integrinen.....	19
2. Zielsetzung.....	20
3. Material und Methoden	21
3.1 Patientenkollektiv	21
3.1.1 Proben D1-D103	21
3.1.2 Proben M1-M11	21
3.1.3 Zelllinien.....	21
3.1.4 Klinische Daten der Primärtumoren.....	22
3.1.5 Klinische Daten zu den Metastasengeweben	23

3.2	Material	24
3.3	Methoden	25
3.3.1	RNA Isolation	25
3.3.1.1	RNA Konzentrationsbestimmung	27
3.3.1.2	Gelelektrophorese	27
3.3.2	cDNA Synthese	28
3.3.3	Genexpressionsanalyse mittels TaqMan	30
3.3.3.1	Testung der Primer und Sonden	30
3.3.3.1.1	PCR	31
3.3.3.1.2	Gelelektrophorese	32
3.3.3.2	TaqMan Realtime Analyse	32
3.3.3.3	Funktionsweise ABI PRISM 7000	36
3.4	Datenanalyse	38
3.4.1	Angleichung der Messdaten	38
3.4.2	Relative Quantifizierung	38
3.4.3	Effizienzbestimmung	39
3.5	Statistische Auswertung	41
4.	Ergebnisse	42
4.1	Analyse öffentlicher Datensätze	42
4.2	Etablierung der Genexpressionsanalysen	44
4.2.1	Unterscheidung der Transkripte des Wildtyps von KAI1 und seiner Spleißvariante	44
4.2.2	TaqMan	45
4.2.3	Effizienzbestimmung der RT-PCR	46
4.3	Messung der Genexpression von KAI1-wt, KAI1-splice und ITGAV	48
4.3.1	Allgemeine Ergebnisse	48
4.3.2	KAI1-Wildtyp	50
4.3.2.1	Assoziation zwischen der KAI1-wt Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen	50
4.3.2.2	KAI1-wt als prognostischer Faktor	50
4.3.2.3	Vergleich von Primärtumoren und Metastasen	52
4.3.3	Die Spleißvariante KAI1-splice	54
4.3.3.1	Assoziationen zwischen der KAI1-splice Expression und klinisch- pathologischen Merkmalen	54
4.3.3.2	KAI1-splice als prognostischer Faktor	54
4.3.3.2.1	Untergruppe M0	56

4.3.3.3	Vergleich von Primärtumoren und Metastasen.....	58
4.3.4	Integrin αv	60
4.3.4.1	Assoziation zwischen der ITGAV Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen	60
4.3.4.2	ITGAV als prognostischer Faktor.....	60
4.3.4.3	Vergleich von Primärtumoren und Metastasen.....	62
5.	Diskussion.....	64
5.1	Diskussion der Methoden.....	64
5.1.1	TaqMan RT-PCR.....	64
5.1.2	Effizienz der PCR-Reaktionen.....	65
5.1.3	Relative Quantifizierung.....	66
5.1.4	Housekeeper.....	67
5.2	Erörterung der Ergebnisse und Einordnung in die Studienlage.....	69
5.2.1	Allgemeine Betrachtungen.....	69
5.2.2	Prognostischer Einfluss.....	72
5.2.3	Expression von KAI1, KAI1-splice und ITGAV in Metastasen.....	79
5.2.4	Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Merkmalen.....	81
5.3	Ausblick.....	83
6.	Zusammenfassung.....	84
7.	Verzeichnisse.....	86
7.1	Literaturverzeichnis.....	86
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	92
7.3	Tabellenverzeichnis.....	94
8.	Anhang.....	96
9.	Danksagung.....	106

Abkürzungen:

ALAS1	Aminolävulinatsynthase 1
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BRCA	<i>BReast CAncer gene</i> , Brustkrebsgen
CA	<i>Carcinoma</i> , Karzinom
CA 125	Cancer Antigen 125, Tumormarker
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
Cp	<i>cut point</i> , Trennpunkt
ct	<i>cycle threshold</i> , Schwellenwertzyklus
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
E	Effizienz
EGFR	<i>epidermal growth factor rezeptor</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i> , Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde
HNPCC	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i> , hereditäre nicht-polypöses Kolonkarzinom
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HK	Housekeeper
HR	Hazard Ratio
Inf	<i>infinity</i> , unendlich
ITGAV	Integrin αv
KAI1-wt	Wildtypvariante des KAI 1 Gens
KAI1-splice	Spleißvariante des KAI 1 Gens
KASP	KAI1/CD82-associated surface protein
KI	Konfidenzintervall
KITENIN	KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin
KM-Plotter	Kaplan-Meier Plotter
m	Steigung
min	Minuten
Mon	Monate
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
PCR	<i>polymerase cain reaktion</i> , Polymerase Kettenreaktion
Q	Quantität

r	<i>ratio</i> , normalisierte Expressionswerte
rel.	relativ
RNA	<i>ribonukleinacid</i> , Ribonukleinsäure
RT-PCR	real time PCR
sek	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TNM	Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> , Internationalen Vereinigung gegen Krebs
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispie

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit erkranken jedes Jahr ca. 200 000 Frauen an Eierstockkrebs [Engel *et al.* 2007]. In Deutschland betrug im Jahr 2008 die Anzahl der Neuerkrankungen 7790, dies entspricht etwa 3,5% aller bösartigen Tumorerkrankungen bei Frauen. Damit sind die Eierstöcke nach Brust, Darm, Lunge, Gebärmutterkörper und dem malignen Melanom der Haut die sechsthäufigste Tumorlokalisation der Frau. Es verstarben 2008 5529 Frauen am Ovarialkarzinom, das relative 5-Jahres-Überleben ist im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen ungünstig und beträgt derzeit nur ca. 40%. In der Liste der tumorassoziierten Todesfälle steht das Ovarialkarzinom sogar an fünfter Stelle, nach Brust-, Darm-, Bronchial- und Pankreaskarzinom [GEKID 2012].

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren. Höheres Alter ist dabei einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Eierstockkrebs. Weiterhin steigern Umwelt- und Ernährungsfaktoren (z.B. Adipositas) sowie hormonelle Faktoren (Kinderlosigkeit, medikamentöse Ovulationsauslösung und polyzystische Ovarien) das Risiko. Protektiv hingegen wirken eine dauerhafte Einnahme von Ovulationshemmern und die Zahl der Schwangerschaften [Engel *et al.* 2007].

Obwohl ca. 90% aller Ovarialkarzinome sporadisch entstehen, erhöhen auch bestimmte genetische Anlagen das Risiko zu erkranken. So ist die Erkrankung beispielsweise in 5-10% der Fälle auf eine Keimbahnmutation der Gene BRCA1 oder BRCA2 zurückzuführen [Kuschel *et al.* 2006]. Auch Mutationsträgerinnen des HNPCC und p53 Gens haben ein stark erhöhtes Risiko zu erkranken [Schmalfeldt 2007].

Das Ovarialkarzinom zeigt keine Frühsymptome, da die Eierstöcke im kleinen Becken relativ frei beweglich sind und erst spät umliegende Strukturen beeinträchtigen [Stauber 2007]. Zudem erkranken Frauen häufig postmenopausal, sodass Störungen in der physiologischen Funktion des Ovars keine Symptome zeigen [Jacobs *et al.* 2004]. Häufig sind unspezifische Unterbauchbeschwerden und eine Zunahme des Bauchumfanges die ersten Symptome. Dies, sowie unzureichende Screening-Möglichkeiten, führen dazu, dass Patientinnen meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden: 70% im FIGO Stadium III oder

IV. Auch der Tumormarker CA 125 ist zum Screening ungeeignet, weil er eine niedrige Sensitivität und Spezifität hat [Schelling *et al.* 2007].

Bedeutsamster Schritt in der Therapie ist die Operation zur Zytoreduktion. Es konnte gezeigt werden, dass eine möglichst vollständige Entfernung des Tumors direkt proportional zum Gesamtüberleben ist [Bristow *et al.* 2002]. Meist schließt sich der Operation eine systemische Chemotherapie an. Derzeitiger Therapiestandard ist eine Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel über sechs Zyklen [Schmalfeldt 2007].

Der wichtigste prognostische Faktor ist das Tumorstadium bei Diagnose: Während 80-90% der Patientinnen im Stadium FIGO I fünf Jahre überleben, sind es bei den Patientinnen im Stadium FIGO III nur 25-40%. Bei den fortgeschrittenen Tumoren ist das Operationsergebnis von entscheidender Bedeutung. Aber auch die Histologie des Tumors, sowie Alter und Allgemeinzustand der Patientin beeinflussen die Prognose [Schmalfeldt *et al.* 2007].

1.1.2 Klassifikation

1.1.2.1 Histopathologische Einteilung

Die histologische Einteilung erfolgt anhand der WHO Klassifikation von 2003 in Oberflächenepithel-Stromatumoren (ca. 90%), Keimstrangstromatumoren (ca. 5-8%) und Keimzelltumoren (ca. 3-5%) [Schmalfeldt 2007]. In jeder dieser drei Hauptgruppen finden sich weitere Subtypen, so sind beispielsweise 75-80% der Oberflächenepithel-Stromatumoren vom serösen Typ, 10% vom muzinösen Typ, 10% vom endometrioiden Typ und weitere seltenere Subtypen [Holschneider *et al.* 2000].

1.1.2.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms erfolgt zum einen nach dem TNM-System der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC, Union internationale contre le cancer) und zum anderen nach der FIGO-Einteilung (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde). In Tabelle 1 sind beide Klassifikationssysteme

zusammengefasst. Dabei ist auch ersichtlich, dass sich die beiden Einteilungen größtenteils decken.

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms, modifiziert nach den Leitlinien der AWMF (www.awmf.org)

TNM		FIGO		Befundsituation
Tx				Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0				Kein Anhalt für Primärtumor
T1		I		Tumor begrenzt auf Ovarien
	T1a		IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
	T1b		IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
	T1c		IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor auf der Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2		II		Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
	T2a		IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
	T2b		IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
	T2c		IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen im Aszites oder Peritonealspülung
T3		III		Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
	T3a		IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
	T3b		IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, 2 cm oder kleiner
	T3c	und/ oder N1	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größer als 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
Mx				Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0				Keine Fernmetastasen
M1		IV		Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)
Nx				Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0				Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1				Regionäre Lymphknotenmetastasen

1.1.2.3 Grading

Um den Differenzierungsgrad eines Gewebes anzugeben werden Gewebsarchitektur, Kernmorphologie sowie Mitosezahl beurteilt. Daraus ergeben sich die Grade G1-G4 nach folgendem Einteilungssystem:

Tabelle 2: Grading nach UICC

G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Laut WHO-Klassifikation werden dabei G1 und G2 Tumoren auch als „low-grade“ Tumoren, G3 und G4 Tumoren als „high-grade“ Tumoren bezeichnet.

Für Ovarialtumoren gibt es zusätzlich noch ein spezifisches Grading-System von Silverberg, welches für die einzelnen Faktoren (Gewebsarchitektur, Kernmorphologie, Mitosezahl) jeweils ein bis drei Punkte vergibt und anschließend in drei Differenzierungsgrade (gut, mäßig und schlecht differenziert) einteilt [Schmalfeldt 2007].

1.1.2.4 Klassifikation nach Karzinogenese

Shih und Kollegen entwarfen ein Modell, bei dem epitheliale Ovarialkarzinome in Typ I und Typ II Tumoren mit unterschiedlicher Karzinogenese eingeteilt werden [Shih *et al.* 2004].

Typ I Tumoren sind benigner und werden öfters in einem frühen Stadium diagnostiziert. Sie entstehen schrittweise aus Borderline-Tumoren, diese wiederum aus Zystadenomen und Adenofibromen. Zu dieser Gruppe gehören die mikropapillärserösen, die muzinösen, die endometrioiden und die klarzelligen Karzinome [Kurman *et al.* 2008]. Klinische Merkmale sind jüngeres Alter bei Diagnose, längeres Gesamtüberleben sowie eine relative Resistenz gegenüber Carboplatin und Taxol [Lengyel 2010].

Typ II Tumoren sind hingegen aggressiver, wachsen schneller und werden häufig in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Ihnen kann keine Vorgängerläsion zugeordnet werden und man geht davon aus, dass sie entweder direkt aus dem

Epithel entstehen, oder die Entwicklung so rapide vor sich geht, dass Zwischenstufen nicht erfasst werden können. Typ II Tumoren sind genetisch instabiler als Typ I Tumoren. Seröse „high-grade“ Karzinome und undifferenzierte Karzinome gehören zu dieser Gruppe [Shih *et al.* 2004; Kurman *et al.* 2008]. Klinisch finden sich Typ II Tumoren meist bei postmenopausalen Frauen und sprechen anfangs recht gut auf platinhaltige Chemotherapie an, zeigen aber dennoch ein geringeres Gesamtüberleben als Patientinnen mit Typ I Tumoren [Lengyel 2010].

Gestützt wird dieses Modell von der molekulargenetischen Beobachtung, dass bestimmte Genmutationen, nämlich B-Raf oder K-Ras, in 65% der Typ I Tumoren aber fast nie in Typ II Tumoren gefunden werden. Umgekehrt verhält es sich mit p53 und HLA-G Genmutationen, welche sich in mehr als der Hälfte der Typ II Tumoren finden, aber fast nie in Typ I Tumoren [Shih *et al.* 2004]. Circa 75% der auftretenden Ovarialkarzinome sind Typ II Tumoren [Kurman *et al.* 2008].

1.1.3 Karzinogenese

Wie genau das Ovarialkarzinom entsteht ist nicht endgültig geklärt. Prinzipiell sind mehrere Schritte nötig, bis einer Zelle entartet und ein Karzinom entsteht [Ponder 2001]. Es wird von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen, bei dem genetische, epigenetische, endokrinologische und Umweltfaktoren zur Karzinogenese beitragen [Holschneider *et al.* 2000; Damania *et al.* 2013].

1.1.3.1 Veränderungen der Genaktivität

Sowohl genetische als auch epigenetische Mutationen können zu einer Veränderung der Genaktivität führen. Wenn eine Zellpopulation durch Akkumulation solcher Veränderungen die Fähigkeit erlangt, sich der normalen Kontrolle von Proliferation und Apoptose zu entziehen, kann Krebs entstehen [Ponder 2001]. Meist entstehen diese Mutationen in somatischen Zellen. Es gibt aber auch erbliche Tumorsyndrome, bei welchen eine Mutation schon auf Keimbahnebene geschieht. Im Falle des Ovarialkarzinoms betrifft dies vor allem die Gene BRCA1 und BRCA2 sowie Mismatch-Repair-Gene (z.B. MLH1, MSH2) [Schmalfeldt 2007].

Es gibt vor allem zwei Gruppen von Genen, welche bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen: (Proto-)Onkogene und Tumorsuppressorgene [Chuaqui *et al.* 1998; Holschneider *et al.* 2000; Hogdall *et al.* 2008].

Onkogene

(Proto-)Onkogene kodieren für Proteine, welche in normalen Zellen das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung kontrollieren und fördern. Sie werden durch den Zugewinn von Funktion (*„gain-of-function“*) zu Onkogenen [Ponder 2001]. Dies bedeutet, dass es über verschiedene Mechanismen, wie Mutation, Translokation und Amplifikation, zu einer Überexpression und/oder zu gesteigerter Aktivität dieser Gene und somit zu unkontrolliertem Zellwachstum kommt [Chuaqui *et al.* 1998; Matias-Guiu *et al.* 1998].

Für das Ovarialkarzinom sind mehrere Onkogene beschrieben. So findet man in bis zu 34% aller Tumoren eine Überexpression von Her2/neu, bei ca. 30% von K-Ras und auch C-Myc ist häufig verändert [Matias-Guiu *et al.* 1998; Aunoble *et al.* 2000; Holschneider *et al.* 2000; Hogdall *et al.* 2003]. Das Her2/neu (Human Epidermal Growth factor receptor-2) Onkogen ist ein Oberflächenprotein, welches als Zellrezeptor für Wachstumsfaktoren fungiert und über welches Zellproliferation gefördert und Apoptose gehemmt werden [Matias-Guiu *et al.* 1998; Hogdall *et al.* 2003]. Eine erhöhte Her2/neu Expression scheint im Ovarialkarzinom zudem mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein [Hogdall *et al.* 2003].

Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene haben normalerweise einen hemmenden Effekt auf die Proliferation und schützen die Zelle vor unkontrolliertem Wachstum [Chuaqui *et al.* 1998]. Ein Funktionsverlust (*„loss-of-function“*) durch Ereignisse wie Punktmutation und Deletion führt zur Karzinogenese [Marshall 1991]. Allerdings sind zur vollständigen Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens laut der *„Two Hit Hypothese“* von [Knudson 1971] zwei Ereignisse nötig. Zum Funktionsverlust kommt es nur dann, wenn beide Allele betroffen sind. Da der Verlust dieser Allele häufig mit einem Verlust von genetischem Material verbunden ist, können durch *„loss of heterozygosity“* (=LOH) Analysen Orte für ein wahrscheinliches Vorkommen von Tumorsuppressorgenen untersucht werden [Ponder 2001]. Beim Ovarialkarzinom scheinen diese vor allem auf Chromosom 17 zu liegen [Chuaqui *et al.* 1998].

Beispiele für wichtige Tumorsuppressorgene im Ovarialkarzinom sind das BRCA1 und das p53 Gen. Man findet eine Mutation des DNA-Reparaturgenes BRCA1 in bis zu 30% der familiären und bis zu 10% der sporadischen Ovarialkarzinome [Aunoble *et al.* 2000; Holschneider *et al.* 2000]. Auch das p53 Gen ist in ca. 30% mutiert [Holschneider *et al.* 2000], es hat eine wichtige Funktion in der Regulation des Zellzyklus, verhindert überschießende Zellteilung und reguliert die Apoptose [Matias-Guiu *et al.* 1998; Holschneider *et al.* 2000; Hogdall *et al.* 2008].

Epigenetische Faktoren

Durch Methylierung von Promoter- und/oder Startregionen der DNA kann die Transkription und damit auch die Aktivität von Genen gedämpft werden. Störungen in diesem Mechanismus können zu einem Verlust dieser genetischen Prägung („*loss of imprinting*“) und zu einer Überexpression von Genen führen, welche dann als Onkogene fungieren können [Ponder 2001].

Weitere Faktoren: Mikrosatelliteninstabilität und Micro-RNA

Mikrosatelliten sind kurze, sich oft wiederholende DNA Sequenzen. Sie spielen eine Rolle bei der Funktion von DNA-Mismatch-Reparatur-Genen, deren Störung häufig beim erblichen nicht-polypösen Darmkrebs (=HNPCC) beobachtet wird. Die Tatsache, dass HNPCC Patienten auch ein stark erhöhtes Risiko haben, am Ovarialkarzinom zu erkranken, könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Mikrosatelliteninstabilität auch hier eine Rolle spielt [Matias-Guiu *et al.* 1998].

Neue Studien suggerieren, dass auch sogenannte Micro-RNA eine Rolle in der Tumorgenese des Ovars spielen könnten. Micro-RNAs sind 20-22 Nukleotid große RNA Stücke, welche nicht für Proteine kodieren. Sie können posttranskriptionell zur Genregulation beitragen, indem sie die Translation von mRNA inhibieren und/oder deren Stabilität beeinflussen [Dahiya *et al.* 2010]. Da manche Micro-RNAs in Tumorgewebe herabreguliert und andere heraufreguliert sind, wird angenommen, dass sie entweder als Tumorsuppressor oder als Onkogen wirken können.

1.1.3.2 Endokrinologische Faktoren

Systemisch erhöhte Wachstumsfaktoren und Hormonspiegel, vor allem von Östrogen, sind im allgemeinen mit einem erhöhten Tumorrisiko verbunden [Ponder 2001]. Bei der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms scheinen auch erhöhte Gonadotrophin- und Androgen-Konzentration, vor allem von DHEA (Dehydroepiandrosteron), eine wichtige Rolle zu spielen [Holschneider *et al.* 2000].

1.1.3.3 Umweltfaktoren

Eine Theorie zur Entstehung des epithelialen Ovarialkarzinoms wurde 1971 von Fathalla und Kollegen aufgestellt [Fathalla 1971]. Dabei wird davon ausgegangen, dass es bedingt durch das ständige Reißen des epithelialen Gewebes der Ovarien bei der Ovulation und die daraus resultierenden Reparaturvorgänge zu genetischer Instabilität kommt. Es besteht somit ein erhöhtes Risiko für Mutationen. Auch eine Exposition des Epithels mit östrogenreicher Flüssigkeit aus dem Follikel könnte die Proliferation anregen. Das Einreißen des Epithels führt zudem dazu, dass sich kleine Zysten einstülpen. Es wird angenommen, dass das Ovarialkarzinom aus diesen kleinen Zysten entsteht [Matias-Guiu *et al.* 1998]. Diese Theorie der ständigen Ovulation von Fathalla kann einige der Umwelt- bzw. Risikofaktoren erklären, z.B. dass die Anzahl der ovulatorischen Zyklen mit dem Risiko, an Ovarialkrebs zu erkranken, korreliert und dass Geburten, also Unterbrechungen der Ovulation, protektiv wirken [Holschneider *et al.* 2000].

Widersprüchlich hingegen ist die Beobachtung, dass Infertilität ebenfalls mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist, am Ovarialkarzinom zu erkranken [Holschneider *et al.* 2000].

Da es bislang nicht gelungen ist, eine präkanzeröse Läsion in den Ovarien zu identifizieren, wurden auch andere Ursprungsorte für das Ovarialkarzinom vermutet [Lengyel 2010]. So geben neueste Studien Hinweise darauf, dass die Einschlusszysten nicht nur aus epithelialelem Gewebe bestehen können, sondern dass während der Ovulation die Tuben in so engen räumlichen Kontakt zum Ovar kommen, dass sich Zellen der Tuben auf der Epitheloberfläche und in den Einschlusszysten implantieren. Diese Zellen könnten ebenfalls Ursprung des Ovarialkarzinoms sein, was bedeuten würde, dass der Ursprung außerhalb des Ovars liegt [Lengyel 2010; Kurman *et al.* 2011]. Das den Intrapertonealraum

bedeckende Mesothel wird als weiterer möglicher Ursprungsort ebenfalls in Erwägung gezogen [Lengyel 2010]

1.1.3.4 Metastasenbildung

Generell sind für die Entstehung von Metastasen mehrere Dinge notwendig: Zuerst müssen sich Tumorzellen von den umgebenden Zellen und der Extrazellulärmatrix (EZM) lösen. Danach muss das umliegende Gewebe arrodirt werden, damit sich die Tumorzellen über die Blut- und Lymphgefäße im Körper verteilen können [Felding-Habermann 2003]. Nach der Migration aus den Gefäßen müssen sich die Zellen im Zielgewebe wieder an der EZM anhaften um weiter proliferieren zu können. Hat die Metastase eine bestimmte Größe erreicht, ist die Induktion der Angiogenese nötig weil Diffusion zur Versorgung der Metastase dann nicht mehr ausreicht [Felding-Habermann 2003; Guo *et al.* 2004].

Ähnlich der Tumorsuppressorgene, gibt es auch sogenannte „*metastasis suppressor genes*“, also Gene, welche die Entstehung von Metastasen unterdrücken [Mooez *et al.* 2011].

Besonderheiten im Ovarialkarzinom

Die Mehrheit der Ovarialkarzinom Patientinnen hat bei Diagnose bereits Metastasen im Intraoperitonealraum, vorwiegend im Bereich des Omentum majus, des Zwerchfells sowie dem unteren Teil des kleinen Beckens [Stauber 2007; Lengyel 2010]. Die Verteilung der Metastasen innerhalb der Peritonealhöhle und zum Omentum geschieht vermutlich passiv über ein „mitschwimmen“ im Ascites und scheint wesentlich wichtiger zu sein, als die Streuung von Metastasen über Gefäße, welche beim Ovarialkarzinom vergleichsweise selten beobachtet wird [Lengyel 2010]. Dennoch spielen viele der grundlegenden Mechanismen auch hier eine wichtige Rolle. Nachdem die Ablösung vom Primärtumor erfolgt ist, müssen sich die Zellen an neuer Stelle implantieren, Metalloproteinasen zerkleinern dazu Teile der Extrazellulärmatrix um eine bessere Adhäsion über Fibronectin- und Vitronectin-Rezeptoren erzielen zu können und schließlich muss eine Blutversorgung sichergestellt werden [Lengyel 2010].

1.2 Untersuchte Gene

1.2.1 KAI1

1.2.1.1 Struktur und Funktion

KAI1 wurde erstmals von Dong und Kollegen bei Untersuchungen von metastasierenden und nicht-metastasierenden Zellen des Prostatakarzinoms im Rattenmodell entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass KAI1 die Zahl der Lungenmetastasen reduziert, nicht jedoch das Wachstum des Primärtumors beeinflusst. Zudem wurden im Gewebe von metastasierten Prostatakrebszellen niedrigere KAI1 Expressionswerte gefunden als in prostatistischem Normalgewebe [Dong *et al.* 1995].

Da KAI1 zuvor bereits als Oberflächenprotein auf menschlichen Lymphozyten nachgewiesen wurde, wird es auch CD 82 genannt. Dort spielt es eine Rolle in der Aktivierung von T-Zellen [Lebel-Binay *et al.* 1995].

Das KAI1 Gen befindet sich auf der Region p11.2 von Chromosom 11 und besteht aus 10 Exons und 9 Introns [Dong *et al.* 1995; Jackson *et al.* 2005]. Sein Genprodukt besteht aus 267 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 29,610 Dalton [Dong *et al.* 1995]. Das Glykoprotein durchquert die Zellmembran viermal (Abbildung 1), gehört somit zur Transmembran-4-Superfamilie und bildet dabei eine große und eine kleine extrazelluläre Schleife [Jackson *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006]. Entscheidend für die Konfiguration der großen Schleife sind die drei Disulfidbrücken, welche sich zwischen sechs Cysteinresten ausbilden [Tsai *et al.* 2011].

In vielen weiteren menschlichen Geweben konnten sowohl das KAI1 Gen, als auch sein Genprodukt nachgewiesen werden [Dong *et al.* 1995]. Es zeigte sich, dass eine Herabregulation von KAI1 mit fortgeschrittenen Tumoren und einer schlechten Prognose assoziiert ist [Tonoli *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006]. Bei niedriger KAI1 Expression zeigen sich ein erhöhtes Potential zur Bildung von Metastasen sowie eine gesteigerte zelluläre Invasivität [Jackson *et al.* 2007]. Dies lässt darauf schließen, dass KAI1 die Entstehung von Metastasen vor allem dadurch unterdrückt, dass es das Ablösen von entarteten Zellen vom Primärtumor hemmt sowie deren Migration und Invasion schwächt [Liu *et al.* 2006; Mooez *et al.* 2011]. Gründe hierfür sind ein verändertes Adhäsionsverhalten von Zellen gegenüber der

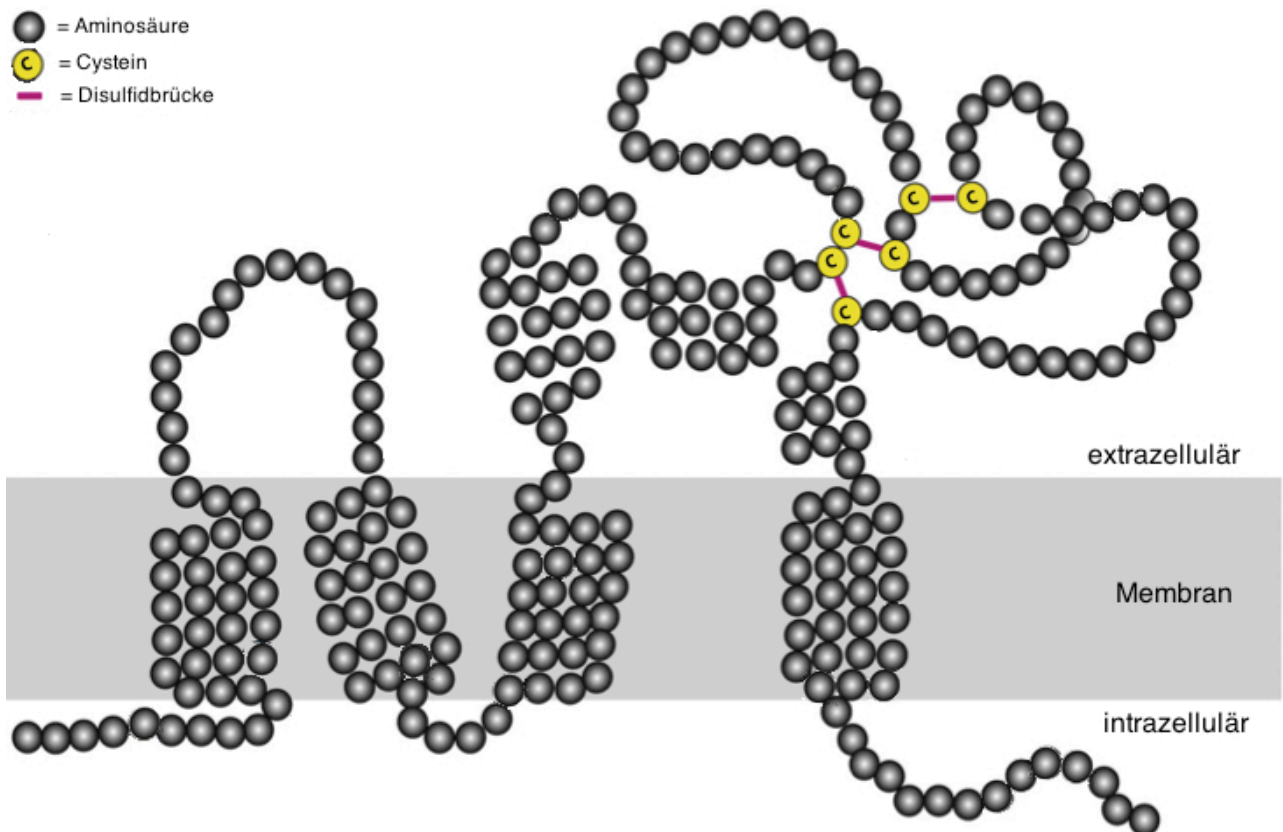


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur von KAI1, Modifiziert nach [Tsai *et al.* 2011]

Extrazellulärmatrix, verminderte Zell-Zell Interaktionen und gesteigerte Zellbeweglichkeit bei Verlust von KAI1 [Jackson *et al.* 2005]. Auch eine gesteigerte extrazelluläre Proteolyse kann bei Herabregulation von KAI1 beobachtet werden und begünstigt im Allgemeinen die Ausbreitung von Metastasen [Tsai *et al.* 2011]. Zudem kann KAI1, zumindest bei Überexpression, auch die Induktion von Apoptose in Zellen bewirken [Liu *et al.* 2006].

Die grundlegenden Mechanismen für diese Funktionen sind noch nicht verstanden. Da KAI1 selbst keine enzymatische Aktivität aufweist wird angenommen, dass es an mehreren Stellen über Interaktionen mit anderen Proteinen deren Funktion verstärkt oder abschwächt und so in die Regulation vieler Zellfunktionen eingreift [Liu *et al.* 2006; Miranti 2009]. So beschleunigt KAI1 beispielsweise die Internalisierung von Integrin $\alpha 6\text{-}\beta 1$ und EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Die folglich verringerte Menge dieser Proteine auf der Zelloberfläche hat eine verminderte Zelladhäsion und -migration zur Folge [Liu *et al.* 2006]. Des weiteren synergisiert KAI1 mit KASP

(*KAI1/CD82-associated surface protein*) und stärkt dessen Migrations-schwächende Eigenschaften [Zhang *et al.* 2003]. Invasions- und adhäsionsfördernde Signalwege wie der KATENIN (*KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin*) -Signalweg werden hingegen durch KAI1 inhibiert [Lee *et al.* 2004]. Die integrinvermittelte Invasivität von Tumorzellen kann auch über die Regulation von c-Met und Src-Kinase-Signalwegen durch KAI1 unterdrückt werden [Mooez *et al.* 2011].

Es scheint jedoch noch eine Vielzahl weiterer Komponenten im sogenannten „Tetraspanin Web“ (=Netz der Vierspanner) zu geben, mit denen KAI1 interagiert. Dazu gehören neben weiteren Integrinen auch Immunrezeptoren sowie Proteine zur intrazellulären Signaltransduktion (z.B. Proteinkinase C) [Liu *et al.* 2006].

Noch ist unklar, welcher Mechanismus zu einer Herabregulation des KAI1 Gens im Tumorgewebe führt. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass Mutationen im Gen selbst, der Verlust von Heterozygotität oder die Hypermethylierung von CpG-Inseln die wichtigste Ursache sind [Jackson *et al.* 2005; Jackson *et al.* 2007; Mooez *et al.* 2011; Tsai *et al.* 2011]. Auch ein Zusammenhang mit p53 ist immer noch umstritten, scheint aber zumindest nicht der ausschlaggebende Faktor zu sein [Jackson *et al.* 2000]. Es scheint wahrscheinlicher, dass Änderungen der Transkription, beispielsweise die verstärkte Expression von Spleißvarianten, sowie posttranslationale Veränderungen wie Glykosylierung und Palmitoylierung eine wichtige Rolle in der Herabregulation bzw. dem Funktionsverlust von KAI1 spielen [Miranti 2009; Tsai *et al.* 2011]. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass extrazelluläre Faktoren wie Zytokine, Phorbolester und der Nervenwachstumsfaktor („nerve growth factor“) die Expression von KAI1 mRNA steigern [Jackson *et al.* 2005; Miranti 2009].

1.2.1.2 Bedeutung im Ovarialkarzinom

KAI1 besitzt auch im gesunden Ovarialgewebe eine wichtige physiologische Funktion. Unterschiedliche Expressionsniveaus in den verschiedenen Phasen des Ovulationszykluses lassen darauf schließen, dass die Adhäsion von Zellen auf der Extrazellulärmatrix auch über KAI1 gesteuert wird und so die Eizellen während der Ovulation freigesetzt werden [Houle *et al.* 2002].

In humanen Ovarialkarzinom-Zellen scheint die Zellproliferation in Anwesenheit von KAI1 stark vermindert zu sein [Ruseva *et al.* 2009]. Man vermutet, dass die Metastasen-supprimierende Funktion von KAI1 u.a. über eine Interaktion mit Integrinen zustande kommt [Liu *et al.* 2006; Ruseva *et al.* 2009]. So konnte im

Ovarialkarzinom sowohl eine Kolo­kalisierung von KAI1 mit Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ auf der Zelloberfläche, als auch ein funktioneller Zusammenhang gezeigt werden. Die erhöhte Expression von KAI1 verstärkte die Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ /Vitronektin-abhängige Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen, was zu einer Beeinträchtigung der Motilität und Zellmigration führte [Ruseva *et al.* 2009].

Es konnte zudem gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Tumor-Grading und dem KAI1-Expressionsgrad sowie der Lokalisation des Genproduktes gibt: Während „*low-grade*“ Tumoren eine hohe KAI1 Expression, v.a. auf der Zellmembran zeigten, fand man bei „*high-grade*“ Tumoren eine niedrige KAI1 Expression auf der Zellmembran, dafür aber eine höhere Konzentration des Genprodukts intrazellulär [Houle *et al.* 2002]. Dies könnte ebenfalls eine Rolle beim Funktionsverlust von KAI1 spielen.

1.2.2 KAI1 Spleißvarianten

1.2.2.1 Der Spleißprozess

Durch Transkription entsteht im Zellkern eine Abschrift von kodierenden DNA-Abschnitten. Das Primärtranskript wird dabei hnRNA (heterogene nukleäre RNA) genannt, es enthält neben den kodierenden Exons auch Sequenzen, welche sich in der fertigen mRNA nicht wieder finden, sogenannte nichtkodierende Introns [Rassow 2008]. Durch Prozessierung wird die hnRNA schon während der Transkription zur mRNA [Kornblihtt *et al.* 2013]. Dieser Prozess umfasst das Capping (Anhängen eines methylierten Guanosinrestes am 5' Ende), das Spleißen (Entfernung der Introns) und die Polyadenylierung (Anhängen eines Polyadenylat-Schwanzes am 3' Ende) [Rassow 2008; Kornblihtt *et al.* 2013].

Der Ort des Spleißens wird Splicesosom genannt. Es besteht aus sogenannten *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNPs, aus snRNA und Protein), hnRNA und weiteren Spleißfaktoren (**Abbildung 2**). Die snRNPs binden bestimmte Konsensussequenzen an den Exon-Intron-Grenzen und der sogenannten Verzweigungsstelle im Intron, bringen dabei die Reaktionspartner in räumliche Nähe zueinander und katalysieren so eine chemische Reaktion mit zwei Umesterungen [Rassow 2008; Kornblihtt *et al.* 2013]. Als Ergebnis finden sich die zusammengefügte Exons sowie das frei gewordene Intron in Form eines sogenannten Lariats (Lassoform) welches rasch abgebaut wird [Black 2003; Rassow 2008].

Es wird geschätzt, dass etwa 60% der menschlichen Genprodukte dem alternativen Spleißen unterliegen [Black 2003; Faustino *et al.* 2003]. Dabei werden Exons unterschiedlich ausgewählt und zusammengefügt, sodass zell- und gewebsspezifische Isoformen von Proteinen entstehen. Dies trägt in großem Maße zur genetischen Vielfalt bei [Faustino *et al.* 2003; Rassow 2008]. Die Funktion dieser Isoformen kann nur geringfügig unterschiedlich, aber auch gegensätzlich oder ganz verloren sein [Havens *et al.* 2013]. Je nachdem, wie stark die Basensequenz einer Spleißstelle von der konservierten Konsensussequenz abweicht, wird sie regelmäßig genutzt (starke Spleißstelle) oder nur sporadisch (schwache Spleißstelle). Letztere werden über Spleiß-Verstärker und -Dämpfer reguliert, indem diese die Erkennung

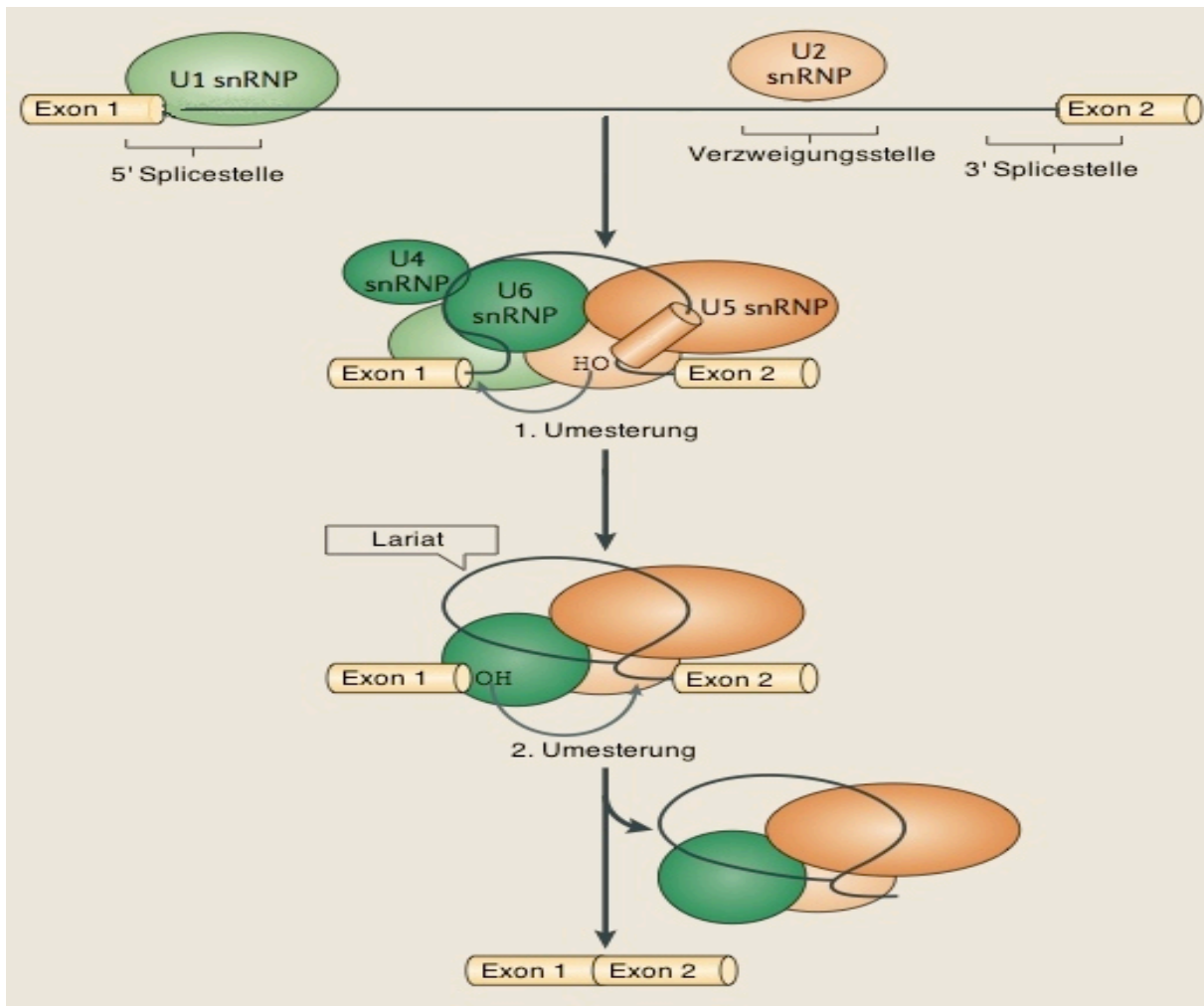


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Spleißens, modifiziert nach [Kornblihtt *et al.* 2013]
 Durch Bindung von snRNPs an Konsensussequenzen der hnRNA werden die Reaktionspartner in räumliche Nähe zueinander gebracht und die Reaktion katalysiert. Im ersten Schritt löst sich das Intron an der 5' Spleißstelle durch Ligation mit der Verzweigungsstelle und formt dabei das Lariat. Im zweiten Schritt greift das nun freie Ende des ersten Exons an der 3' Spleißstelle an, wodurch sich die beiden Exons verbinden und das Intron freigesetzt wird.

der Spleißstelle durch das Splicesosom und dessen korrekte Anordnung fördern oder hemmen und so das Spleißen regulieren [Kornblihtt *et al.* 2013; Martinez *et al.* 2013]. Es konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen Veränderungen des alternativen Spleißens und Neoplasien bzw. Metastasen gibt. Eine bestimmte Spleißvariante des CD44 Gens ist beispielsweise mit erhöhtem Metastasierungspotential assoziiert [Faustino *et al.* 2003].

1.2.2.2 Die Spleißvariante delta-7 von KAI1

Entdeckt wurde diese Spleißvariante des KAI1 Gens (KAI1-splice) erstmals von Lee und Kollegen in metastatischem Gewebe von Patienten mit Magenkarzinom. Auffällig war dabei, dass die Spleißvariante vor allem im Gewebe von Patienten mit schlechter Prognose gefunden wurde. In Gegensatz dazu konnte die Spleißvariante bei Patienten mit guter Prognose kaum nachgewiesen werden, ebenso wenig im umliegenden Normalgewebe. Demnach scheint ihre Expression mit schlechter Prognose zu korrelieren [Lee *et al.* 2003].

Die beschriebene Spleißvariante des KAI1 Gens ist durch Fehlen des Exon 7 charakterisiert. Dadurch verkürzt sich das fertige Protein um 28 Aminosäuren. Der fehlende Teil entspricht einer Sequenz, die vom distalen Teil der zweiten großen extrazellulären Schleife bis in den Übergang der vierten Transmembranregion reicht. Es verändern sich folglich die Konfiguration der zweiten Schleife sowie das COOH-Ende.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der Veränderung des Genprodukts von KAI1 durch die Spleißvariante, modifiziert nach [Lee *et al.* 2003]. Im rot markierten Bereich („Verlustregion“) befinden sich die Aminosäuren, die durch das Fehlen von Exon 7 wegfallen.

Daraus resultierende funktionelle Unterschiede ließen sich in verschiedenen Experimenten bestätigen. So zeigte die Spleißvariante im Vergleich zum Wildtyp eine schwächere Interaktion mit Integrin $\alpha 3\beta 1$, welches eine wichtige Funktion bei der Adhäsion an der Extrazellulärmatrix inne hat. Möglicherweise ist damit die verstärkte Bindung von Kolonkarzinomzellen an Fibronectin zu erklären, welche in Anwesenheit von KAI1-Wildtyp unterdrückt wurde, in KAI1-splice Zellen jedoch stark ausgeprägt war. Es wird angenommen, dass die Fibronectin-vermittelte, erhöhte Adhäsion zur

extrazellulären Matrix auch der Grund dafür ist, dass sich bei in-vitro Versuchen ein erhöhtes invasives Potential und eine erhöhte Motilität von KAI1-splice Zellen zeigten [Lee *et al.* 2003]. Darüberhinaus war KAI1-splice nicht mehr in der Lage, das Protein KITTENIN zu binden, welches metastasierungsfördernde Eigenschaften hat und normalerweise durch KAI1 in seiner Funktion blockiert wird [Lee *et al.* 2004; Jackson *et al.* 2007].

Die Injektion von Kolonkarzinomzellen in Mäuse führte bei Anwesenheit der Spleißvariante häufiger zur Ausbildung eines Tumors als beim Wildtyp. Dies spricht für ein erhöhtes Tumorrisiko aufgrund einer beeinträchtigten Tumorsuppressorfunktion von KAI1.

Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass die Expression der Spleißvariante KAI1-splice ein prognostischer Faktor für eine schlechte Prognose bei Krebspatienten sein könnte [Lee *et al.* 2003].

In Zellen von Brustkrebspatientinnen konnte kürzlich eine weitere Spleißvariante des KAI1 Gens nachgewiesen werden. Diese enthält einen Teil des Introns zwischen Exon 8 und Exon 9, welches zusätzlich ein Stop-Codon enthält. Es ist davon auszugehen, dass diese Isoform des KAI1 Gens ebenfalls funktionell eingeschränkt ist [Mooez *et al.* 2011].

1.2.3 Das Integrin $\alpha v \beta 3$

1.2.3.1 Integrine

Integrine sind transmembranöse Oberflächenproteine der Zelle. Als Heterodimere bestehen sie aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind [Felding-Habermann 2003; Guo *et al.* 2004]. Sie vermitteln einerseits eine mechanische Verbindung, beispielsweise zur Extrazellulärmatrix (EZM) und zu anderen Zellen, andererseits übertragen Integrine aber auch chemische Signale ins Zellinnere oder aus dem Zellinneren nach außen. Dies geschieht vermutlich dadurch, dass sie Bindungsstellen für verschiedene Faktoren darstellen und dadurch die Zelle in Bezug auf Adhäsion, Migration, Kontrolle der Proliferation und Apoptose beeinflussen können [Goldberg *et al.* 2001; Guo *et al.* 2004]. Da bei der Entstehung von Metastasen eine exakte Regulation der adhäsiven Kontakte nötig ist, scheinen Integrine hier eine bedeutende Rolle zu spielen. Der Verlust von adhäsiven Zellkontakten während der Ablösung von Tumorzellen vom Primärtumor könnte über die Expression von Integrinen reguliert sein [Hapke *et al.* 2003]. Auch über eine integrinvermittelte Aktivierung von Matrix Proteinasen können Zellkontakte zerstört sowie das umliegende Gewebe arrodirt werden, um Blut- und Lymphgefäße zu invasieren [Felding-Habermann 2003; Lengyel 2010]. Im Zielgewebe können integrinvermittelte, adhäsive Mechanismen dazu beitragen, dass sich die Tumorzellen wieder an der EZM festsetzen können, um weiter zu proliferieren. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Integrine auch bei der Angiogenese, welche zur Versorgung von Metastasengewebe mit Blut notwendig ist, beteiligt sind [Felding-Habermann 2003; Guo *et al.* 2004].

1.2.3.2 Die Rolle der Integrine im Ovarialkarzinom

$\alpha v \beta 3$ Integrine spielen eine entscheidende Rolle in der Initiation, Progression und Metastasierung des Ovarialkarzinoms. Gemeinsam mit Vitronektin und dem uPAR (Rezeptor des Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ) sind sie bei der Adhäsion von Karzinomzellen auf dem Mesothelium, involviert, wie es im frühen Stadium der Metastasierung geschieht [Hapke *et al.* 2001; Heyman *et al.* 2008].

Die αv Untereinheit findet sich im Gegensatz zu anderen Untereinheiten nicht nur in normalem Gewebe und gut differenzierten Ovarialtumoren sondern auch in wenig

differenzierten Tumoren [Reuning 2011]. Sie kann sich als einzige α -Untereinheit mit fünf verschiedenen β -Untereinheiten verbinden, nämlich $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 8$ [Maubant *et al.* 2005].

$\alpha v \beta 3$ und $\alpha v \beta 6$ Integrine scheinen im Allgemeinen die Tumorprogression zu fördern [Guo *et al.* 2004]. In fortgeschrittenen Ovarialkarzinom Stadien ist, passend dazu, die $\alpha v \beta 3$ Expression wesentlich höher als in niedrig malignen Tumoren [Hapke *et al.* 2001]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von $\alpha v \beta 3$ zu gesteigerter Zellproliferation und -adhäsion führt. Bindet Integrin $\alpha v \beta 3$ an seinen Hauptliganden Vitronektin, so ist auch die Zellbeweglichkeit stark erhöht [Hapke *et al.* 2003; Reuning 2011]. Eine andere Studie wiederum zeigte, dass die Überexpression von Integrin $\beta 3$ im Ovarialkarzinom die Zellinvasion hemmt, im Mausmodell die Anzahl der Metastasen vermindert und das Gewicht des Primärtumors vermindert. Die Autoren bewerteten Integrin $\alpha v \beta 3$ deshalb als Tumorsuppressor [Kaur *et al.* 2009].

1.2.3.3 Interaktion von KAI1 mit Integrinen

Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, scheint KAI1 an vielen Stellen mit Integrinen zu interagieren. So vermittelt KAI1 beispielsweise über Proteinkinasen die Phosphorylierung von $\beta 1$ -Integrinen und fördert die Internalisierung von Integrin $\alpha 6 \beta 1$ [Liu *et al.* 2006]. Über die Regulation von c-Met und Src-Kinase-Signalwegen kann KAI1 zudem eine integrinvermittelte Invasion unterdrücken [Mooez *et al.* 2011].

KAI1 und Integrin $\alpha v \beta 3$

In vorausgegangenen Studien unseres Instituts konnte von [Ruseva *et al.* 2009] gezeigt werden, dass Integrin $\alpha v \beta 3$ und KAI1 auf der Zelloberfläche in enger räumlicher Verbindung zueinander stehen. Dies lässt vermuten, dass beide Proteine auch funktionell zusammenarbeiten. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine erhöhte KAI1 Expression über ein Zusammenspiel mit der Integrinkette αv die Adhäsion von Zellen an der Extrazellulärmatrix, v.a. an Vitronektin, verstärkt. Dies resultierte in einer Verminderung der Zellmotilität bei erhöhter KAI1 Expression.

2. Zielsetzung

KAI1 ist als Tumor- und Metastasierungssuppressor bei verschiedenen Tumorentitäten beschrieben. Auch für das Ovarialkarzinom scheinen hohe Expressionswerte von KAI1-Wildtyp von prognostischem Vorteil zu sein [Liu *et al.* 2000; Schindl *et al.* 2001]. Welcher Mechanismus zu einer Herabregulierung von KAI1 führen könnte ist bislang unklar. Möglicherweise spielt hier u.a. ein verändertes Spleißverhalten im Tumor eine wichtige Rolle.

Ausgehend von der Entdeckung einer potentiell funktionslosen KAI1-Spleißvariante soll in der vorliegenden Arbeit deshalb untersucht werden, ob diese auch in Ovarialkarzinomgeweben nachgewiesen werden kann, ob es einen Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Merkmalen oder zur KAI1-Wildtyp-Expression gibt und ob die Spleißvariante prognostische Eigenschaften hat.

Es wird zudem vermutet, dass KAI1 mit αv -Integrinen interagiert. Es gibt sowohl Studien, welche αv -Integrine allgemein als Tumorsuppressoren sehen, als auch Studien, die einen tumorfördernden Einfluss zeigen. Diese Arbeit soll Hinweise darauf geben, welcher dieser Standpunkte zu unterstützen ist, ob und wie die ITGAV-Expression die Prognose beeinflusst und ob es eine Assoziation zu den KAI1 Isoformen gibt.

Mit Hilfe des TaqMan-Systems werden dazu mRNA-Expressionsanalysen für 100 Primärtumoren und sieben Metastasen durchgeführt. Nach relativer Quantifizierung der mRNA aus den Gewebeproben werden diese Daten zusammen mit klinischen Parametern statistisch ausgewertet.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit standen insgesamt 107 Gewebeproben von Ovarialkarzinomen zur Verfügung, welche sich aus 100 Primärtumoren und 7 Metastasen aus dem Omentum majus und dem Uterus zusammensetzten. Alle Proben stammen von Patientinnen, die am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München behandelt wurden. Die Proben wurden im Zuge der Operation entnommen und die zugehörigen klinischen Daten in der OVCA Datenbank (Version 7.4) der Frauenklinik TU München festgehalten. Dies geschah im Zeitraum von 23.1.1990 bis 26.1.2011.

Die Proben für diese Arbeit wurden nach Verfügbarkeit ausgewählt.

3.1.1 Proben D1-D103

Aus 97 Gewebeproben wurde im Labor von Dr Matthias Kotzsch, Institut für Pathologie der Universität Dresden, für diverse Forschungsprojekte RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Aliquots wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Bei allen Proben handelte es sich um Primärtumoren.

3.1.2 Proben M1-M11

Von 10 Geweben lag bereits isolierte RNA vor (Arbeitsgruppe Dr. Groß, Frauenklinik) und wurde wie unter 3.3.2 beschrieben in cDNA umgeschrieben. Diese Proben wurden zusätzlich auch zur Etablierung der RT-PCR verwendet. Drei dieser Tumoren sind Primärtumoren, 6 Metastasen aus dem Omentum majus und eine Metastase aus dem Uterus.

3.1.3 Zelllinien

Aus vorausgegangenen Versuchen von [Ruseva *et al.* 2009] standen Ovarialkarzinom-Zellen der Linie OVMZ 6 zur Verfügung, welche mit Hilfe von Vektoren zur Überexpression verschiedener Gene gebracht wurden (siehe Tabelle). Auch eine genaue Beschreibung der Methode hierfür findet sich in den Vorversuchen [Hapke *et al.* 2001]. Aus diesen Zellen wurde RNA selbst isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die Etablierung der Methoden sowie als Plattenstandard zur Normalisierung unterschiedlicher TaqMan-Experimente genutzt.

Tabelle 3: Merkmale Zelllinien

Name	Merkmal
S1	Überexpression von Integrin $\alpha v \beta 3$
S2	Überexpression von KAI1-Wildtyp
S3	Vektor - Kontrolle
S4	unverändert
S5	Überexpression von KAI1-Spleißvariante

3.1.4 Klinische Daten der Primärtumoren

Es wurden Gewebeproben von 100 malignen Ovarialtumoren verwendet. Die klinischen Daten stammen aus der OVCA Datenbank (Version 7.4) der Frauenklinik der TU München.

Die mittlere Beobachtungszeit betrug 43,46 Monate, dabei war die minimale Beobachtungszeit 1 Monat und die maximale Beobachtungszeit 186 Monate. Während dieser Zeit verstarben 80 Patientinnen (80%).

Nach einer Kaplan-Meier-Schätzung betrug das 5-Jahres-Überleben für alle Patientinnen gemeinsam 32,3% ($\pm 4,9\%$), die mittlere Überlebenszeit 52,7 Monate (Standardfehler: 5,5)

Es bekamen 73 Patientinnen (73%) ein Rezidiv und das geschätzte, rezidivfreie 5-Jahres-Überleben betrug 20,9% ($\pm 4,7\%$), die mittlere Zeit bis zum Rezidiv 47.9 Monate (Standardfehler: 7,8).

Weder Tod noch Rezidiv trat bei 14 Patientinnen auf (14%). Somit beträgt das kombinierte krankheitsfreie 5-Jahres-Überleben: 17,1% ($\pm 4,0\%$).

Der Mittelwert des Alters bei Diagnose lag bei 62,5 Jahren, insgesamt wurden Patientinnen im Alter zwischen 32 und 82 Jahren eingeschlossen.

Weitere klinische Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: klinische Daten der Primärtumoren

Variable	N=100	%
Histologie		
seröses Ovarialkarzinom	72	72%
endometroides Ovarialkarzinom	9	9%
muzinöses Ovarialkarzinom	7	7%
klarzelliges Ovarialkarzinom	2	2%
niedrig oder nicht differenzierte Ovarialkarzinome	10	10%
FIGO Stadium		
Stadium III	69	69%
Stadium IV	31	31%
Lymphknotenbefall		
positiv	54	54%
negativ	14	14%
unbekannt	32	32%
Fernmetastasierung		
positiv	31	31%
negativ	60	60%
unbekannt	9	9%
Operationsergebnis		
tumorfrei	29	29%
nicht-tumorfrei	71	71%
Chemotherapie		
Carboplatin und Paclitaxel	44	44%
Carboplatin Monotherapie	19	19%
andere	32	32%
keine	5	5%

3.1.5 Klinische Daten zu den Metastasengeweben

Für zwei Patientinnen war sowohl Gewebe des Primärtumors als auch Gewebe von Metastasen des Omentum majus erhältlich: Metastase M1 und Primärtumor D6, sowie Metastase M11 und Primärtumor D94 enthalten jeweils Proben der selben Patientin. Zu allen anderen Metastasen stand kein Primärtumorgewebe zur Verfügung. Zudem stammen das Gewebe der Uterusmetastase M7 und das Gewebe

der Netzmetastase M8 von derselben Patientin, jedoch war auch hier kein Gewebe des Primärtumors im Kollektiv enthalten.

Die durchschnittliche Beobachtungszeit der sechs Patientinnen, von denen die Metastasen stammen, betrug 27 Monate, minimal 11 Monate und maximal 72 Monate. Das durchschnittliche Überleben war laut einer Kaplan-Meier Schätzung 26 Monate (Standardfehler 7,8).

Alle Patientinnen mit Peritoneal- bzw. Uterusmetastasen bekamen ein Rezidiv, durchschnittlich nach 12,3 Monaten (Standardfehler 2,0).

Weitere klinische Daten werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 5: Zusammenfassung klinische Daten Metastasen

Probe	Lokalisation	Alter	Subtyp	Grading	Chemo
M1	Netz	55	Endometroides CA	3	Carboplatin + Taxol
M2	Netz	59	Karzinom Sarkom	3	Carboplatin + Taxol
M4	Netz	77	Seröses CA	3	Carboplatin Mono
M7	Uterus	55	Seröses CA	3	Carboplatin + Taxol
M8	Netz	55	Seröses CA	3	Carboplatin + Taxol
M10	Netz	49	Seröses CA	3	Carboplatin + Taxol
M11	Netz	68	Seröses CA	3	Carboplatin + Taxol

3.2 Material

Soweit nicht anders vermerkt wurden für alle Versuche folgende Labormaterialien genutzt:

Captair Bio, Erlab, Köln

Pipet lite Rainin 2µl/10µl/100µl/10000µl, Mettler Toledo, Gießen

PCR tubes 0,5 ml, BrandTech Scientific, Essex, USA

Micro Tube Safe Seal 1,5 ml, Sarsted, Nümbrecht

SafeSeal Tips Premium 2,5 µl steril, Biozym, Hessisch Oldendorf

Filter Tip 20 µl gelb, Sarsted, Nümbrecht

Filter Tip 200 µl farblos, Sarsted, Nümbrecht

Aqua ad iniectabilia 50 ml, Diaco, Triest, Italien

3.3 Methoden

Um heraus zu finden, wie aktiv ein Gen in einer Zelle ist, wird häufig die relative Quantifizierung mittels Real-time PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierbei wird zunächst die RNA, welche den aktiven Teil des Genoms einer Zelle repräsentiert, isoliert. Anschließend muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden, um in einem PCR Ansatz mit Hilfe von spezifischen Sonden die Ausgangsmenge des gesuchten Gens ermitteln zu können.

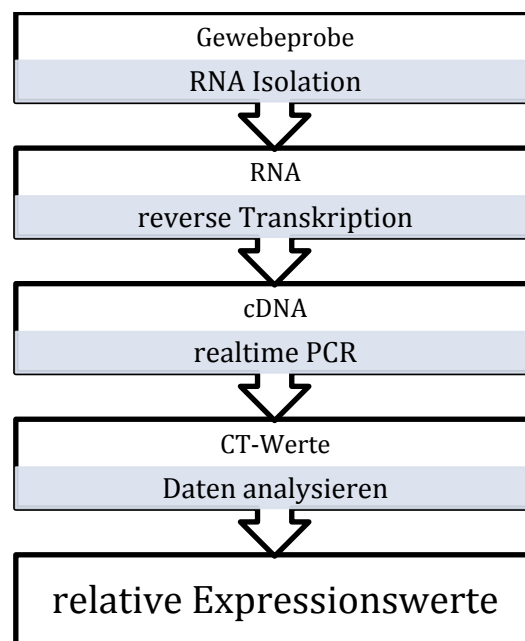


Abbildung 4: Workflow

Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden genauer erläutert.

3.3.1 RNA Isolation

Material:

RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden

Ethanol 70%, Apotheke Klinikum rechts der Isar, München

Biofuge fresco Heraeus, DJB Labcare, Buckinghamshire, England

Methode:

Die RNA der Zelllinien wurde für die vorliegende Arbeit selbst isoliert. Verwendet wurden die unter 3.1.3 beschriebenen Zellen, welche zu einem zu 70% konfluenten Rasen herangewachsen waren. Um eine Degeneration der RNA und Kontaminationen mit DNA zu verhindern, wurden alle Arbeitsschritte auf einer Arbeitsbank eigens für RNA-Isolierung durchgeführt, sowie die Proben und Reagenzien auf Eis gelagert. Die Zellmenge für die RNA-Isolierung betrug $\sim 10^6$ Zellen. Vorgegangen wurde nach dem RNeasy Mini Handybook, „*Protocol for animal cells*“ von Qiagen.

Nachdem die Zellen vom Kulturmedium abgelöst und abzentrifugiert worden waren, wurde auf das Bodensediment 350 μ l RLT Puffer pipettiert, um die Zellmembran zu eröffnen. Anschließend wurde das Lysat zum Homogenisieren 2 Minuten (min) bei maximaler Geschwindigkeit in einem QIAshredder-Säulchen zentrifugiert. Das in der unteren Phase befindliche Zelllysate wurde entnommen und mit 350 μ l 70% Ethanol vermischt. Anschließend wurden 700 μ l des Lysates in ein *RNeasy Spin Column* überführt, 15 Sekunden (sek) bei 10.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert und der Durchfluss entleert. Nach Zugabe von 700 μ l RW1 Puffer wurde nochmals 15 sek bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die auf dem Membranteil befindliche RNA wurde auf ein *RNeasy-Collection-Tube* überführt und nach Zugabe von 500 μ l RPE Puffer abermals 15 sek bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und weitere 500 μ l RPE Puffer zugefügt. Erneutes Zentrifugieren bei 10.000 U/min für 2 min. Im letzten Schritt erfolgte zweimaliges Eluieren der RNA mit jeweils 30 μ l RNase-freiem Wasser bei 10.000 U/min für 1 min.

Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt um die Reinheit der RNA zu überprüfen und die Konzentration mit dem Nanodrop-Gerät (s.u.) bestimmt. Die restliche RNA wurde zu Aufbewahrung bei -80°C eingefroren.

3.3.1.1 RNA Konzentrationsbestimmung

Material:

NanoDrop ND-1000, PeqLab, Erlangen

Methode:

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop ND-1000 bestimmt. Es wurden 1,2 µl Probe je Messung eingesetzt. Das Gerät misst die Lichtabsorption der Probe, welche sich zwischen zwei Glasfaserkabeln befindet, bei einer Wellenlänge von 260nm und berechnet daraus die Konzentration von RNA über eine modifizierte Lambert-Beer Gleichung. Zusätzlich können durch den 260/280-Quotienten Verunreinigungen erkannt werden. Hierbei spricht ein Quotient von ca. 2 dafür, dass die RNA nicht verunreinigt ist.

3.3.1.2 Gelelektrophorese

Material:

LE Agarose Pulver, Biozym, Hessisch Oldendorf

10x TBE-Puffer, Serva, Heidelberg

Ethidiumbromid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ficoll PM 400, Sigma-Aldrich, Steinheim

TE-Puffer, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Elektrophoresekammer Midi, NeoLab, Heidelberg

peqGOLD 100 bp DNA-Leiter, PeqLab, Erlangen

Spannungsgerät E 835, Consort, Turnhout, Belgien

UV Detektions System UVsolo, Biometra, Göttingen

Durchführung:

Zur Vorbereitung wurde zunächst 10x TBE-Puffer 1:10 verdünnt. Aus 2 g Ficoll PM, gelöst in 10 ml TE-Puffer, wurde Auftragspuffer hergestellt und 1:5 mit TE-Puffer verdünnt.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5%iges Agarose Gel hergestellt: 1,5 g LE Agarose Pulver wurden in 100 ml 1x TBE-Puffer aufgelöst und mit 4 µl Ethidiumbromid für 2-3 min in der Mikrowelle erhitzt bis sich das Pulver vollständig

aufgelöst hatte. Danach wurde das Gel zum Auskühlen in eine Form mit einem Kamm für 11 Taschen gegossen.

Das ausgekühlte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt und vollständig mit TBE-Puffer bedeckt. Jede Tasche wurde mit 1 µl RNA und 5 µl Auftragspuffer (1:5) befüllt. Zur Kontrolle lief in einer Tasche ein DNA-Größenmarker (DNA-Leiter) mit.

Nach ca. 20 min bei 120 Volt wurde das Gel entnommen und mit UV-Solo ein Foto unter UV Licht erzeugt.

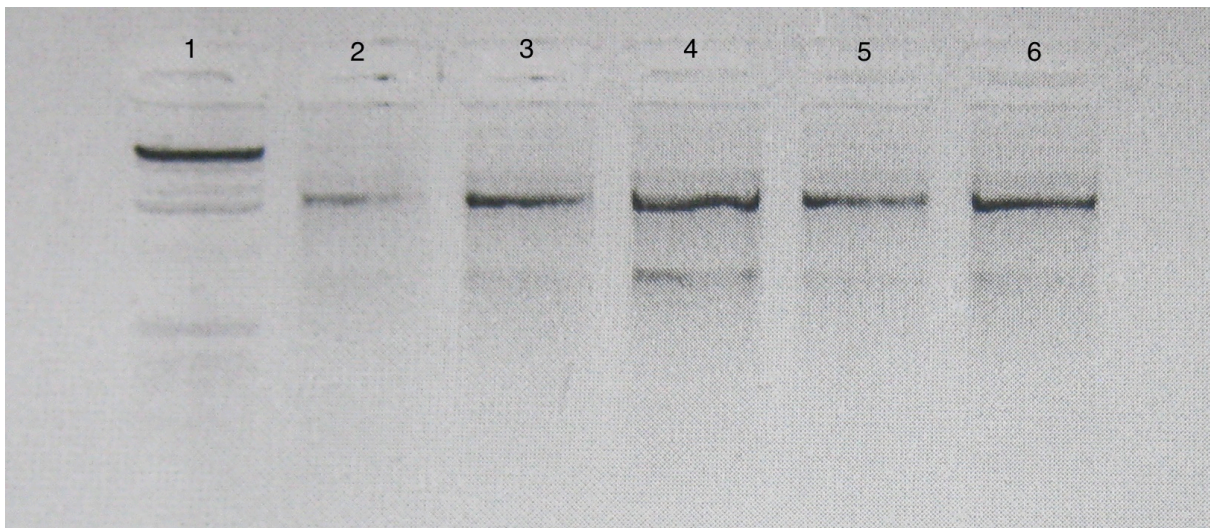


Abbildung 5: Bild der Gelelektrophorese. 1. Spalte: Längenmarker; 2. Spalte: RNA des Gewebes S1; 3. Spalte: RNA des Gewebes S2; 4. Spalte: RNA des Gewebes S3; 5. Spalte: RNA des Gewebes S4; 6. Spalte: RNA des Gewebes S5

3.3.2 cDNA Synthese

Material:

1st Strand cDNA Synthesis KIT for RT-PCR (AMV), Roche, Grenzach-Wyhlen

Thermocycler PTC-200, MJ Research, Minnesota, USA

Biofuge fresco Heraeus, DJB Labcare, Buckinghamshire, England

Durchführung:

Zur Herstellung von cDNA wurde der 1st Strand cDNA Synthesis KIT for RT-PCR verwendet. Nach Anleitung des Herstellers wurde zuerst der Reaktionsmix vorbereitet:

Tabelle 6: Reaktionsmix cDNA Synthese

Menge	Reagenz	Endkonzentration
2 µl	10x Reaktionspuffer	1x
4 µl	MgCl ₂	5mM
2 µl	Desoxynucleotide Mix	1mM
2 µl	Random Primer	0,8 A ₂₆₀ Einheiten
1 µl	RNAse Inhibitor	50 Einheiten
0,8 µl	reverse Transkriptase	>20 Einheiten
= 11,8 µl		

Anschließend wurde zu diesem Reaktionsmix jeweils 1 µg der RNA Probe hinzugefügt und jeder Ansatz zu einem Gesamtvolumen von 20 µl mit Wasser aufgefüllt, vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert.

Im Thermocycler wurde die cDNA unter folgendem Schema amplifiziert:

Tabelle 7: Temperaturprofil cDNA Synthese

Temperatur	Zeit	Funktion
25°C	10 min	1. Inkubationsphase
42°C	60 min	2. Inkubationsphase
99°C	5 min	Denaturierung der Transkriptase
4°C	unbegrenzt	Abkühlung

In der 1. Inkubationsphase lagern sich die Primer an die RNA Matrize an. Dieser Vorgang wird auch als *Annealing* bezeichnet. Während der 2. Inkubationsphase wird ein komplementärer cDNA Strang an der RNA synthetisiert, dies geschieht durch die AMV Reverse Transkriptase. Anschließend wird der Ansatz stark erhitzt um die Transkriptase zu inaktivieren. Eine nicht inaktivierte Transkriptase könnte bei weiteren Versuchen das Ergebnis verfälschen. Zuletzt werden die Proben auf 4°C zur weiteren Verarbeitung oder Lagerung abgekühlt.

3.3.3 Genexpressionsanalyse mittels TaqMan

3.3.3.1 Testung der Primer und Sonden

Für den Wildtyp des KAI1 Gens (KAI1-wt) sowie seine Spleißvariante (KAI1-splice) wurden von der Firma TIB MOLBIOL eigens für diese Arbeit Primer angefertigt: Ein Vorwärtsprimer für den Wildtyp und ein Vorwärtsprimer für die Spleißvariante, sowie zwei Rückwärtsprimer und eine Sonde, die jeweils für beide Genvarianten funktionieren.

Tabelle 8: Basenabfolge der Primer und Sonde für KAI 1

Name	Basenabfolge	Funktion
CD82 F del	GCCTGTGTACCAGGAG CTCC	Vorwärtsprimer KAI1-splice
CD82 S ins	CTGGGCATCATCCTCGG	Vorwärtsprimer KAI1-wt
CD82 A	GCAGGGAGATGGGGATAGC	Rückwärtsprimer, kurz
CD82 R	GATAGGCCAGGAGAGATCGCT	Rückwärtsprimer, lang
CD82 TM	FAM-CCTTGCTGTAGTCTTCGGAATGGACGT-BBQ	Sonde

Eine Abbildung mit den genauen Anlagerungsstellen der Primer und der Sonde im KAI1 Gen findet sich im Anhang.

Es wurden Vorversuche durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit der Primer zu testen. Da für die Gene ITGAV, HPRT1 und ALAS1 bereits vorgefertigte, etablierte Assays verwendet wurden, wurde lediglich untersucht, ob in allen getesteten Gewebeproben ein Signal abgeleitet werden kann. Des Weiteren wurden Versuchsläufe mit 3 µl cDNA in 30 µl Gesamtvolumen sowie 2 µl cDNA in 20 µl Gesamtvolumen unter denselben Bedingungen durchgeführt. Da beide Versuche vergleichbare Ergebnisse und insbesondere CT-Werte erbrachten, wurde aus ökonomischen Gründen entschieden, für die weiteren Versuche mit ITGAV, HPRT1 und ALAS1 den Versuchsaufbau mit 2 µl cDNA zu verwenden.

Für den Wildtyp und die Spleißvariante des KAI1 Gens wurde untersucht, ob beide amplifiziert werden und welcher der Rückwärtsprimer effizienter ist.

3.3.3.1.1 PCR

Material:

AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Applied Biosystems, Darmstadt

GeneAmp 10x PCR Puffer, Applied Biosystems, Darmstadt

Desoxynucleotide Mix 10mM, Roche, Grenzach-Wyhlen

Primer und Sonde für KAI-wt und KAI-splice, Tib Molbiol, Berlin

Thermocycler PTC-200, MJ Research, Minnesota, USA

Durchführung:

Für die PCR wurde zuerst ein Master Mix aus PCR Puffer, dNTPs, Polymerase und Wasser hergestellt. Ihm wurden dann jeweils verschiedene Kombinationen aus Rückwärts- und Vorwärtsprimer sowie cDNA bzw. Wasser zur Negativkontrolle zugefügt:

Tabelle 9: Pipettierschema PCR

Reagenz	Menge	Endkonzentration
PCR Puffer 10x	5 µl	1x
dNTPs	1 µl	0,2 mM
Vorwärtsprimer	2 µl	0,4 µM
Rückwärtsprimer	2 µl	0,4 µM
Amplitaq (5U/µl, 1:5 verdünnt)	1 µl	1 U
cDNA / H ₂ O	3 µl	
H ₂ O	36 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Amplifiziert wurde im Thermocycler mit folgendem Programm:

Tabelle 10: Temperaturprofil PCR

Phase	Temperatur	Zeit	Funktion
1	94°C	10 min	Aktivierung der Polymerase
2	94°C	30 sec	Denaturierung
3	57°C	45 sec	Primerhybridisierung
4	72°C	1 min	Elongation
	Go to 2, 32 times		
5	72°C	8 min	Endphase
6	4°C	unbegrenzt	Lagerung

Im ersten Schritt wird die Polymerase bei hoher Temperatur aktiviert. Die folgenden 3 Schritte stellen die eigentliche PCR dar: Zur Denaturierung wird der Ansatz auf 94°C erhitzt. Bei dieser Temperatur lösen sich die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren und aus dem DNA-Doppelstrang werden 2 Einzelstränge. Nach Abkühlen auf 57°C können die Primer an die komplementäre Sequenz der einzelsträngigen DNA binden. Die Polymerase synthetisiert bei 72°C ausgehend vom Primer einen neuen DNA Strang. Diese 3 Schritte werden 32 x wiederholt wobei sich bei jedem Schritt die Anzahl der DNA Kopien verdoppelt. Anschließend wird alles bei 72°C nochmals für 8 min inkubiert. Bei 4°C kann die cDNA bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

3.3.3.1.2 Gelelektrophorese

Material:

s.o.: 3.3.1.2 Gelelektrophorese

Durchführung:

Die Gelelektrophorese wurde wie in 3.3.1.2 beschrieben durchgeführt. Pro Tasche wurden 3 µl cDNA und 7 µl Auftragspuffer verwendet.

3.3.3.2 TaqMan Realtime Analyse

Material:

TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Darmstadt

TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Darmstadt (Tabelle 11)

Primer und Sonden für KAI1-wt und KAI1-splice, Tib Molbiol, Berlin

QPCR Semi-Skirted 96 Well PCR Plate, PeqLab, Erlangen

ABsolute™ QPCR Seal, Thermo Scientific, Schwerte

Multifuge 3 L-R Heraeus, Thermo Scientific, Schwerte

Taqman ABI PRISM 7000, Applied Biosystems, Darmstadt

Software ABI PRISM 7000 SDS Version 1.1, Applied Biosystems, Darmstadt

Tabelle 11: TaqMan Gene Expression Assays

ITGAV	ID: Hs00233808_m1
ALAS1	ID: Hs00167441_m1
HPRT1	ID: Hs99999909_m1

Durchführung:

Die cDNA der Gewebeproben wurde verdünnt und aliquotiert. Proben die nicht am selben Tag verarbeitet werden konnten, wurden bei -20°C zur Aufbewahrung eingefroren.

Tabelle 12: Verdünnung cDNA

Proben D1-D86, M1-M11, S1-S5	Proben D87-D103
5µl cDNA + 23µl H2O	4µl cDNA + 24µl H2O

Um Pipettiergenauigkeiten bei sehr kleinen Mengen zu vermeiden, wurde der Reaktions-Mix in einem großen Ansatz für alle Proben einer Platte gemeinsam hergestellt (Komponenten siehe Schemata unten) und jeweils 18 µl für die Gene ITGAV, ALAS1 und HPRT1 bzw. 17 µl für KAI1-wt und KAI1-splice in eine 96-Loch PCR Platte vorgelegt. Die Arbeitsschritte wurden auf einer sterilen Arbeitsbank im abgedunkelten Raum durchgeführt.

Tabelle 13: Pipettierschema ITGAV, ALAS1, HPRT1

Reagenz	Menge	Endkonzentration im Ansatz
Mastermix:	10 µl	1x
H2O:	7 µl	
Assay:	1 µl	1:20
Gesamtvolumen	18 µl	

Tabelle 14: Pipettierschema KAI1-Wildtyp, KAI1-splice

Reagenz	Menge	Endkonzentration im Ansatz
Mastermix:	10 µl	1x
H ₂ O:	4 µl	
Vorwärtsprimer:	1 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer:	1 µl	0,5 µM
Sonde:	1 µl	0,25 µM
Gesamtvolumen	17 µl	

In Vorversuchen wurde ermittelt, welche Menge an cDNA-Einsatz notwendig ist um aussagekräftige TaqMan Resultate zu erhalten. Da die vorgefertigten Assays für ITGAV, ALAS1 und HPRT1 sowohl beim Einsatz von 2µl cDNA als auch beim Einsatz von 3 µl cDNA gut funktionierten, wurde aus ökonomischen Gründen entschieden, den Versuchsaufbau mit 2 µl zu wählen. Die Versuche für KAI1-wt und KAI1-splice hingegen wurden um 3 µl cDNA durchgeführt, um sehr hohe CT-Werte zu vermeiden. Die cDNA wurde durch vorsichtiges auf- und abpipettieren mit der Reaktionslösung vermischt. Nachdem sichergestellt wurde, dass sich keine Bläschen im Reaktionsgemisch befinden, wurde die 96-Loch-Platte mit einer speziellen PCR Folie verschlossen und 3 min bei 3000 U/min und 22°C zentrifugiert.

Danach wurden die fertigen Platten im TaqMan ABI PRISM 7000 platziert. Mit Hilfe der zugehörigen Software ABI PRISM 7000 SDS wurden die Proben benannt, das Zielgen festgelegt und die Fluoreszenz-Farbstoffe ausgewählt. Anschließend konnte der Lauf zur relativen Quantifizierung mit folgenden Einstellungen gestartet werden:

Tabelle 15: Thermal Cycler Profile

Phase	Wiederholungen	Temperatur	Zeit	Funktion
1	1	50°C	2 min	Startphase
2	1	95°C	10 min	Enzym Aktivierung
3	40/45	95°C	15 sec	PCR: Denaturieren
		60°C	1 min	PCR: Anneal/Extend

Für die Gene ITGAV, ALAS1, HPRT1 wurde der Lauf mit 40 Zyklen durchgeführt und für KAI1-wt und KAI1-splice mit 45 Zyklen.

Jede Probe wurde als Doppelwert gemessen um Verfälschungen durch Pipettierungenauigkeiten zu kontrollieren. Für Proben, deren Doppelwerte mehr als

0,6 Zyklen auseinander lagen, wurde ein dritter Messwert angefertigt und anschließend mit dem Mittelwert gerechnet. Zudem liefen auf jeder Platte 4 Kontrollgewebe mit, um Unterschiede zwischen den Platten in verschiedenen Läufen heraus zu rechnen und eine Probe ohne DNA, um Verunreinigungen zu erkennen.

Die im Master Mix befindliche AmpliTaq Gold ® Polymerase wird bei 95°C für 10 min aktiviert. Danach folgt die eigentliche PCR Reaktion. Die Probe wird für 15 sek auf 95°C erhitzt, damit der DNA Doppelstrang zu 2 Einzelsträngen denaturiert wird. Anschließend wird der Ansatz für 1 min auf 60°C abgekühlt. In dieser Zeit lagern sich die Primer und Sonden an und ein neuer Strang wird synthetisiert.

Die Sonde ist ein Oligonukleotid mit bestimmten Eigenschaften: Am 5' Ende befindet sich ein Reporter Farbstoff (FAM = 6-Carboxy-Fluorescein), welcher ein fluoreszierendes Signal emittieren kann, wenn er mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Am 3' Ende befindet sich ein Quencher-Farbstoff (TAMRA = 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin). Er unterdrückt bei intakter Sonde durch die räumliche Nähe zum Reporter dessen Signal. Grundlegender Mechanismus hierfür ist der „Energie Transfer vom Förster-Typ“ [Biosystems 2010]. Ein Phosphatrest am 3' Ende verhindert die Extension der Sonde während der PCR.

Während der Reaktion wird die 5'-3' Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase ausgenutzt. Sie hydrolysiert die Sonde und trennt somit den Quencher von dem Reporter räumlich, wodurch ein Fluoreszenzsignal freigesetzt wird. Die Stärke des Signals steigt in Abhängigkeit freigesetzter Reporter-Moleküle und ist somit direkt proportional zur Anzahl der hergestellten PCR Produkte.

Das System ist sehr spezifisch, da diese Reaktion nur geschehen kann, wenn die Sonde an die Zielsequenz hybridisiert ist und die Zielsequenz amplifiziert wird. Eine Verfälschung des Ergebnisses durch unspezifische Amplifikation wird somit verhindert.

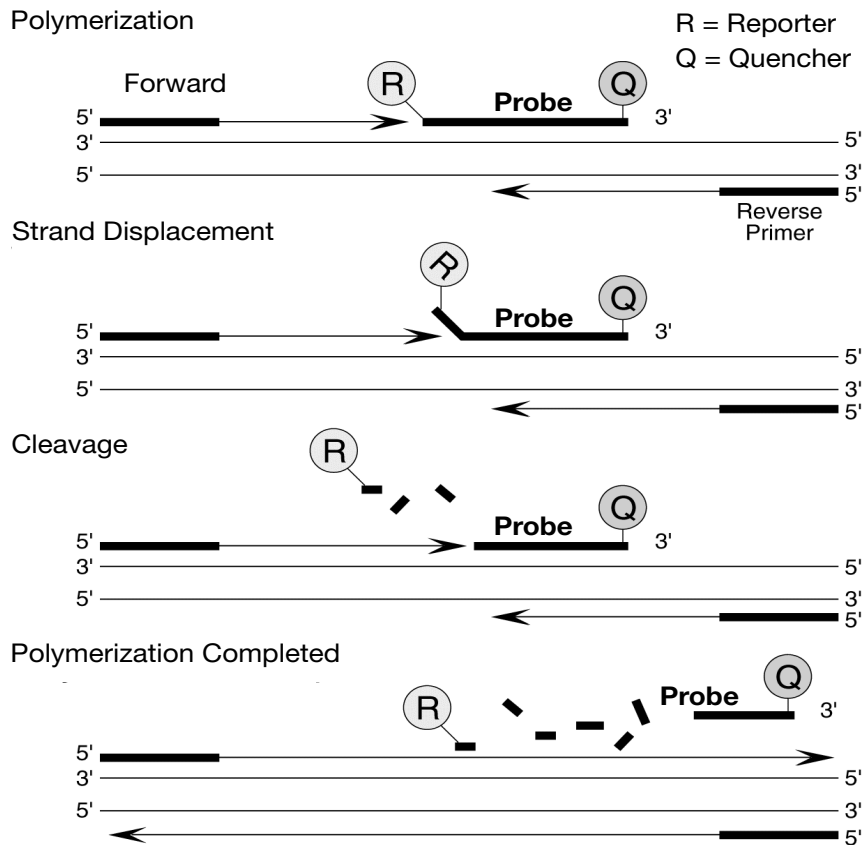


Abbildung 6: Funktionsweise der TaqMan Sonden aus „Abi Prism 7000 Sequence Detection System User Guide“ S.A-2

Zur Überprüfung der Läufe wurden stichprobenartig Gelelektrophoresen nach vollendeter RT-PCR, wie in 3.3.1.2. beschrieben, angefertigt. Verwendet wurden je Tasche: 10 µl cDNA aus dem fertigen TaqMan Lauf und 2 µl Auftragspuffer.

3.3.3.3 Funktionsweise ABI PRISM 7000

Das ABI PRISM 7000 Sequence Detection System verfügt über einen Thermocycler, sodass über ein vorgegebenes Temperaturprofil eine PCR ablaufen kann. Während jedem Zyklus wird die Stärke der Fluoreszenz in jeder Probe gemessen. Hierfür werden die Moleküle mit Hilfe einer Halogenlampe zur Fluoreszenz angeregt und die emittierte Lichtmenge mit einer speziellen Kamera detektiert.

In den ersten Zyklen der PCR, wenn sich die Reaktion noch in der Anfangsphase befindet, wird ein Hintergrundsignal erstellt. Die Software „ABI PRISM 7000 SDS Version 1.1“ ermittelt nun den Zyklus, in dem die Stärke des Fluoreszenz-Signals

erstmalig signifikant über die Hintergrundsignale steigt. Dieser Zyklus wird auch Schwellenwert-Zyklus oder Ct (engl. = *cycle threshold*) genannt. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich in jedem Reaktionsgefäß gleich viel cDNA.

Dabei gilt: Je höher die Genexpression und damit RNA in den Zellen war, desto mehr cDNA-Kopien sind bei der reversen Transkription entstanden und desto früher wird der Ct erreicht. Es kann mit Hilfe des Ct also auf die Anfangskonzentration der RNA geschlossen werden. Erreicht eine Probe A den Ct einen Zyklus später als eine andere Probe B bedeutet das, dass die RNA Konzentration in Probe A anfangs halb so groß war als in Probe B. Für diese Schlussfolgerung muss jedoch eine Effizienz von 100% angenommen werden. Deshalb ist es wichtig, dass die Messung in der exponentiellen Phase erfolgt, da nur hier die Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zur Anzahl der anfänglichen cDNA Kopien ist.

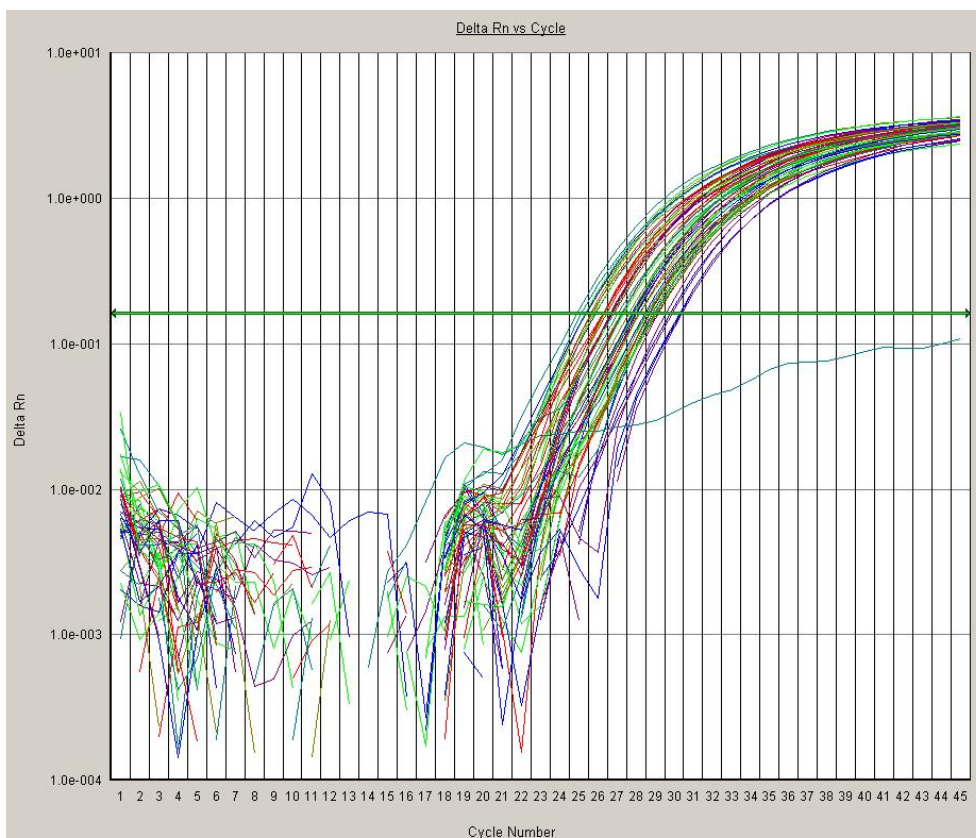


Abbildung 7: Amplifikations Plot für den ersten Lauf des KAI1 Wildtyp Gens: Die verschiedenen Farben entsprechen den verschiedenen Proben. Die grüne horizontale Linie markiert den Ct. im linken unteren Bildrand ist das Hintergrundrauschen erkennbar. Die türkise Linie entspricht der Leerprobe und erreicht entsprechend den Schwellenwert nicht.

3.4 Datenanalyse

Material:

Microsoft Excel 2011 Version 14.2.4, Microsoft, Redmond, USA

3.4.1 Angleichung der Messdaten

Auf jeder Platte liefen vier Proben von Zelllinien (S2-S5) mit, um Schwankungen zwischen verschiedenen Läufen auszugleichen. Aus den Ct-Werten dieser 4 Gewebeproben wurde für jede Platte ein Mittelwert gebildet. Anschließend wurde eine Platte als Calibrator gesetzt und die Ct-Werte aller anderen Proben der selben Platte angeglichen.

3.4.2 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird das zu untersuchende Gen auf ein Gen mit stabiler Expression (sogenannter Housekeeper, HK) bezogen, um Unterschiede in der Ausgangsmenge von eingesetzter RNA heraus zu rechnen. Dieses Vorgehen wird auch Normalisierung genannt. In dieser Arbeit wurden die Gene ALAS1, HPRT1 als Housekeepergene eingesetzt.

Es gibt mehrere Methoden um die relativen Expressionswerte zwischen den verschiedenen Tumorproben zu errechnen. Häufig wird hierfür die $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode verwendet. Diese geht allerdings von einer 100%igen Effizienz der RT-PCR sowohl für den HK als auch für das Zielgen aus. Da gerade bei individuell angefertigten Primern und Sonden eine 100%ige Effizienz nicht gewährleistet werden kann, wurde für die vorliegende Arbeit ein Vorgehen zur effizienz-korrigierten relativen Quantifizierung gewählt, welche 2001 von M.Pfaffl beschrieben wurde [Pfaffl 2001]:

Für jedes Gen wurde zuerst die Gewebeprobe mit der höchsten Expression, also dem kleinsten Ct-Wert bestimmt und als Calibrator gesetzt. Anschließend wurde der Delta-Ct-Wert folgenderweise gebildet:

$$\Delta Ct = Ct_{calibrator} - Ct_{sample}$$

Setzt man den Delta-Ct-Wert in Abhängigkeit der Effizienz (E), so bekommt man die Quantität (Q):

$$Q = E^{\Delta Ct(calibrator-sample)}$$

Um normalisierte Expressionswerte (ratio/ r) zu erhalten wurde die Quantität des Zielgens (target) einer Probe durch die Quantität des HK der selben Probe geteilt:

$$ratio = \frac{Q_{target}}{Q_{HK}}$$

Als zusammengesetzte Formel ergibt sich also:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target}(calibrator-sample)}}{(E_{HK})^{\Delta Ct_{HK}(calibrator-sample)}}$$

Dieses Vorgehen wurde für jedes der 3 Zielgene (ITGAV, KAI1-wt, KAI1-splice) jeweils mit beiden HK (ALAS1, HPRT1) durchgeführt und anschließend der Mittelwert aus beiden Ergebnissen für die weiteren Berechnungen verwendet.

3.4.3 Effizienzbestimmung

Die Effizienz der Reaktion kann mit Hilfe einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungen berechnet werden. Hierzu wurde eine repräsentative DNA Mischprobe aus den Geweben M1, M2, M6, M7, M8, M9 hergestellt. Die CT Werte dieser Proben lagen in einem Bereich, welcher für das Gesamtkollektiv repräsentativ

war. Aus der Verdünnungsstufe aus den Versuchen wurden Verdünnungen im Verhältnis 1:2, 1:10, 1:20, 1:100, 1:200 und 1:1000 hergestellt. Für jedes Gen wurde eine RT-PCR wie unter 3.3.3.2 beschrieben in allen Verdünnungsstufen durchgeführt.

Mit Hilfe des Excel-Programms wurde die Verdünnungsstufe in einer logarithmischen Funktion gegen den Ct-Wert aufgetragen. Im Punktdiagramm wurde eine Trendlinie erstellt und die zugehörige Steigung (m) berechnet.

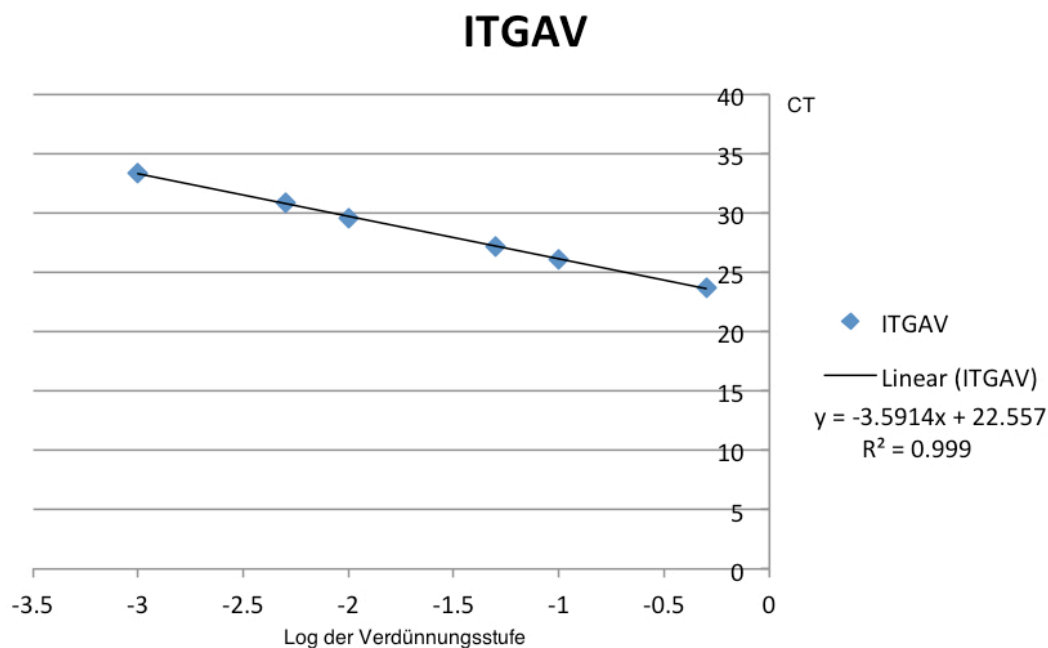


Abbildung 8: Verdünnungsstufen der Ct-Werte für das ITGAV-Gen in einer logarithmischen Funktion

Die Effizienz konnte nun mit folgender Formel errechnet werden:

$$E = 10^{-1/m}$$

Ein E von 2 entspricht einer 100%tigen Effizienz und bedeutet dass sich die Anzahl der Amplifikate in jedem Zyklus verdoppelt, es stellt somit die optimale Reaktion dar. Eine Steigung von -3,32 entspricht einer Effizienz von 100% bzw. einem E von 2.

3.5 Statistische Auswertung

Material:

SPSS Statistics Version 20, IBM, Ehningen

R for Statistical Computing Version 2.8.1, <http://www.r-project.org>

Online-Rechner „Kaplan Meier Plotter“, www.kmplot.com

Durchführung:

Zur Einschätzung der prognostischen Relevanz der Biomarker KAI1 und ITGAV für das Ovarialkarzinom wurde der „Kaplan Meier Plotter“ verwendet [Gyorffy *et al.* 2012]. Dieser online-Dienst verfügt über eine sehr große Datenbank, welche sowohl Patienteninformationen als auch Expressionsdaten verschiedener Gene aus Affymetrix-Microarrays enthält. Berechnet werden daraus Kaplan-Meier Kurven, der log-rank-p-Wert und die Hazard Ratio, jeweils mit 95% Konfidenzintervall.

Statistische Tests wurden mit SPSS und dem Programm *R for statistical computing* durchgeführt. Auf Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern wurde mit dem Mann-Whitney-U Test geprüft. Anschließend wurde je betrachtetem Ereignis ein optimaler Cutpoint für die Genexpression bestimmt sowie der zugehörige p-Wert der maximalen Teststatistik berechnet. Zudem wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt, um die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Genexpression bildlich darzustellen und das mediane Überleben der Untergruppen zu berechnen. Überlebenstabellen wurden erstellt, um Unterschiede im Überleben zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilen zu können. Die Hazard Ratio wurde mit Hilfe des Cox-Regressionsmodells berechnet.

Um Expressionswerte aus Metastasengewebe mit denen der Primärtumorgewebe zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet, Boxplots gezeichnet und Lageparameter bestimmt.

Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 95% festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse öffentlicher Datensätze

Um eine erste Einschätzung über den Einfluss der KAI1- bzw. ITGAV-mRNA Expression auf die Prognose von Ovarialkarzinom-Patientinnen zu erhalten, wurden zunächst öffentliche Daten über die Kaplan-Meier-Plotter-Webseite (www.kmplot.com) berechnet und ausgewertet (vgl. Kapitel 3.5).

Verwendet wurden Affimetrix-Daten aus allen verfügbaren Proben-Sets, der beste *cut-off*-Wert für die Überlebensfunktionen wurde automatisch ausgewählt. Es wurde sowohl das Gesamtüberleben als auch das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit der KAI1-bzw. ITGAV-Expression in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und der zugehörige Log-Rank-p-Wert und die Hazard Ratio berechnet. Dies wurde zuerst für alle Patientinnen (n=1436 für das Gesamtüberleben, n=1171 für das rezidivfreie Überleben) durchgeführt und anschließend, um eine homogenere Gruppe zu erhalten, für Patientinnen welche eine platinhaltige Chemotherapie erhalten haben und ein optimales Operationsergebnis erzielten (n=690 für das Gesamtüberleben, n=590 für das rezidivfreie Überleben). Abbildung 9 stellt exemplarisch eine Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben bei der zuletzt genannten Subgruppe dar.

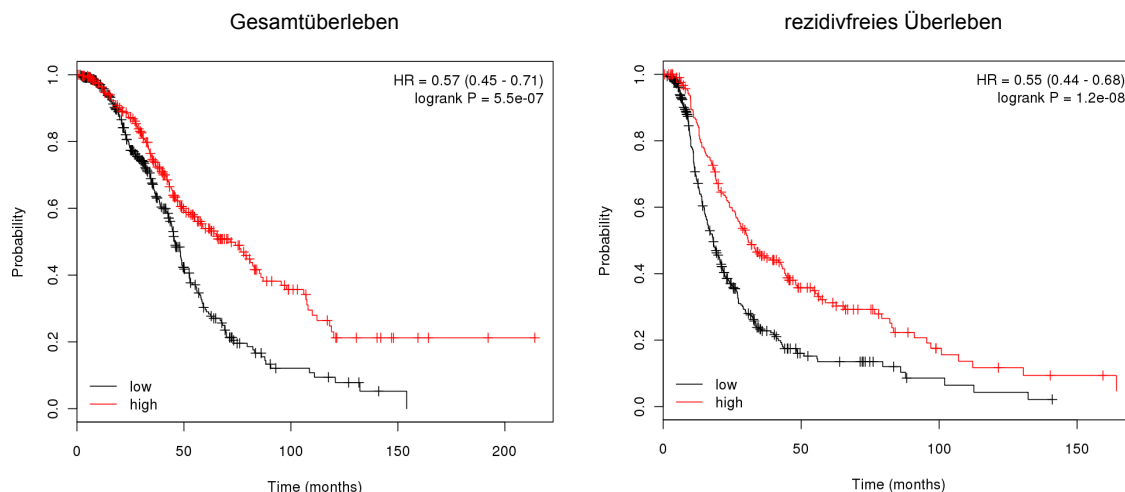


Abbildung 9: Mittels des KM-Plotters erstellte Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (links) und das rezidivfreie Überleben (rechts) in Abhängigkeit der KAI1-Expression. Dargestellt ist die Subgruppe „platinhaltige Chemotherapie und optimales OP-Ergebnis“ (Gesamtüberleben: n=690, rezidivfreies Überleben: n=590). Hohe Expressionslevel sind rot und niedrige Expressionslevel sind schwarz dargestellt. Für das Gesamtüberleben ist der p-Wert des Log-Rank-Test 5,5e-7 und die Hazard Ratio: 0,57 (0,45-0,71) und für das rezidivfreie Überleben beträgt der p-Wert des Log-Rank-Test 1,2e-8 und die Hazard Ratio: 0,55 (0,44-0,68).

Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse ist in Tabelle 16 (für das Gesamtüberleben) und Tabelle 17 (für das rezidivfreie Überleben) dargestellt.

Tabelle 16: Übersicht der statistischen Ergebnisse des KM-Plotters für das Gesamtüberleben

Gesamtüberleben	Gen	Hazard Ratio (95%CI)	Log-Rank-p-Wert	Cut-off	Expressions-Intervall
Alle Patienten	KAI1	0,76 (0,66-0,87)	0,00014	479	8-3707 (n=1436)
Platinhaltige Chemo + optimales OP-Ergebnis	KAI1	0,57 (0,45-0,71)	5,5e-7	454	8-2605 (n=690)
Alle Patienten	ITGAV	1,21 (1,04-1,4)	0,016	3673	16-16831 (n=1436)
Platinhaltige Chemo + optimales OP-Ergebnis	ITGAV	1,33 (1,05-1,79)	0,020	3611	16-14625 (n=690)

Tabelle 17: Übersicht der statistischen Ergebnisse des KM-Plotters für das rezidivfreie Überleben

rezidivfreies Überleben	Gen	Hazard Ratio (95%CI)	Log-Rank-p-Wert	Cut-off	Expressions-Intervall
Alle Patienten	KAI1	0,74 (0,64-0,85)	4,1e-5	487	8-2690 (n=1171)
Platinhaltige Chemo + optimales OP-Ergebnis	KAI1	0,55 (0,44-0,68)	1,2e-8	502	8-2375 (n=590)
Alle Patienten	ITGAV	1,28 (1,11-1,48)	0,00063	3275	16-14625 (n=1171)
Platinhaltige Chemo + optimales OP-Ergebnis	ITGAV	1,21 (0,98-1,48)	0,071	3275	16-14625 (n=590)

Insbesondere bei Betrachtung der homogenen Patientengruppe (platinhaltige Therapie und optimales OP-Ergebnis) wird deutlich, dass ein hohes Expressionsniveau von KAI1 einen hoch signifikanten Vorteil sowohl in Bezug auf

das Gesamtüberleben als auch in Bezug auf die Rezidivfreiheit darstellt. Die Hazard Ratio von 0,57 bzw. 0,55, (1,75-fach bzw. 1,8-fach geringeres Risiko) verdeutlicht die Stärke des Einflusses. Somit passen die Ergebnisse zu der Rolle eines Tumorsuppressorgens, welche KAI1 zugeschrieben wird.

Auch die Expression des ITGAV-Gens scheint einen Einfluss auf die Prognose von Ovarialkarzinom-Patientinnen zu haben, wobei sich hier die Daten der Subgruppe kaum vom Gesamtkollektiv unterscheiden. Es zeigt sich ein Vorteil für niedrige Transkriptmengen. Allerdings ist die Signifikanz nicht so stark wie bei KAI1. Auch die Hazard Ratio deutet auf einen schwächeren Einfluss dieser Integrinkette als Marker für das Gesamtüberleben und die Rezidivfreiheit hin. Dennoch scheint der fördernde Einfluss auf die Tumorprogression, welche für einige αv Integrine beschrieben ist, bestätigt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, die aus öffentlichen Daten berechnet wurden, dass KAI1 mit hoher Sicherheit einen Einfluss auf die Prognose von Ovarialkarzinompatientinnen hat. Dies, sowie die Stärke des Einflusses, lassen es als sinnvoll erscheinen, das KAI1 Gen und seine Spleißvariante genauer zu untersuchen. Auch die weitere Betrachtung von ITGAV als möglichen Interaktionspartner von KAI1 sowie Prognose-beeinflussenden Marker scheint sinnvoll.

4.2 Etablierung der Genexpressionsanalysen

4.2.1 Unterscheidung der Transkripte des Wildtyps von KAI1 und seiner Spleißvariante

Die Sonde und die Primer für die längere Wildtyp-Variante des KAI1 Gens (KAI1-wt) und für seine Spleißvariante (KAI1-splice) wurden eigens für diese Arbeit angefertigt und mussten daher zuerst auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft werden.

Hierfür wurden mit dem Gewebe M8 eine PCR wie unter 3.3.3.1.1 beschrieben und eine Gelelektrophorese wie unter 3.3.3.1.2 beschrieben durchgeführt.

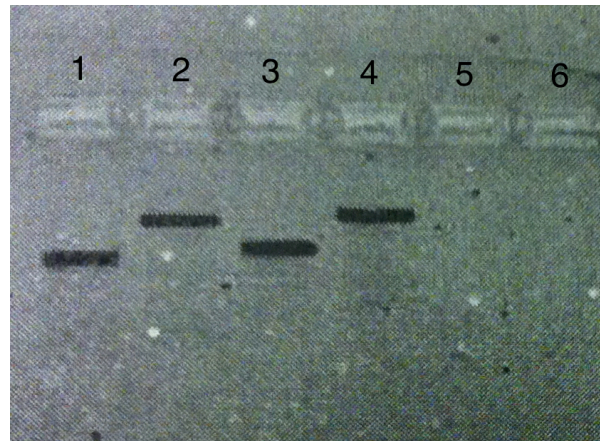


Abbildung 10: Gelelektrophorese nach PCR aus Gewebe M8. 1. Spalte: Vorwärtsprimer KAI1-splice + Rückwärtsprimer für das kurze PCR-Produkt; Spalte 2: Vorwärtsprimer KAI1-splice + Rückwärtsprimer für das lange PCR-Produkt; Spalte 3: Vorwärtsprimer KAI1-wt + Rückwärtsprimer für das kurze PCR-Produkt; Spalte 4: Vorwärtsprimer KAI1-wt + Rückwärtsprimer für das lange PCR-Produkt; Spalte 5: Vorwärtsprimer KAI1-wt + Rückwärtsprimer für das kurze PCR-Produkt in Leerprobe mit Wasser; Spalte 6: Vorwärtsprimer KAI1-wt + Rückwärtsprimer für das lange PCR-Produkt in Leerprobe mit Wasser.

In jeder Probe ist eine deutlich abgrenzbare Bande zu sehen. Die Leerprobe mit Wasser bleibt frei. Dies lässt darauf schließen, dass keine unerwünschten DNA-Abschnitte neben dem gewünschten RT-PCR-Produkt repliziert werden und auch Sonde und Primer nicht mit Störfaktoren interagieren. Die Längenverhältnisse der PCR-Produkte untereinander ist wie erwartet: PCR-Produkte aus dem Rückwärtsprimer für das lange Produkt (Spalte 2 und 4) sind weniger weit im Gel gelaufen als PCR-Produkte aus dem Rückwärtsprimer für das kurze Produkt (Spalte 1 und 3). Auch das etwas kürzere Produkt der Spleißvariante (Spalte 1 und 2) ist im Vergleich zum Wildtyp (Spalte 3 und 4) im Gel jeweils weiter gelaufen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die gewünschten Genabschnitte ohne zusätzliche Nebenprodukte repliziert werden.

4.2.2 TaqMan

Um entscheiden zu können, welcher der Rückwärtsprimer für KAI1 besser geeignet ist, wurden TaqMan-Läufe wie unter 3.3.3.2 beschrieben mit dem Gewebe M8 für den Wildtyp und die Spleißvariante mit beiden Primern angefertigt. Da beide Primersets sich nur in einem Zyklus unterschieden, entschieden wir uns für das Primerpaar, das für das kürzere Amplikon steht.

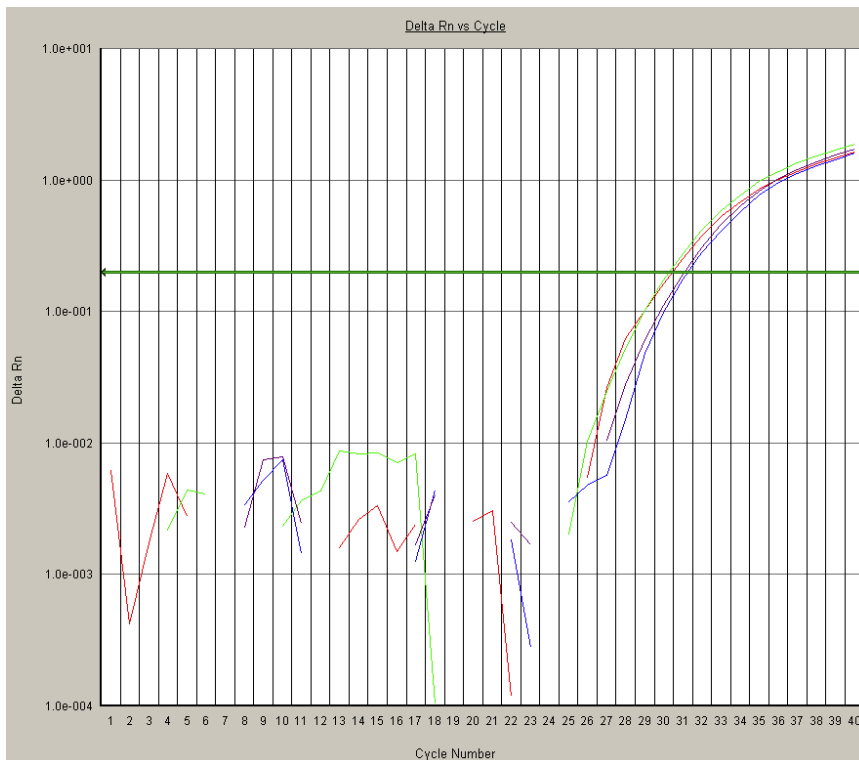


Abbildung 11: Amplifikationsplot für KAI1-wt zur Bewertung der Rückwärtsprimer. Die Proben mit dem Primer RW1 (rot und grün) erreichen den CT ca. einen Zyklus früher als die Proben mit dem Primer RW2 (blau und lila).

4.2.3 Effizienzbestimmung der RT-PCR

Zunächst wurde die Effizienz der PCR für die einzelnen Assays bestimmt, um z.B. die Expression von KAI1-wt und seiner Spleißvariante vergleichen zu können. Dazu wurden Verdünnungsreihen wie unter 3.4.3 beschrieben angefertigt und die zugehörigen Standardkurven mit Hilfe von Microsoft Excel berechnet. Die Effizienz wird mit folgender Formel aus der Steigung m der Standardkurve berechnet:

$$E = 10^{-1/m}$$

Tabelle 18: Steigung, Bestimmtheitsmaß und Effizienz für die Gene ALAS1, HPRT1, ITGAV, KAI1-wt und KAI1-splice.

Gen	Steigung (m)	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Effizienz (E) Gerundet auf eine Dezimale
ALAS1	-3,383	0,998	2,0
HPRT1	-3,2598	0,994	2,0
ITGAV	-3,591	0,999	1,9
KAI1-wt	-3,1627	0,996	2,1
KAI1-splice	-2,873	0,994	2,2

Die zugehörige bildliche Darstellung der Standardkurven findet sich im Anhang.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist ein Parameter für die Qualität der linearen Approximation. Ein Wert von 1 entspricht hierbei einem perfekten, ein Wert von 0 keinem erkennbaren linearen Zusammenhang. In allen Standardkurven konnte ein R^2 nahe 1 erreicht werden, sodass von einer reliablen Steigung ausgegangen werden kann.

Eine Effizienz von zwei entspricht einer Verdopplung der DNA in jedem Zyklus und somit der optimalen Reaktion. Werte größer zwei sind theoretisch nicht erreichbar. Bei KAI1-wt und KAI1-splice ist daher davon auszugehen, dass die Verdünnungskurven die Effizienz der Reaktion überschätzen.

Die berechneten Effizienzen wurden spezifisch für jedes Gen zur Berechnung der effizienzkorrigierten Genexpression, wie unter 3.4.2 beschrieben, verwendet.

4.3 Messung der Genexpression von KAI1-wt, KAI1-splice und ITGAV

Um herauszufinden, ob die Expression von KAI1-wt, KAI1-splice und ITGAV tatsächlich von prognostischem Wert für das Ovarialkarzinom sein könnte, wurden zuerst die relativen Expressionswerte berechnet. Anhand statistischer Tests wurden dann Zusammenhänge zwischen den Transkriptmengen und klinisch-pathologischen Merkmalen untersucht. Anschließend wurde der Effekt auf das Gesamt- und rezidivfreie Überleben mittels Kaplan-Meier-Kurven untersucht. Die Cox-Regression lieferte zusätzlich die Hazard Ratio als Maß für das Risiko für das Ereignis Tod bzw. Rezidiv. Abschließend sollte geklärt werden, ob es Unterschiede in den Transkriptmengen der untersuchten Gene zwischen Primärtumoren und Metastasen gibt. Hierzu wurden Boxplots erstellt, Lagemaße bestimmt und auf Signifikanz geprüft.

4.3.1 Allgemeine Ergebnisse

Aus den CT-Werten wurden relative Expressionswerte berechnet (vgl. Kapitel 3.4.2). Diese sind Effizienz-korrigiert und mit Hilfe der Expression der Housekeeper-Gene normalisiert. Somit konnte die unterschiedlich starke Aktivität der Gene in den verschiedenen Geweben dargestellt werden. Eine Tabelle mit den Ergebnissen der TaqMan-Läufe und der relativen Genexpression für jede Probe findet sich im Anhang.

Tabelle 19: Übersicht über die normierten CT-Werte der einzelnen Gene

	Kleinsten Wert	Größter Wert	Mittelwert	Median
KAI1-wt	22,92	35,09	27,15	26,81
KAI1-splice	27,22	38,35	31,51	31,10
ITGAV	22,15	33,13	26,16	25,85
ALAS1	26,28	36,33	28,97	28,68
HPRT1	23,74	35,46	27,03	26,56

Tabelle 20: Übersicht über die relativen Expressionswerte der einzelnen Gene

	Kleinster Wert	Größter Wert	Mittelwert	Median
KAI1-wt	0,05	2,46	0,57	0,37
KAI1-splice	0,01	3,74	0,47	0,30
ITGAV	0,13	4,38	0,83	0,66

Mit dem Spearman-Test für nicht-normalverteilte Daten wurde auf einen Zusammenhang der relativen Expressionswerte für KAI1-wt, KAI1-splice und ITGAV getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Ergebnisse des Spearman-Test zum Zusammenhang der relativen Genexpression zwischen KAI1 Wildtyp, KAI1-splice und ITGAV.

	Signifikanz	Korrelationskoeffizient
KAI1 Wildtyp vs KAI1-splice	0,001	0,321
KAI1 Wildtyp vs ITGAV	0,012	0,243
KAI1-splice vs ITGAV	0,553	-0,58

Es ist deutlich zu erkennen, dass ein mäßig starker, positiver Zusammenhang zwischen KAI1-Wildtyp und seiner Spleißvariante besteht. Auch zwischen der Integrin- α v Expression und KAI1-wt zeigt sich ein schwacher, positiver Zusammenhang. Kein Zusammenhang konnte zwischen ITGAV und der Spleißvariante von KAI1 festgestellt werden.

4.3.2 KAI1-Wildtyp

4.3.2.1 Assoziation zwischen der KAI1-wt Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen

Die mögliche Assoziation zwischen KAI1-Wildtyp und klinisch-pathologischen Merkmalen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests getestet. Es wurden die Parameter Alter, Nodalstatus, Fernmetastasen, Operationsergebnis, FIGO-Stadium, Chemotherapie und Pathologie untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Es wird deutlich, dass die mRNA Expression von KAI1-Wildtyp mit keinem der klinischen oder pathologischen Merkmale assoziiert ist. Lediglich beim Alter wird ein beinahe signifikantes Ergebnis erreicht, sodass hier ein Zusammenhang dennoch möglich scheint.

Tabelle 22: Assoziationen zwischen der KAI1-wt Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen

Assoziation zwischen KAI1-Wildtyp und	Signifikanz
Alter (<= 64 Jahre vs. >64 Jahre)	0,052
Nodalstatus (N0 vs. N1)	0,355
Fernmetastasen (M0 vs. M1)	0,580
Operationsergebnis (Tumorrest <1cm vs. Tumorrest >1cm)	0,970
FIGO (Stadium 3 vs. Stadium 4)	0,534
Chemotherapie (platinhaltig vs. nicht-platinhaltig)	0,775
Pathologie (Seröses Karzinom vs. andere Subtypen)	0,684

4.3.2.2 KAI1-wt als prognostischer Faktor

Um herauszufinden, ob die Höhe der Expression von KAI1 einen Einfluss auf das Überleben hat, wurden mit Hilfe des Programms „R for statistical computing“ für jede Betrachtung ein optimaler *cut point* errechnet. Anschließend wurden damit Kaplan-Meier-Kurven erstellt, das mediane Überleben berechnet und Überlebenstabellen erstellt (vgl. Kapitel 3.5). Als Endpunkte wurden Tod, Rezidiv und kombiniertes krankheitsfreies Überleben betrachtet, eine Kombination aus Rezidiv und Tod ohne vorheriges Rezidiv. Es wurden dabei ausschließlich die Daten der Primärtumoren verwendet (n=100).

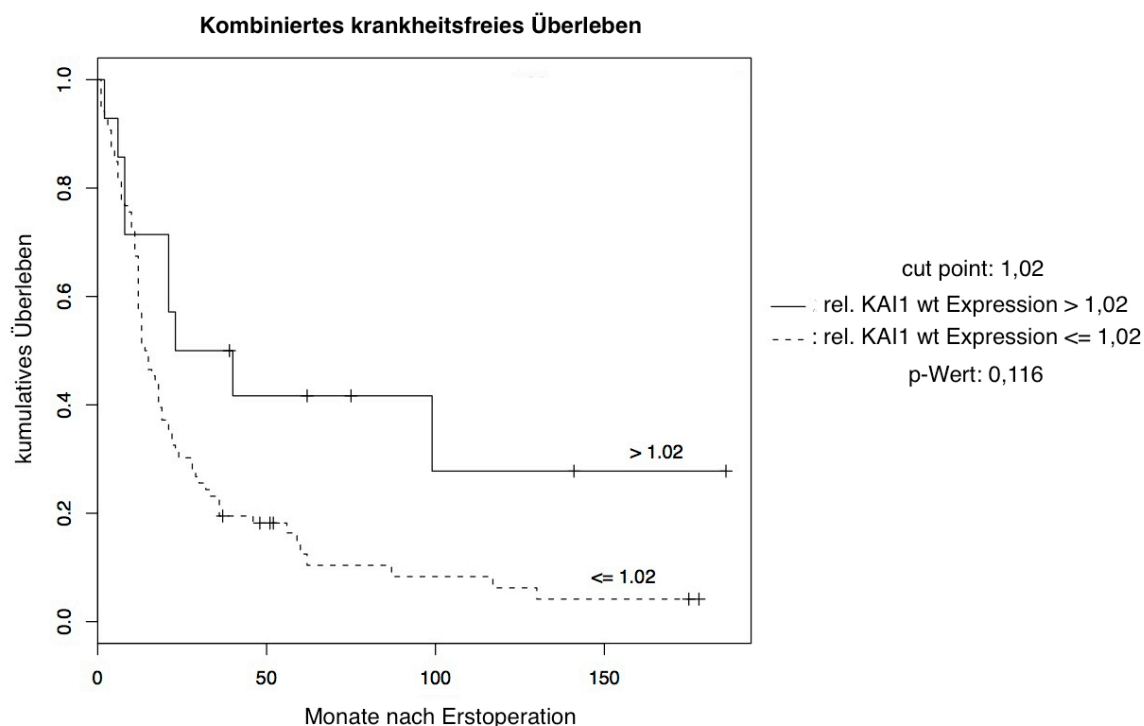


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben nach Expression von KAI1-wt bei einem *cut point* von 1,02. 14 Proben sind > 1,02 (9 Ereignisse) und 86 Proben sind <= 1,02 (77 Ereignisse). Der p-Wert der maximalen Teststatistik beträgt 0,116 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für hohe KAI1-wt Expressionswerte zu erkennen.

Die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben finden sich im Anhang.

Tabelle 23: Übersicht der statistischen Auswertung für KAI1-wt. Betrachtet wurden drei verschiedene Endpunkte: Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Cp: *cut point*, Mon: Monate, KI: 95%-Konfidenzintervall, Inf: Infinity (=unendlich)

KAI1-wt	Gesamtüberleben	Rezidivfreies Überleben	Kombiniertes krankheitsfreies Überleben
<i>Cut point</i>	1,02	1,02	1,02
Proben > cp	14 (9 Ereignisse)	14 (7 Ereignisse)	14 (9 Ereignisse)
Proben <= cp	86 (71 Ereignisse)	86 (66 Ereignisse)	86 (77 Ereignisse)
p-Wert der maximalen Teststatistik	0,209	0,194	0,116
Hazard Ratio (95%KI)			
> cp	0,50 (0,25-1,00)	0,45 (0,21-0,99)	0,46 (0,23-0,93)
<= cp	1	1	1
Medianes Überleben			
> cp	75 Mon (KI: 44-Inf)	40 Mon (KI: 21-Inf)	31,5 Mon (KI: 21-Inf)
<= cp	33 Mon (KI: 25-46)	15 Mon (KI: 13-21)	14,5 Mon (KI: 12-19)
3-Jahres-Überleben			
> cp	71,4% (±12,1%)	55,0% (±13,7%)	50,0% (±13,4%)
<= cp	48,7% (±5,4%)	23,5% (±4,9%)	19,5% (±4,3%)
5-Jahres-Überleben			
> cp	55,6% (±13,6%)	44,0% (±14,8%)	41,7% (±13,5%)
<= cp	28,3% (±5,2%)	16,6% (±4,9%)	12,4% (±4,0%)

Obwohl die Ergebnisse keine statistische Signifikanz erreichen, kann anhand der Kaplan-Meier-Kurven ein Vorteil für hohe KAI1-Wildtyp Expressionswerte erkannt werden. Möglicherweise konnte aufgrund einer zu niedrigen Fallzahl insbesondere in der Gruppe mit hohem Expressionsniveau keine statistische Signifikanz erreicht werden. Auch die Hazard Ratio deutet für alle Endpunkte auf einen deutlichen Vorteil für eine hohe KAI1-wt Expression hin. Zu beachten sind zudem auch hier die breiten Konfidenzintervalle, sodass eine sichere Aussage nicht möglich ist. Der Vorteil für hohe KAI1-Wildtyp Expressionswerte wird gestützt von der Tatsache, dass das mediane Überleben für alle drei Betrachtungen einen deutlichen Vorteil zeigt. Insbesondere das rezidivfreie Überleben ist für hohe KAI1-Wildtyp Expressionswerte über 2,5-mal länger als für niedrige. Auch die Ergebnisse der Überlebenstabellen unterstreichen diese Einschätzung, es konnten sowohl für das 3- als auch für das 5-Jahres-Überleben deutliche Vorteile für hohe KAI1-Wildtyp Expressionswerte gezeigt werden. So beträgt das Gesamtüberleben für KAI1-wt > 1,02 nach fünf Jahren noch 55,6% ($\pm 13,6\%$), wohingegen in der Gruppe KAI1-wt $\leq 1,02$ nach der selben Zeit nur noch 28,3% ($\pm 5,1\%$) der Patientinnen leben. Ebenso haben nach drei Jahren Patientinnen mit einer KAI1-wt Expression > 1,02 zu 55,0% ($\pm 13,7\%$) kein Rezidiv erlitten, wohingegen nur 23,5% ($\pm 4,9\%$) der Patientinnen mit einer KAI1-wt Expression $\leq 1,02$ rezidivfrei sind.

Es ist also zusammenfassend davon auszugehen, dass bei höherer Fallzahl ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil für hohe Expressionswerte von KAI1-wt nachzuweisen sein könnte.

Die Betrachtung von Subgruppen erbrachte kein signifikantes Ergebnis.

4.3.2.3 Vergleich von Primärtumoren und Metastasen

Um Unterschiede in der Expression von KAI1-Wildtyp zwischen Primärtumoren und Metastasengewebe beurteilen zu können, wurden mit Hilfe der SPSS-Software Boxplots angefertigt. Mit Hilfe von Excel wurden Median, Mittelwert sowie maximaler und minimaler Wert ermittelt. Abschließend wurde der Mann-Whitney-U Test durchgeführt um eine Aussage über die Signifikanz machen zu können.

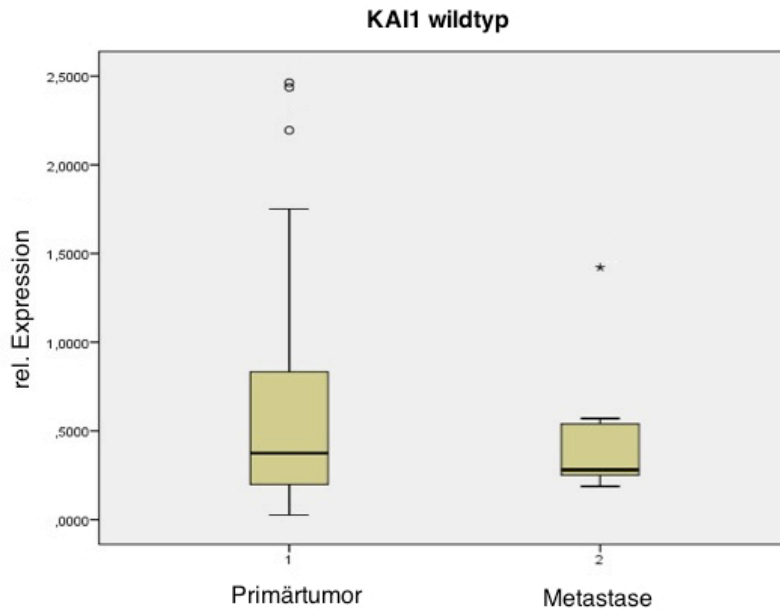


Abbildung 13: Expression von KAI1-Wildtyp in Primärtumoren und in Metastasengewebe.

Untersucht wurde das Gewebe von 100 Primärtumoren und sieben Metastasen, davon waren sechs im Omentum majus lokalisiert und eine am Uterus.

Der Median der relativen KAI1-wt Expression beträgt für die Primärtumoren 0,37. Die Werte liegen zwischen 0,05 und 2,46, der Mittelwert beträgt 0,58. Für die Metastasen beträgt der Median der KAI1-wt Expression 0,28. 0,19 ist hier der minimale und 1,42 der maximale Wert, der Mittelwert beträgt 0,50.

Im Mann-Whitney-U Test zeigt sich bei einer Signifikanz von 0,860 keine Differenz in der Stärke der KAI1-wt Expression zwischen Primärtumoren und Metastasengewebe. Es scheint, als würden in Primärtumoren höhere KAI1-wt Expressionswerte als in Metastasen möglich sein. Dieser Eindruck kann jedoch auch durch die geringe Fallzahl der Metastasengewebe hervorgerufen werden.

4.3.3 Die Spleißvariante KAI1-splice

4.3.3.1 Assoziationen zwischen der KAI1-splice Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen

Analog zu Kapitel 4.3.2.1 wurde die Assoziation zwischen KAI1-splice und klinisch-pathologischen Merkmalen untersucht. In Tabelle 24 zeigt sich, dass keine Zusammenhänge nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 24: Assoziationen zwischen der KAI1-splice Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen

Assoziation zwischen KAI1-splice und	Signifikanz
Alter (<= 64 Jahre vs. >64 Jahre)	0,733
Nodalstatus (N0 vs. N1)	0,832
Fernmetastasen (M0 vs. M1)	0,789
Operationsergebnis (Tumorrest <1cm vs. Tumorrest >1cm)	0,153
FIGO (Stadium 3 vs. Stadium 4)	0,914
Chemotherapie (platinhaltig vs. nicht-platinhaltig)	0,492
Pathologie (Seröses Karzinom vs. andere Subtypen)	0,794

4.3.3.2 KAI1-splice als prognostischer Faktor

Optimaler *cut point*, Kaplan-Meier-Kurven, Überlebenstabellen und medianes Überleben wurden, wie in Kapitel 3.5 beschrieben berechnet, um den prognostischen Wert von KAI1-splice beurteilen zu können. Es wurden dabei die Endpunkte Tod, Rezidiv und kombiniertes krankheitsfreies Überleben betrachtet. Es wurden ausschließlich die Daten der Primärtumoren verwendet (n=100).

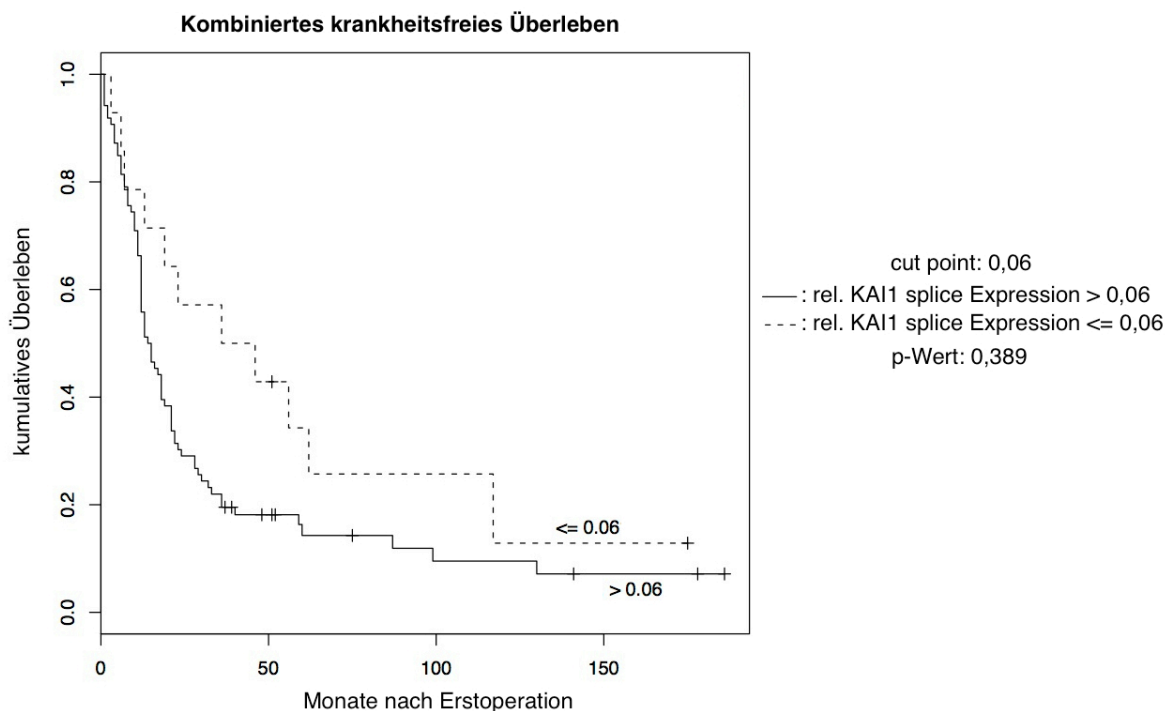


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben nach Expression von KAI1-splice bei einem *cut point* von 0,06. 86 Proben sind > 0,06 (75 Ereignisse) und 14 Proben sind <= 0,06 (11 Ereignisse). Der p-Wert der maximalen Teststatistik beträgt 0,389 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte zu erkennen.

Die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben finden sich im Anhang.

Tabelle 25: Übersicht der statistischen Auswertung für KAI1-splice. Betrachtet wurden drei verschiedene Endpunkte: Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Cp: *cut point*, Mon: Monate, KI: 95%-Konfidenzintervall, Inf: Infinity (=unendlich)

KAI1-splice	Gesamtüberleben	Rezidivfreies Überleben	Kombiniertes krankheitsfreies Überleben
<i>Cut point</i>	0,10	0,06	0,06
Proben > cp	76 (64 Ereignisse)	86 (64 Ereignisse)	86 (75 Ereignisse)
Proben <= cp	24 (16 Ereignisse)	14 (9 Ereignisse)	14 (11 Ereignisse)
p-Wert der maximalen Teststatistik	0,533	0,389	0,389
Hazard Ratio (95%KI)			
> cp	1,58 (0,91-2,75)	1,82 (0,90-3,68)	1,72 (0,91-3,26)
<= cp	1	1	1
Medianes Überleben			
> cp	32 Mon (KI:25-46)	15 Mon (KI: 13-21)	14,5 Mon (KI: 12-21)
<= cp	61 Mon (KI:42-Inf)	46 Mon (KI: 23-Inf)	41 Mon (KI:19-Inf)
3-Jahres-Überleben			
> cp	47,3% (±5,7%)	23,1% (±4,9%)	19,5% (±4,3%)
<= cp	66,7% (±9,6%)	55,6% (±13,6%)	50,0% (±13,4%)
5-Jahres-Überleben			
> cp	25,6% (±5,3%)	18,2% (±5,0%)	14,3% (±4,1%)
<= cp	53,0% (±10,4%)	38,1% (±14,0%)	34,3% (±13,1%)

Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt einen tendenziellen Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte. Die Tatsache, dass keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte, kann in der niedrigen Fallzahl und/oder der Verteilung der Fälle um den *cut point* begründet sein. Auch bei Betrachtung des medianen Überlebens wird ein Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte deutlich. Insbesondere die Zeit bis zum Rezidiv ist für niedrige KAI1-splice Expressionswerte mit 46 Monaten über dreimal so lang als bei hohen Expressionswerten mit 15 Monaten. Das 3- und 5-Jahres-Überleben können diese Einschätzung weiter unterstreichen: Während nach fünf Jahren noch 53,0% ($\pm 10,4\%$) der Patientinnen mit niedriger KAI1-splice Expression leben, sind es in der Gruppe mit hoher Expression nur noch 25,6% ($\pm 5,3\%$). Ähnlich sieht es bei der 5-Jahres-Rezidivfreiheit aus: 38,1% ($\pm 14,0\%$) Rezidivfreiheit für Patientinnen mit rel. KAI1-splice $\leq 0,06$ gegen 18,2% ($\pm 5,0\%$) für Patientinnen mit rel. KAI1-splice $> 0,06$. Auch die Hazard Ratio bekräftigt diesen Vorteil.

Zusammenfassend liefern Kaplan-Meier-Kurven, Überlebensdaten und die Hazard Ratio einen deutlichen Hinweis darauf, dass niedrige Expressionswerte von KAI1-splice einen Vorteil für alle drei betrachteten Endpunkte aufweisen. Die fehlende Signifikanz der Ergebnisse ist vermutlich durch die geringe Fallzahl in der Gruppe „niedrige Expression“ sowie möglicherweise durch ein zu kleines Gesamtkollektiv bedingt.

4.3.3.2.1 Untergruppe M0

Da KAI1 eine Rolle als Suppressor von Metastasen zugeteilt wird, schien es interessant, hier genauere Betrachtungen anzustellen. Es wurden Subgruppen von Patientinnen gebildet, um homogenere Patientenkollektive zu erhalten. Die Subgruppe M0 enthält Patientinnen, bei welchen keine Fernmetastasen festgestellt werden konnten (alle FIGO-Stadium III) und die Subgruppe M1 enthält Patientinnen, bei welchen Fernmetastasen festgestellt wurden (FIGO-Stadium IV). In der Gruppe M0 konnte für die Betrachtung des Rezidivereignisses sowie des kombinierten Endpunktes ein signifikantes Ergebnis gezeigt werden, wie in Abbildung 15 dargestellt wird.

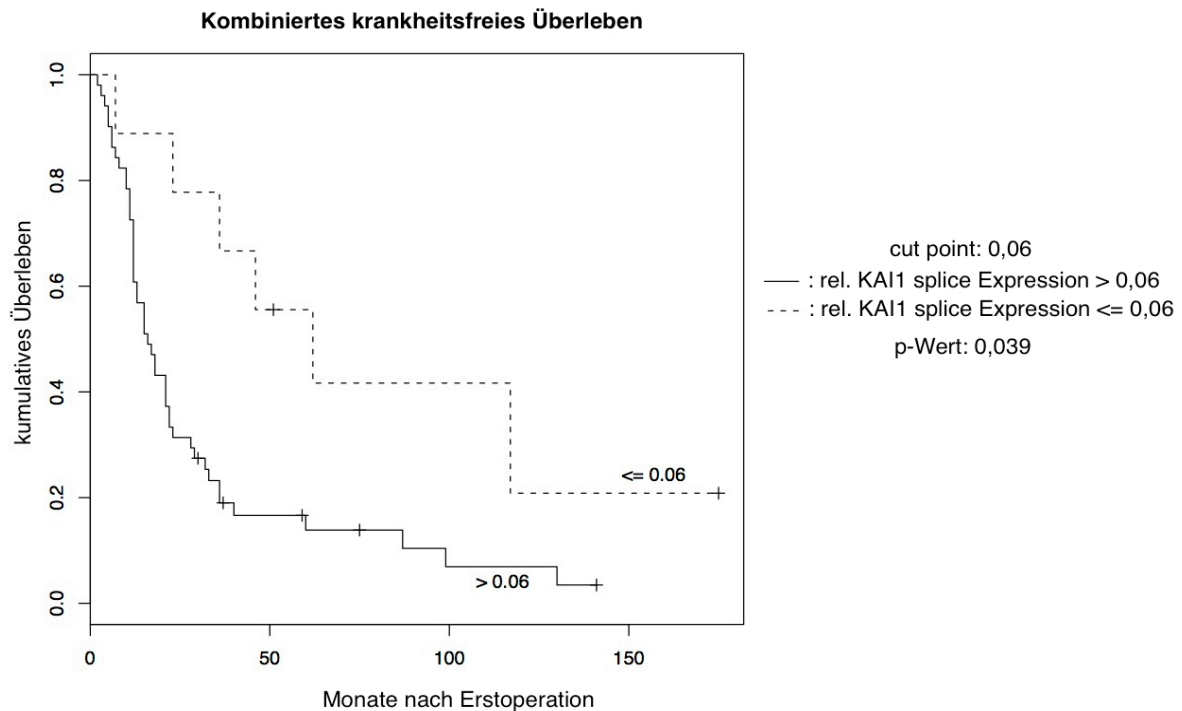


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben nach Expression von KAI1-splice für das Subkollektiv der nicht-fernmastasierten Patientinnen bei einem *cut point* von 0,06. 51 Proben sind > 0,06 (46 Ereignisse) und 9 Proben sind <= 0,06 (6 Ereignisse). Der p-Wert der maximalen Teststatistik beträgt 0,039 und ist somit signifikant. Es besteht ein Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte.

Die Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben findet sich im Anhang.

Tabelle 26: Übersicht der statistischen Auswertung für KAI1-splice für das Subkollektiv der nicht-metastasierten Patientinnen. Betrachtet wurden drei verschiedene Endpunkte: Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Cp: *cut point*, Mon: Monate, KI: 95%-Konfidenzintervall, Inf: Infinity (=unendlich)

KAI1-splice M0	Gesamtüberleben	Rezidivfreies Überleben	Kombiniertes krankheitsfreies Überleben
<i>Cut point</i>	0,06	0,06	0,06
Proben > cp	51 (43 Ereignisse)	51 (42 Ereignisse)	51 (46 Ereignisse)
Proben <= cp	9 (6 Ereignisse)	9 (5 Ereignisse)	9 (6 Ereignisse)
p-Wert der maximalen Teststatistik	0,301	0,040	0,039
Hazard Ratio (95%KI)			
> cp	2,12 (0,90-5,00)	3,06 (1,19-7,87)	2,76 (1,16-6,54)
<= cp	1	1	1
Medianes Überleben			
> cp	40 Mon (KI: 29-59)	16 Mon (KI: 12-23)	16 Mon (KI: 12-22)
<= cp	73,5 Mon (KI: 50-Inf)	62 Mon (KI: 36-Inf)	62 Mon (KI: 36-Inf)
3-Jahres-Überleben			
> cp	54,7% (±7,0%)	20,0% (±6,1%)	19,0% (±5,6%)
<= cp	88,9% (±10,5%)	66,7% (±15,7%)	66,7% (±15,7%)
5-Jahres-Überleben			
> cp	32,9% (±6,8%)	13,3% (±5,6%)	13,9% (±5,1%)
<= cp	66,7% (±15,7%)	55,6% (±16,6%)	55,6% (±16,6%)

Für das Subkollektiv der nicht-metastasierten Patientinnen (M0) zeigen die Kaplan-Meier-Kurven einen deutlichen Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte. Dies kann durch einen signifikanten p-Wert der maximalen Teststatistik für rezidivfreies Überleben ($p=0,040$) und kombiniertes krankheitsfreies Überleben ($p=0,039$) bekräftigt werden. Auch die Hazard Ratio von 3,06 (Konfidenzintervall: 1,19-7,87) für rezidivfreies Überleben und 2,76 (Konfidenzintervall: 1,16-6,54) für kombiniertes krankheitsfreies Überleben illustrieren den starken Vorteil für niedrige Expressionsniveaus der Spleißvariante. Die Betrachtung des medianen Überlebens stützt diese Einschätzung mit einem Unterschied von 16 Monaten für hohe, vs. 62 Monaten für niedrigere Expressionswerte. Auch das 3-Jahres- bzw. 5-Jahres kombinierte krankheitsfreie Überleben bestätigen dies.

Zusammenfassend konnte ein signifikanter Vorteil für Patientinnen mit niedriger KAI1-splice Expression im Subkollektiv der Patientinnen im FIGO-Stadium III für die Endpunkte Rezidiv und kombiniertes krankheitsfreies Überleben gezeigt werden. Die fehlende Signifikanz im Gesamtüberleben könnte auf die geringe Fallzahl sowie die Verteilung der Proben um den *cut point* zurückzuführen sein.

Die Analyse weiterer Subgruppen ergab keine signifikanten Überlebensstatistiken.

4.3.3.3 Vergleich von Primärtumoren und Metastasen

Wie in Kapitel 4.3.2.3 beschrieben, wurde ein Boxplot erstellt, Lagemaße berechnet und der Mann-Whitney-U Test durchgeführt um Unterschiede in der Expression von KAI1-splice zwischen Primärtumoren und Metastasengewebe beurteilen zu können.

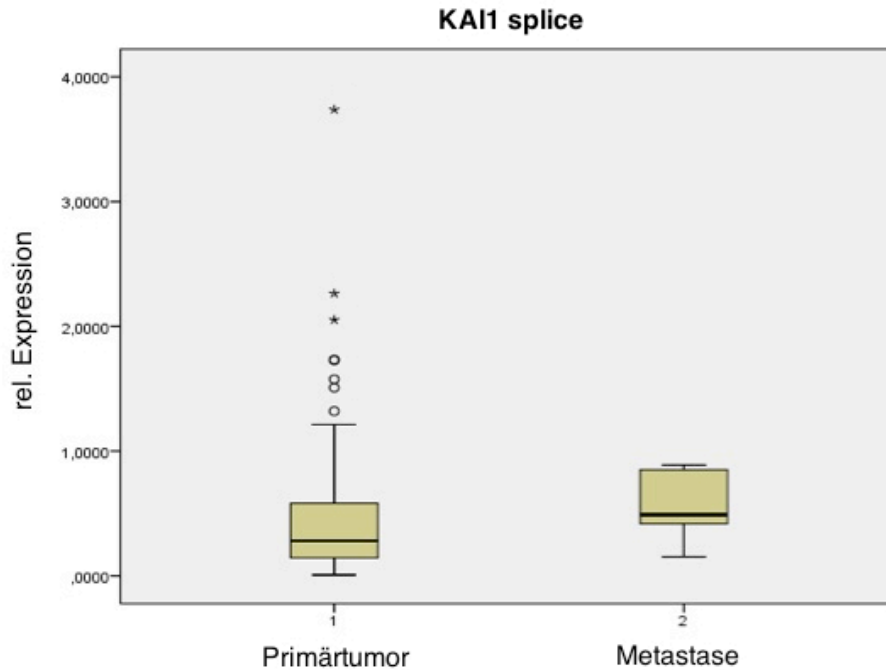


Abbildung 16: Expression von KAI1-splice in Primärtumoren und in Metastasengewebe.

Untersucht wurde das Gewebe von 100 Primärtumoren und sieben Metastasen, davon waren sechs im Omentum majus lokalisiert und eine am Uterus.

Für die Primärtumoren beträgt der Median der relativen KAI1-splice Expression 0,28. Es finden sich Werte von 0,01 bis 3,74, der Mittelwert beträgt 0,47. Der Median der KAI1-splice Expression für die Metastasen beträgt 0,49. Der minimale Wert beträgt 0,15 und der maximale 0,89, der Mittelwert 0,58.

Der Mann-Whitney-U Test zeigt für die Verteilung der relativen Expression von KAI1-splice zwischen Metastasen und Primärtumoren einen signifikanten Unterschied bei einer Signifikanz von 0,034. Es kann somit gezeigt werden, dass sich die Expression der Spleißvariante in Primärtumoren und Metastasengewebe unterscheidet. Zu beachten ist jedoch die relativ geringe Fallzahl der Metastasengewebe (n=7).

4.3.4 Integrin αv

4.3.4.1 Assoziation zwischen der ITGAV Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der ITGAV-Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen wurde, wie in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben, mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests untersucht. Wie in Tabelle 27 deutlich wird, konnte keine Assoziation mit klinischen oder pathologischen Merkmalen gezeigt werden.

Tabelle 27: Assoziationen zwischen der ITGAV Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen

Assoziation zwischen ITGAV und	Signifikanz
Alter (≤ 64 Jahre vs. >64 Jahre)	0,607
Nodalstatus (N0 vs. N1)	0,903
Fernmetastasen (M0 vs. M1)	0,508
Operationsergebnis (Tumorrest <1 cm vs. Tumorrest >1 cm)	0,888
FIGO (Stadium 3 vs. Stadium 4)	0,467
Chemotherapie (platinhaltig vs. nicht-platinhaltig)	0,218
Pathologie (Seröses Karzinom vs. andere Subtypen)	0,381

4.3.4.2 ITGAV als prognostischer Faktor

Auch für ITGAV wurden Berechnungen zur Beurteilung des prognostischen Werts angefertigt. Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, wurden optimaler *cut point*, Kaplan-Meier-Kurven, Überlebenstabellen, medianes Überleben und die Hazard Ratio für die Endpunkte Tod, Rezidiv und kombiniertes krankheitsfreies Überleben berechnet. Es wurden wiederum ausschließlich die Daten der Primärtumoren verwendet (n=100).

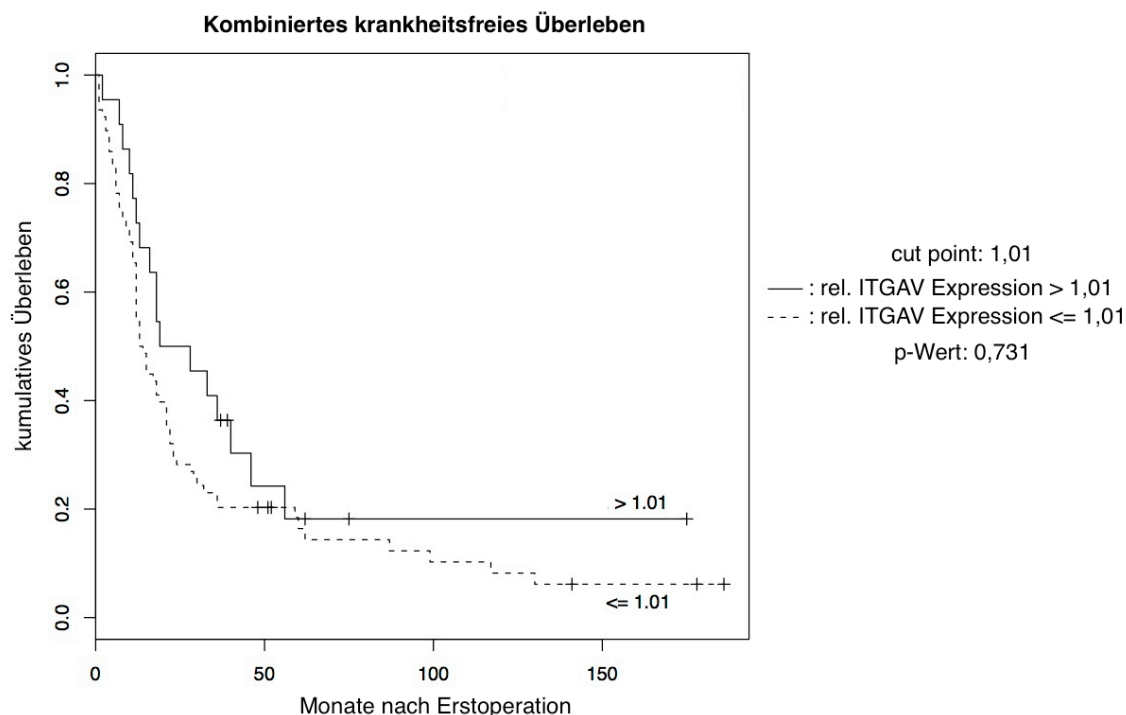


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben nach Expression von ITGAV bei einem *cut point* von 1,01. 22 Proben sind > 1,01 (17 Ereignisse) und 78 Proben sind <= 1,01 (69 Ereignisse). Der p-Wert der maximalen Teststatistik beträgt 0,731 und ist somit nicht signifikant.

Die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben finden sich im Anhang.

Tabelle 28: Übersicht der statistischen Auswertung für ITGAV. Betrachtet wurden drei verschiedene Endpunkte: Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Cp: *cut point*, Mon: Monate, KI: 95%-Konfidenzintervall, Inf: Infinity (=unendlich)

ITGAV	Gesamtüberleben	Rezidivfreies Überleben	Kombiniertes krankheitsfreies Überleben
<i>Cut point</i>	0,52	0,57	1,01
Proben > cp	62 (47 Ereignisse)	56 (43 Ereignisse)	22 (17 Ereignisse)
Proben <= cp	38 (33 Ereignisse)	44 (30 Ereignisse)	78 (69 Ereignisse)
p-Wert der maximalen Teststatistik	0,957	0,978	0,731
Hazard Ratio (95%KI)			
> cp	0,79 (0,50-1,23)	1,25 (0,78-2,00)	0,69 (0,41-1,18)
<= cp	1	1	1
Medianes Überleben			
> cp	40 Mon (KI: 30-50)	15 Mon (KI: 13-28)	23,5 Mon (KI: 16-56)
<= cp	30,5 Mon (KI: 18-59)	21 Mon (KI: 12-62)	13,5 Mon (KI: 12-21)
3-Jahres-Überleben			
> cp	56,5% (±6,3%)	22,8% (±6,0%)	36,4% (±10,3%)
<= cp	44,4% (±8,1%)	34,9% (±7,5%)	20,3% (±4,6%)
5-Jahres-Überleben			
> cp	34,7% (±6,3%)	13,7% (±5,5%)	18,2% (±9,0%)
<= cp	28,0% (±7,8%)	29,9% (±7,9%)	16,4% (±4,5%)

Bei Betrachtung der Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben scheint es, als bestehe tendenziell ein geringer Vorteil für hohe ITGAV Expressionswerte. Betrachtet man den p-Wert der maximalen Teststatistik von bis zu 0,978, wird die prognostische Aussagekraft von ITGAV jedoch fraglich. Diese Einschätzung wird auch durch die Überlebensdaten bekräftigt: Das mediane Überleben zeigt beim Gesamtüberleben sowie kombinierten krankheitsfreien Überleben einen geringen Vorteil für hohe Expressionsniveaus von ITGAV, wohingegen beim rezidivfreien Überleben eine niedrige Expression von Vorteil zu sein scheint. Betrachtet man die Konfidenzintervalle genauer, so bestärkt auch dies die Vermutung, dass die Höhe der ITGAV Expression keine prognostische Relevanz hat. Ähnlich verhält es sich mit der Hazard Ratio, welche ebenso entweder hohe oder tiefe Expressionswerte für die verschiedenen Endpunkte als vorteilhaft erachtet. Auch hier weisen weite Konfidenzintervalle auf eine eingeschränkte Aussagekraft hin. Berücksichtigt man die Standardabweichung, so liefern auch die Daten für das 3- und 5-Jahres-Überleben wenig aussagekräftige Schlüsse.

Zusammenfassend kann aufgrund der vorliegenden Daten eine prognostische Relevanz der ITGAV Expression weder ein- noch ausgeschlossen werden.

4.3.4.3 Vergleich von Primärtumoren und Metastasen

Um Unterschiede in der Expression von ITGAV zwischen Primärtumoren und Metastasengewebe beurteilen zu können, wurden wie in Kapitel 4.3.2.3 beschrieben, ein Boxplot erstellt, Lagemaße berechnet und der Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

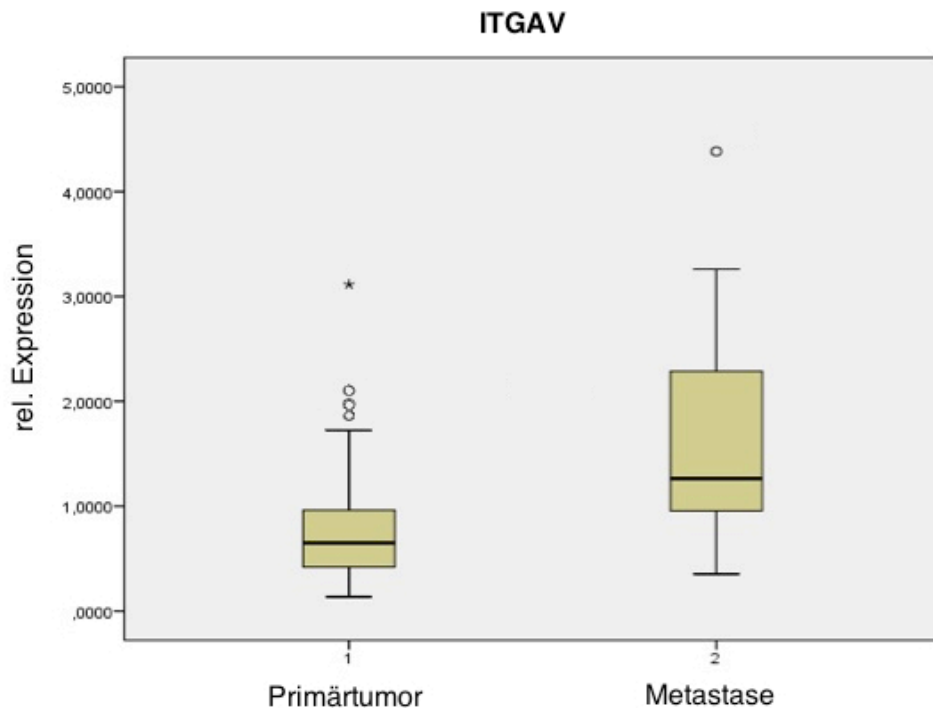


Abbildung 18: Expression von ITGAV in Primärtumoren und in Metastasengewebe

Untersucht wurde das Gewebe von 100 Primärtumoren und sieben Metastasen, davon waren sechs im Omentum majus lokalisiert und eine am Uterus.

Der Median der relativen ITGAV Expression für die Primärtumoren beträgt 0,65. Der minimale Wert beträgt 0,13 und der maximale 3,11, der Mittelwert 0,76. Für die Metastasen beträgt der Median der ITGAV Expression 1,26. Die Werte erstrecken sich von 0,35 bis 4,38 und der Mittelwert beträgt 1,78.

Im Mann-Whitney-U Test zeigt sich eine Signifikanz von 0,017 für Expressionsunterschiede zwischen Metastasen und Primärtumoren. Auch im Boxplot sind höhere ITGAV- Expressionswerte bei den Metastasen zu erkennen. Es kann somit gezeigt werden, dass sich die Expression von ITGAV in Geweben von Metastasen und Primärtumoren unterscheidet. Zu beachten ist jedoch die relativ geringe Fallzahl der Metastasengewebe.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die relative Genexpression des Wildtyps von KAI1 (KAI1-wt), seiner Spleißvariante (KAI1-splice) und des Integrins α_v (ITGAV) wurde in 100 primären Ovarialkarzinomen sowie sieben Metastasen anhand des TaqMan-Systems bestimmt. Zur Detektion von ITGAV sowie den Housekeeper-Genen HPRT1 und ALAS1 konnten vorgefertigte TaqMan Gene Expression Assays von Applied Biosystems verwendet werden. Für KAI1-wt und KAI1-splice wurden eigens für die vorliegende Arbeit Primer und Sonden der Firma Tib Molbiol angefertigt. Der Vorwärtsprimer für KAI1-wt liegt innerhalb von Exon 7, sodass ein Signal nur dann zustande kommt, wenn dieses exprimiert wird. Der Vorwärtsprimer für KAI1-splice hingegen überspannt Exon 7 komplett, sodass dieser sich nur an die Spleißvariante anlagern kann. Nach automatischer Berechnung des Schwellenwerts (CT-Wert) wurde die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung nach M.Pfaffl durchgeführt.

5.1.1 TaqMan RT-PCR

Die Real-time PCR (RT-PCR) ermöglicht eine Quantifizierung der Genexpression in Echtzeit und ist eine etablierte und leistungsstarke Methode für Genexpressionsstudien [Holzapfel *et al.* 2007; Li *et al.* 2009]. Sie basiert darauf, dass Fluoreszenzsignale in jedem PCR Zyklus generiert werden und dadurch Rückschlüsse auf den anfänglichen mRNA-Gehalt des Gewebes gemacht werden können [Scheffe *et al.* 2006; Holzapfel *et al.* 2007]. Aufgrund der detaillierten Anleitungen und Leitfäden, wird das TaqMan-System im Vergleich zu anderen Methoden als eine relativ fehlerarme und genaue Technik betrachtet [Wong *et al.* 2005].

Die häufigste Fehlerquelle für Experimente mit RT-PCR ist die durchführende Person selbst [Wong *et al.* 2005]. Bereits kleine Pipettierungenauigkeiten können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Um solche Fehler besser erkennen zu können, wurden alle Proben für diese Arbeit als Doppelwerte gemessen. Ab einer Standardabweichung von $>0,3$ zwischen identischen Proben ist die Genauigkeit der Daten fragwürdig [Biosystems 2008]. Dies kam bei den vorgefertigten Assays für ITGAV, ALAS1 und HPRT1 insgesamt sehr selten vor (jeweils zwei mal für ITGAV

und ALAS1 sowie drei mal für HPRT1). Da die Reagenzien bei den Versuchen bereits aufgebraucht waren, wurde aus ökonomischen Gründen darauf verzichtet, diese sieben Werte zu wiederholen. Für die beiden Varianten des KAI1-Gens waren mehr Pipettier-Schritte nötig, was sich auch in der Genauigkeit niederschlug. Beim Wildtyp hatten 11 Werte eine Standardabweichung $>0,3$ und bei der Spleißvariante 13 Werte. Für diese Werte wurde in einem weiteren Lauf jeweils ein dritter Wert gemessen und anschließend der Mittelwert des Triplikats verwendet.

Um Proben von verschiedenen TaqMan-Läufen vergleichen zu können, wurden vier Referenzproben (Zelllinien) auf jeder Platte mitgeführt [Wong *et al.* 2005]. Von deren CT-Werten wurde jeweils der Mittelwert gebildet und die Expressionswerte der verschiedenen Platten hiernach angeglichen, um Unterschiede zwischen einzelnen TaqMan-Läufen korrigieren zu können.

5.1.2 Effizienz der PCR-Reaktionen

Die korrekte Bestimmung der Effizienz ist neben dem korrekten CT-Wert entscheidend für die Datenanalyse einer RT-PCR. In einer optimalen PCR-Reaktion liegt die Effizienz bei 100%, was bedeutet, dass sich die Anzahl der DNA-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt. Im Alltag liegt die Effizienz, empirisch betrachtet, jedoch meist zwischen 65% und 90% [Pfaffl 2004; Schefe *et al.* 2006]. Für die vorliegende Arbeit wurde die Effizienz deshalb für jedes Gen einzeln bestimmt. Eine häufig verwendete Methode hierfür ist die Herstellung von Standardkurven aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Hierfür kann eine repräsentative Mischprobe verwendet werden, welche sich idealerweise aus allen verwendeten Proben zusammensetzt [Pfaffl 2004]. Für die vorliegende Arbeit wurde eine Mischprobe bestehend aus sechs Geweben hergestellt, da nicht genügend RNA-Material von allen Proben verfügbar war. Diese sechs Proben wurden so ausgewählt, dass der Median des CT-Werts für dieses Kollektiv in etwa dem medianen CT-Wert des Gesamtkollektivs entsprach und somit davon ausgegangen werden konnte, dass die Mischprobe in Bezug auf den RNA-Gehalt mit dem Gesamtkollektiv vergleichbar ist. Für die vorliegende Arbeit wurden sechs Verdünnungsstufen (1:2, 1:10, 1:20, 1:100, 1:200 und 1:1000) verwendet, für ein valides Ergebnis werden mindestens drei Verdünnungsstufen für die Standardkurve benötigt [Schefe *et al.* 2006; Towe *et al.* 2010]. Sowohl für den Wildtyp, als auch für die Spleißvariante von KAI1 konnte die

niedrigste Verdünnung (1:2) nicht verwendet werden weil sie in der Auswertung einen starken Ausreißer zeigte, während alle anderen Werte sehr gut korrelierten. Dies ist ein bekanntes Phänomen und erklärt sich durch die Anwesenheit eines Störfaktors in der PCR-Reaktion, welcher bei größeren Verdünnungen inaktiviert wird. Die Effizienzbestimmung für die beiden KAI1 Genvarianten erbrachte ein $E > 2$, also eine Effizienz über 100%, was theoretisch nicht möglich ist. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Effizienzberechnung über Verdünnungskurven nicht selten Werte über 2,0 bis 2,2 ergibt [Pfaffl 2004]. Die Ursache hierfür ist, dass bei Verdünnungskurven eine Tendenz dazu besteht, E zu überschätzen [Pfaffl 2004; Wong *et al.* 2005; Schecke *et al.* 2006].

Da alle Werte unter denselben Bedingungen berechnet wurden und die Relation der Probenwerte untereinander somit stimmig sein sollte, sind die berechneten Effizienzwerte für diese Arbeit am genauesten (eine nicht-effizienzkorrigierte Berechnung würde mit noch größerer Ungenauigkeit behaftet sein) und wurden deshalb verwendet.

5.1.3 Relative Quantifizierung

Während bei der absoluten Quantifizierung mit Hilfe einer Kalibrierkurve die absolute Menge an Nukleinsäure im Ausgangsgewebe berechnet wird, bezieht sich die relative Quantifizierung auf ein Referenzgen, einen sogenannte Housekeeper. Dieses Vorgehen wird als Normalisierung bezeichnet und hat den Vorteil, dass Unterschiede im Zelleinsatz, der RNA-Qualität und der individuellen PCR-Effizienz dabei korrigiert werden können [de Kok *et al.* 2005]. Es gibt verschiedene Methoden um eine relative Quantifizierung durchzuführen, dennoch gibt es kein Modell, welches allgemein als das Zuverlässigste gilt und empfohlen wird. Vielmehr muss das Rechenmodell dem jeweiligen Projekt angepasst werden. Häufig wird die vergleichende CT Methode ($2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode) verwendet, welche auch von Applied Biosystems empfohlen wird, jedoch sollten dazu die PCR-Effizienz des Zielgens und des Housekeepers in etwa gleich sein [Livak *et al.* 2001; Wong *et al.* 2005; Biosystems 2010]. Da im Vorfeld nicht bekannt war, wie gut die speziell angefertigten Primer und Sonden funktionieren würden und ob deren Effizienz mit der der fertigen Assays übereinstimmen würde, war es notwendig, die Effizienz für jedes Gen mit

Hilfe von Verdünnungskurven zu bestimmen und die relative Genexpression basierend hierauf effizienzkorrigiert zu berechnen.

Das Modell nach Pfaffl vereint die Normalisierung und die Quantifizierung in einer Rechenformel. Durch die Effizienzkorrektur können Unterschiede zwischen verschiedenen Assays ausgeglichen werden [Wong *et al.* 2005]. Dieses Modell wurde 2001 etabliert und gehört seitdem zu den bedeutendsten Rechenmodellen für die relative Quantifizierung von RNA [Fleige *et al.* 2006]. Pfaffl und Kollegen konnten mit diesem Rechenmodell bei Versuchen mit dem LightCycler-System eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zeigen (<2,5% Schwankung) [Pfaffl 2001].

5.1.4 Housekeeper

Housekeeper (HK) sind Gene, welche grundlegende und ubiquitäre Zellfunktionen regulieren und daher unerlässlich für das Überleben einer Zelle sind [Pfaffl 2001; de Kok *et al.* 2005]. Sie werden idealerweise immer konstant exprimiert, sind nicht reguliert und haben keine Verbindung zum untersuchten Gen [Ohl *et al.* 2005; Li *et al.* 2009]. Housekeeper werden für die Interpretation der relativen Genexpression verwendet da es nötig ist, die gemessenen CT-Werte zu normalisieren um Unterschiede im Zelleinsatz, der RNA-Qualität und der individuellen PCR-Effizienz der einzelnen Proben zu korrigieren [de Kok *et al.* 2005]. Es gibt kein Housekeepergen, welches eindeutig am stabilsten ist. De Kok und Kollegen empfahlen HPRT1 als bestes Gen für verschiedene Tumoren und Versuche bei welchen nur ein Housekeeper verwendet wird, während die Forschungsgruppe um Jacob HSPCB, RRN18S und RPS13 als stabilste HK beschreiben [de Kok *et al.* 2005; Jacob *et al.* 2013]. Auch für das seröse Ovarialkarzinom im Speziellen wurden in einer Studie von Li und Kollegen verschiedene Housekeepergene untersucht. Hier erwiesen sich GUSB, PPIA und TBP als stabilste Housekeeper [Li *et al.* 2009].

Da derzeit also kein optimaler Housekeeper bekannt ist, besteht die beste Option darin, die durchschnittliche Expression mehrerer Housekeeper zur Normalisierung zu verwenden weil so zuverlässigere Ergebnisse erzielt werden können [de Kok *et al.* 2005; Wong *et al.* 2005; Li *et al.* 2009]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit zwei Genen umgesetzt. Idealerweise werden im Vorfeld mehrere Housekeeper speziell für die jeweilige Studie getestet und die drei besten ausgewählt. Spezielle Programme können hierbei über verschiedenen Algorithmen die stabilsten

Housekeeper identifizieren [Jacob *et al.* 2013]. In vorausgegangenen Arbeiten unserer Forschungsgruppe wurden fünf Housekeeper getestet und mit Hilfe des Programms geNorm ausgewertet. ALAS1 und HPRT1 erwiesen sich hierbei als die beiden besten Housekeeper für das Ovarialkarzinom. Da dieses Vorgehen sehr aufwendig und kostenintensiv ist, wurde entschieden, auch für das hier verwendete Kollektiv diese beiden bereits etablierten Housekeeper zu verwenden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel auf, dass die Relation der relativen Expression verschiedener Tumorproben zueinander, für die beiden Housekeeper ALAS1 und HPRT1 einzeln gesehen, nicht immer übereinstimmt. So ist davon auszugehen, dass auch die Expression dieser Housekeeper-Gene nicht absolut stabil ist. Verschiedene Faktoren wie z.B. Hypoxie können zu Expressionsveränderungen und damit zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen [de Kok *et al.* 2005; Ohl *et al.* 2005]. Dies könnte die beobachteten Expressionsunterschiede erklären und verdeutlicht, dass auch die Normalisierung mittels Housekeepergenen eine Fehlerquelle darstellen kann. Durch die Verwendung von >1 Referenzgenen sollten hier etwaige Expressionsschwankungen ausgeglichen werden.

Alternativ zur Verwendung von Housekeepergenen kann auch auf die Gesamtmenge an eingesetztem Gewebe bzw. auf die Zellzahl normiert werden. Diese ist jedoch oft schwierig zu bestimmen und das Verfahren ist sehr zeitaufwendig. Auch eine Normalisierung auf die Gesamt-RNA ist möglich, aber auch hier unterlaufen häufig Fehler. Zudem haben beide Methoden den Nachteil, dass Unterschiede in der RNA-Qualität und PCR-Effizienz nicht korrigiert werden [de Kok *et al.* 2005; Huggett *et al.* 2005].

In Abwägung aller Vor- und Nachteile erscheint die in dieser Arbeit gewählte Vorgehensweise somit als diejenige, die für die Fragestellungen am besten geeignet war.

5.2 Erörterung der Ergebnisse und Einordnung in die Studienlage

5.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Das KAI1-Gen wurde erstmals im Prostatakarzinom als Tumorsuppressor identifiziert. Seither konnte sowohl das KAI1 Transkript, als auch das Protein, in vielen weiteren menschlichen Geweben nachgewiesen werden [Dong *et al.* 1995]. Es wird vermutet, dass KAI1 insbesondere die Entstehung von Metastasen beeinflusst und unterdrückt, indem es die Ablösung entarteter Zellen vom Primärtumor hemmt, sowie deren Migrations- und Invasionspotential schwächt [Liu *et al.* 2006; Moez *et al.* 2011]. Die genaue Funktionsweise von KAI1 ist jedoch vielfach noch unverstanden. Da KAI1 selbst keine intrinsische Aktivität besitzt, wird angenommen, dass seine Effekte durch Protein-Interaktionen zustande kommen. So inhibiert KAI1 möglicherweise die Zellmigration, indem es die Funktion von Proteinen, welche für die Zellmotilität wichtig sind, moduliert. Zu diesen Proteinen gehören neben Signalmolekülen und dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR vor allem auch Zelladhäsionsmoleküle, zum Beispiel Integrine [Liu *et al.* 2006]. Wie in dieser Arbeit erörtert, zeigte die Analyse öffentlicher Datensets, dass ein hohes Expressionsniveau von KAI1 in Ovarialtumoren einen positiven prognostischen Effekt hat.

Es ist bislang nicht genau bekannt, welcher Mechanismus die Tumor und Metastasen supprimierende Funktion von KAI1 beeinträchtigt. Möglicherweise spielt hier u.a. ein verändertes Spleißverhalten im Tumor eine wichtige Rolle. Eine potentiell funktionslose KAI1-Spleißvariante (KAI1-splice) wurde 2003 erstmals bei Magenkarzinompatienten beschrieben. Durch alternatives Spleißen entfällt bei KAI1-splice das Exon 7, strukturell fehlt im fertigen Protein dadurch ein Teil der großen extrazellulären Schleife. Es war aufgefallen, dass KAI1-splice verstärkt bei Patienten mit schlechter Prognose gefunden wurde, während Patienten mit guter Prognose die Spleißvariante kaum exprimierten [Lee *et al.* 2003]. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, welche unterschiedlichen Effekte KAI1-wt und seine Spleißvariante auf die Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinom haben. Da mittels der Analyse öffentlicher Datensätze keine Aussage zur den prognostischen Eigenschaften der Spleißvariante im Ovarialkarzinom gemacht werden kann, wurde

diese in Geweben von Ovarialkarzinompatientinnen des Klinikums Rechts der Isar, TUM, analysiert.

In unseren Experimenten wurde die Spleißvariante in allen untersuchten Ovarialkarzinomgeweben nachgewiesen. Die hohen CT Werte von KAI1-splice in der Realtime PCR (Mittelwert 31,5 Median 31,1) verglichen mit KAI1-wt (Mittelwert 27,1 Median 26,8), trotz derselben Menge an eingesetzter RNA, lassen jedoch vermuten, dass die Spleißvariante in wesentlich geringerem Ausmaß produziert wird als der Wildtyp. Ein durchschnittlicher Unterschied von 4 Zyklen bedeutet eine ca. 16-fach höhere Konzentration des Wildtyp-Transkripts. Hieraus leitet sich die Frage ab, in wie weit das Vorkommen der Spleißvariante einen funktionellen Einfluss hat. Im Spearman-Test konnte zudem ein mäßig starker, positiver Zusammenhang der Expression vom Wildtyp und der Spleißvariante des KAI1-Gens gezeigt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Spleißvariante abhängig von der KAI1 Gesamtexpression immer zu einem gewissen Prozentsatz gebildet wird und somit die Expression der Spleißvariante an sich nicht pathologisch ist. Dann wäre es auch wahrscheinlich, dass sich ein klinischer Einfluss auf die Prognose nur dann zeigt, wenn das Expressionsniveau der Spleißvariante im Vergleich zum Wildtyp einen gewissen Anteil übersteigt. Hier wären auch weitere Untersuchungen mit Bestimmung der absoluten RNA-Menge interessant, um genauere Aussagen über das Verhältnis vom Wildtyp zur Spleißvariante machen zu können.

Auch in der Literatur wurde das Vorkommen der Spleißvariante bereits untersucht. Jackson und Kollegen konnten KAI1-splice im Urothelkarzinom in geringen Mengen in 15 von 20 Tumoren feststellen, während der Wildtyp in allen Proben nachgewiesen werden konnte. Sie konnten zudem zeigen, dass in allen Zelllinien die Expressionsniveaus der Spleißvariante drei- bis fünffach niedriger waren, als die des Wildtyps. Bei weiterführenden Untersuchungen von Zelllinien konnte die Spleißvariante ebenfalls in der Mehrheit der untersuchten Zelllinien in geringem Ausmaß nachgewiesen werden [Jackson *et al.* 2007]. Auch wenn diese Studie die Spleißvariante nicht in allen Geweben nachweisen konnte, sind die Ergebnisse vergleichbar mit denen der vorliegenden Arbeit. Auch hier scheint die Spleißvariante in wesentlich geringerem Ausmaß exprimiert zu werden und möglicherweise nur

dann einen klinischen Einfluss zu haben, wenn das Verhältnis der Expressionsniveaus zu Gunsten der Spleißvariante verschoben ist.

Bei Untersuchungen zu KAI1-Mutationen im Ovarialkarzinom konnten Liu und Kollegen abgesehen von einer Missense-Mutation in Codon 241, in keinem der 52 Tumoren eine Mutation im KAI1 Gen nachweisen [Liu *et al.* 2000]. Die Untersuchungen basierten jedoch auf genomischer DNA, sodass das Vorkommen einer Spleißvariante hier auch nicht erfasst werden konnte.

Mooez und Kollegen konnten bei Untersuchungen von Brustkrebspatientinnen eine weitere Spleißvariante des KAI1-Gens nachweisen. Diese enthält einen 274 Basenpaar-langen Teil des Introns zwischen Exon 8 und Exon 9. Dieser Teil enthält ein Stop-Codon sodass es wahrscheinlich ist, dass diese Spleißvariante zu einem abnormalen, funktionslosen Protein führt [Mooez *et al.* 2011].

Ob und in wie weit die in dieser Arbeit behandelte Spleißvariante KAI1-splice ein funktionsfähiges Protein bildet ist noch nicht bekannt. Bereits bei der Erstbeschreibung konnte durch Immunpräzipitation gezeigt werden, dass die Interaktion von KAI1-splice mit Integrin $\alpha 3\beta 1$ schwächer ist, als beim Wildtyp. Auch eine Kolokalisation mit E-Cadherin konnte für die Spleißvariante im Gegensatz zum Wildtyp nicht gefunden werden [Lee *et al.* 2003]. Dies lässt vermuten, dass auch die Interaktion mit weiteren Integrinen, zum Beispiel αv -Integrinen, bei der Spleißvariante gestört ist. Hier sind weitere Studien nötig, welche momentan in unserem Institut (AG Prof. U. Reuning, TUM) durchgeführt werden. Erste Ergebnisse hier scheinen diese Vermutungen auch zu bestätigen.

5.2.2 Prognostischer Einfluss

Die Rolle von KAI1 als Tumorsuppressor wurde besonders umfassend für das Prostatakarzinom beschrieben. Dort reduzierte es die Zahl der Lungenmetastasen, ohne jedoch das Wachstum des Primärtumors zu beeinflussen. Zudem wurden im Gewebe von metastasierten Prostatakrebszellen niedrigere KAI1 Expressionswerte gefunden als in prostatistischem Normalgewebe [Dong *et al.* 1995]. Weitere Studien zeigten, dass eine Herabregulation von KAI1 mit fortgeschrittenen Tumoren, einer schlechten Prognose, einem erhöhten Potential zur Bildung von Metastasen sowie einer gesteigerten Invasivität assoziiert ist [Tonoli *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006; Jackson *et al.* 2007].

Aufgrund der tumorsuppressiven Eigenschaften von KAI1, welche von Dong und Kollegen gezeigt wurden, stellten wir die Hypothese auf, dass eine hohe KAI1-RNA-Konzentration auch für Ovarialkarzinom-Patientinnen einen prognostischen Vorteil darstellt. Hierzu führten wir zuerst Berechnungen von öffentlichen Daten mittels der Kaplan-Meier-Plotter-Software (KM-Plotter) durch [Gyorffy *et al.* 2012]. Dort zeigte sich, dass ein hohes Expressionsniveau von KAI1 einen hoch signifikanten Vorteil sowohl in Bezug auf das Gesamtüberleben (log-rank-p: 0,00014, HR: 0,76) als auch in Bezug auf das rezidivfreie Überleben (log-rank-p: 4,1e-5, HR: 0,74) darstellt. Besonders deutlich war dieser Vorteil bei Betrachtung der homogenen Subgruppe der Patientinnen mit platinhaltiger Therapie und optimalem OP-Ergebnis. Hier zeigte sich der Vorteil auf das Gesamtüberleben sogar mit einer Hazard Ratio von 0,57 (log-rank-p: 5,5e-7) und für das rezidivfreie Überleben mit einer Hazard Ratio von 0,55 (log-rank-p: 1,2e-8). Diese Daten lassen also auf eine starke prognostische Relevanz der KAI1 Expression auch im Ovarialkarzinom schließen.

Um spezifisch die Expression des Wildtyps, im Vergleich zur Spleißvariante zu untersuchen, führten wir ergänzend Berechnungen zur KAI1-wt Expression in Abhängigkeit zum Überleben in unserem Kollektiv durch. Hier konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden. Sowohl Kaplan-Meier Kurven als auch das mediane 3- und 5-Jahres-Überleben zeigen jedoch einen eindeutigen Vorteil für hohe Expressionswerte von KAI1-wt. Der prognostische Effekt war im Kollektiv dieser Arbeit mit einer Hazard Ratio (HR) von 0,50 für das Gesamtüberleben und 0,45 für das rezidivfreie Überleben sogar noch etwas stärker ausgeprägt, als beim KM-Plotter (HR=0,76 für das Gesamtüberleben; HR=0,74 für das rezidivfreie Überleben).

Der noch stärkere Effekt im KM-Plotter nach Bildung einer homogenen Subgruppe konnte in der vorliegenden Arbeit nicht vergleichend berechnet werden, da das Kollektiv hierzu zu klein war. Die fehlende statistische Signifikanz in unserem Kollektiv könnte durch eine zu geringe Fallzahl und/oder die Verteilung der Fälle um den *cut point* bedingt sein. Auch die Bestimmung des *cut points* über die Verwendung der Maximalen Teststatistik durch das Programm „R“ kann die Signifikanz beeinflussen.

Auch andere Autoren konnten einen prognostischen Vorteil für hohe KAI1 Expressionswerte im Ovarialkarzinom zeigen. Schindl und Kollegen fanden bei immunhistochemischen Untersuchungen der KAI1-Expression einen prognostischen Vorteil für mittlere und hohe KAI1-Expressionswerte. Ein signifikanter Unterscheid konnte hier sowohl für das Gesamtüberleben ($p=0,0013$, $HR=0,45$), als auch für das rezidivfreie Überleben ($p=0,0048$, $HR=0,3$) gezeigt werden und ist auch von den Werten sehr gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Das 5-Jahres-Überleben von 60,6% bei Patientinnen mit hohen KAI1-Expression im Vergleich zu 33,7% für Patientinnen mit niedriger KA1-Expression zeigt ebenfalls ähnliche Ergebnisse wie diese Arbeit (5-Jahres-Überleben: 55,6% für hohe und 28,3% für niedrige KAI1 Expression). Das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben lag bei 70,91% für Patientinnen mit hoher KAI1-Expression verglichen mit 54,7% für Patientinnen mit niedriger KA1-Expression und unterscheidet sich somit jedoch deutlich von den Daten dieser Arbeit (5-Jahres-rezidivfreies Überleben: 44,0% für hohe und 16,6% für niedrige KAI1 Expression) [Schindl *et al.* 2001]. Mögliche Ursachen für diese Differenz sind Unterschiede in der chemotherapeutischen Behandlung, der Nachsorge sowie den Strategien zur Erkennung eines Rezidivs.

In einer weiteren Studie von Liu und Kollegen konnte ebenfalls ein negativer Einfluss auf das Überleben für verminderte KAI1-Expressionswerte gezeigt werden. Die Autoren unterteilten die Tumoren nach immunhistochemischer Untersuchung hierfür in drei Kategorien. Die Mortalität stieg von 18.2% bei Patientinnen mit positiver KAI1-Expression zu 42.3% bei verminderter Expression und auf 71.4% bei Patientinnen mit fehlender KAI1-Expression. Jedoch konnte hier ebenfalls keine statistische Signifikanz erreicht werden ($p= 0,079$) [Liu *et al.* 2000].

Auch für viele andere Tumoren ist eine prognostische Relevanz der KAI1-Expression beschrieben. Besonders deutlich wird dies in einem Übersichtsartikel von Tonolli und

Kollegen: Der Verlust von KAI1-RNA bzw. dem Protein ist demnach mit einer schlechten Prognose bei vielen verschiedenen Tumoren wie Prostata-, Mamma-, Kolon-, Lungen- und Pankreaskarzinom assoziiert [Tonoli *et al.* 2005]. Bei Melanompatienten konnte ebenfalls ein signifikant schlechteres 5- und 10-Jahres-Überleben für niedrige KAI1-Expressionswerte gezeigt werden [Tang *et al.* 2014]. Auch für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom bestätigte sich ein schlechteres Gesamtüberleben für Patienten mit erniedrigten KAI1-Expressionsniveaus [Adachi *et al.* 1996]. Für das Pankreaskarzinom hingegen konnte in einer weiteren Studie kein Zusammenhang zwischen der KAI1-Expression und dem Überleben gezeigt werden [Guo *et al.* 1996].

Auch wenn die Funktionsweise von KAI1 noch nicht genau bekannt ist, ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Funktion durch Protein-Interaktionen vermittelt wird, da KAI1 selbst keine intrinsische Aktivität besitzt. Zu den Proteinen, die für die Zellmotilität wichtig sind und somit möglicherweise von KAI1 moduliert werden, um die Zellmigration zu inhibieren, gehören Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine [Liu *et al.* 2006]. Da bereits gezeigt werden konnte, dass KAI1 und Integrine auf der Zelloberfläche kolokalisiert sind, ist ein funktioneller Zusammenhang sehr wahrscheinlich. Bei der Entstehung von Metastasen spielen Integrine vermutlich eine wichtige Rolle [Hapke *et al.* 2003]. Insbesondere αv -Integrine spielen im Ovarialkarzinom eine entscheidende Rolle bei der Tumorinitiation, Progression und Metastasierung [Heyman *et al.* 2008].

Daher schien es interessant zu untersuchen, ob das Expressionsniveau von ITGAV-RNA bereits als eigenständiger prognostischer Marker für das Ovarialkarzinom zu sehen ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden zuerst Berechnungen mit den öffentlich zugänglichen Daten des Kaplan-Meier-Plotters (KM-Plotter) angestellt. Hier zeigte sich ein signifikanter, jedoch schwach ausgeprägter Vorteil für niedrige Expressionswerte von ITGAV, sowohl in Bezug auf das Gesamtüberleben (HR:1,21; $p=0,016$), als auch auf das rezidivfreie Überleben (HR:1,28; $p=0,00063$).

Um diese Ergebnisse weiter einordnen zu können, führten wir die Untersuchungen ebenfalls an unserem Kollektiv durch. Hier konnte kein statistisch signifikanter prognostischer Wert für ITGAV gezeigt werden. Die Kaplan-Meier-Kurven sowie die Überlebensstatistiken zeigen für das Gesamtüberleben sowie das kombinierte

krankheitsfreie Überleben einen leichten Vorteil für hohe ITGAV-Expressionswerte, für das rezidivfreie Überleben hingegen zeigt sich ein Vorteil für niedrige Integrin-Werte. Der prognostische Wert des KM-Plotters für das rezidivfreie Überleben war mit einer Hazard Ratio (HR) von 1,28 ($p=0,00063$) etwa gleich stark ausgeprägt wie im Kollektiv dieser Arbeit (HR:1,25). Für das Gesamtüberleben zeigt sich jedoch ein deutlich unterschiedliches Ergebnis. Während der KM-Plotter einen statistisch signifikanten Vorteil für niedrige ITGAV-Expressionsniveaus zeigt (HR:1,21 $p=0,016$), findet sich im Kollektiv dieser Arbeit, bei fehlender Signifikanz, eher ein Vorteil für hohe Expressionswerte (HR:0,79 $p=0,957$).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Stärke der Expression von Integrin αv RNA keine eindeutige prognostische Aussage bezüglich Gesamtüberleben, rezidivfreiem Überleben oder kombiniertem krankheitsfreiem Überleben getroffen werden kann. Möglicherweise spielt hier nicht das αv -Integrin selbst, sondern die Kombination mit der β -Kette die entscheidende Rolle. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass Integrin $\alpha v\beta 3$ die Tumorprogression fördert [Guo *et al.* 2004]. Demnach wäre zu erwarten gewesen, dass sich eine niedrige Integrin αv Expression positiv auf das Überleben auswirken. Eine neuere Studie hingegen deutet auf eine mögliche Tumorsuppressorfunktion von Integrin αv in Kombination mit der $\beta 3$ -Untereinheit hin [Kaur *et al.* 2009], sodass ausgehend hiervon eine Korrelation zwischen einer hohen ITGAV-Expression und guter Prognose zu erwarten gewesen wäre.

Ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit konnte auch die Forschungsgruppe um Liapis keine statistische Korrelation zwischen der immunhistochemisch bestimmten Integrin $\alpha v\beta 3$ Intensität und dem Patientenüberleben finden. Sie untersuchten ein relativ kleines Kollektiv von 31 Ovarialkarzinomen [Liapis *et al.* 1997]. Möglicherweise ist sowohl hier, als auch bei dieser Arbeit keine statistische Korrelation ersichtlich, weil die untersuchten Patientengruppen viel kleiner sind als beim KM-Plotter. Bei weniger stark ausgeprägten Effekten sind größere Kollektive nötig um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können.

Gao und Kollegen konnten zeigen, dass Tumoren welche schlecht auf Chemotherapie ansprechen, mehr Integrin αv ($p<0,05$) und Integrin $\beta 3$ ($p>0,05$) exprimieren, als Tumoren welche gut auf Chemotherapie ansprechen [Gao *et al.* 2013]. Da das Ansprechen auf die Chemotherapie klinisch ein wichtiger Faktor für die Prognose und das Outcome der Patientinnen ist, würden diese Ergebnisse die

prognostische Wertigkeit von Integrin αv unterstützen. Ob und in wie weit der prognostische Einfluss von Integrin αv auf einer Beeinflussung der Chemo-Resistenz beruht und inwieweit andere Mechanismen beteiligt sind, bleibt jedoch weiter zu klären.

Maubant und Kollegen untersuchten ebenfalls die αv -Integrin-Kette sowie seine assoziierten β -Ketten. Überlebensanalysen lieferten dabei keinen Zusammenhang zwischen einer der Integrin-Ketten und dem Überleben [Maubant *et al.* 2005]. Auch wenn die Überlebensanalysen hier auf Patientinnen beschränkt waren, welche eine Platin-haltige Chemotherapie erhalten haben, waren diese Ergebnisse im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Die Forschungsgruppe um Goldberg konnte zeigen, dass die Expression von Integrin αv mRNA in fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen mit einer schlechten Prognose korreliert. Die Untersuchung von 56 Gewebeproben von 34 Patientinnen lieferte hierbei ein statistisch signifikantes Ergebnis ($p=0,012$) [Goldberg *et al.* 2001].

Kaur und Kollegen zeigten hingegen, dass Patienten mit hoher Expression von Integrin $\beta 3$ ein signifikant besseres Gesamtüberleben (medianes Überleben: 52 vs. 27 Monate, $p=0,021$) sowie krankheitsfreies Überleben ($p=0,05$) haben. Sie schlussfolgerten daher, dass Integrin $\beta 3$ und folglich auch Integrin $\alpha v\beta 3$ als Tumorsuppressor fungieren und ein Marker für weniger aggressive Tumoren und damit günstige Prognose sind [Kaur *et al.* 2009]. Diese Studie unterstützt die These, dass die Kombination mit der β -Kette entscheidend für die prognostische Wertigkeit von ITAGV ist.

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse sowohl in der Literatur als auch in dieser Arbeit, sowie der sehr geringe Effekt im KM-Plotter eher in die Richtung, dass ITGAV kein stabiler prognostischer Marker ist. Zudem scheint es wichtig zu sein, mit welcher β -Kette ITGAV assoziiert ist. Es scheint wahrscheinlich, dass je nach Kombination sowohl ein tumorfördernder als auch ein tumorsuppressiver Einfluss möglich ist.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Expression von ITGAV in Assoziation mit modulierenden Proteinen gesehen werden muss. Die Arbeitsgruppe um Prof. Reuning der TUM konnte in diesem Kontext bereits zeigen, dass KAI1 und Integrin $\alpha v\beta 3$ auf der Zelloberfläche kolokalisiert sind, was die Vermutung nahe legt, dass KAI1 seine Effekte unter anderem über eine Kontrolle der Integrinfunktion ausübt. Eine Erhöhung von KAI1 verstärkte die Integrin $\alpha v\beta 3$ /Vitronektin-abhängige

Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen, was zu einer beeinträchtigten Motilität und Zellmigration führte. Zudem wurde die Zellproliferation verringert, was zusammen mit der geminderten Zellmotilität, zur tumorsupprimierenden Funktion von KAI1 in Ovarialkarzinomen führen könnte [Ruseva *et al.* 2009].

Wie bereits angesprochen, könnte die Ursache für den Verlust der kontrollierenden Funktion von KAI1 auf Integrine, u.a. die vermehrte Expression einer Spleißvariante bzw. eine Deregulation des Gleichgewichtes zwischen der Spleißvariante und KAI1-wt sein. Das Auftreten der Spleißvariante wurde bereits von mehreren Autoren im Zusammenhang mit einer Funktionsbeeinträchtigung von KAI1 diskutiert [Miranti 2009; Tsai *et al.* 2011]. Da bei der Spleißvariante ein Teil der großen extrazellulären Schleife fehlt, ist es wahrscheinlich, dass durch die Strukturveränderungen eine Kolokalisation mit Integrinen erschwert und die Funktion von KAI1 daher behindert ist. Durch Immunpräzipitation konnte weiter gezeigt werden, dass KAI1-splice weniger stark mit Integrin $\alpha3\beta1$ interagiert und nicht mehr mit E-Cadherin kolokalisiert ist [Lee *et al.* 2003]. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die Kolokalisation mit anderen Integrinketten gestört ist.

Bereits bei der Erstbeschreibung von KAI1-splice wurde ein möglicher prognostischer Wert der Spleißvariante angenommen, da sie in Geweben von Magenkarzinom-Patienten mit schlechter Prognose gefunden wurde. Es fiel auf, dass Patienten mit metastasiertem Magenkarzinom, welche die Spleißvariante exprimierten, nach der Operation ein signifikant kürzeres Überleben zeigten (7.0 Monate versus 30.8 Monate, $p < 0,001$). Ähnliches konnte auch für Patienten mit regionalen Lymphknotenmetastasen gezeigt werden [Lee *et al.* 2003].

In unseren Untersuchungen zeigten die Kaplan-Meier-Kurven und das Hazard Ratio einen prognostischen Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte für alle drei Endpunkte. Auch die Werte für das 3- und 5-Jahres-Überleben stützen dies. Jedoch konnte für das Gesamtkollektiv kein signifikantes Ergebnis in Bezug auf die prognostische Relevanz der Spleißvariante gezeigt werden. Dies könnte durch die niedrige Fallzahl und/oder der Verteilung der Fälle um den *cut point* begründet sein.

Um ein homogeneres Patientenkollektiv zu erhalten, wurde eine Subgruppe mit Patientinnen ohne Fernmetastasen gebildet, alle im FIGO-Stadium III. Für dieses Kollektiv konnte für die Betrachtung des rezidivfreien Überlebens ($p = 0,040$, HR=

3,06) sowie des kombinierten krankheitsfreien Überlebens ($p=0,039$, $HR=2,76$) ein signifikanter Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte gezeigt werden.

Geht man davon aus, dass die verstärkte Expression der Spleißvariante, bzw. ein Verschieben des Verhältnisses zum Wildtyp zugunsten der Spleißvariante, zu einer Funktionseinschränkung des Wildtyps und damit zu einer gesteigerten Aggressivität und Invasivität des Tumors führt, sind diese Ergebnisse durchaus erwartungsgemäß. Gerade bei Patientinnen, welche noch keine Fernmetastasen haben (M0), scheint die Spleißvariante des KAI1-Gens von prognostischer Bedeutung zu sein. Hier konnte das Patientinnenkollektiv in Subgruppen mit besserer (KAI1-splice niedrig) und schlechterer (KAI1-splice hoch) Prognose eingeteilt werden gemäß einer größeren Bereitschaft zur (Fern)metastasierung bei hoher KAI1-splice-Expression. Im Patientinnenkollektiv M1 (FIGO-Stadium IV) hingegen könnte dies eine untergeordnete Rolle spielen, weil eine Fernmetastasierung bereits erfolgt ist und alle Patientinnen mit besonders schlechter Prognose behaftet sind.

Jackson und Kollegen untersuchten den Einfluss der KAI1 Spleißvariante auf die Entstehung von Metastasen im Blasenkarzinom und konnten hierbei keinen signifikanten prognostischen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben zeigen. Tendenziell war das Outcome jedoch für solche Tumoren besser, welche die Spleißvariante exprimierten [Jackson *et al.* 2007]. Hier ist jedoch zu beachten, dass das untersuchte Kollektiv mit 20 Tumoren sehr klein war und deshalb hieraus keine eindeutige Schlussfolgerung gezogen werden kann.

Lee und Kollegen konnten bei der Entdeckung der Spleißvariante im Magenkarzinom bereits den strukturellen Aufbau klären, sowie einen funktionellen Unterschied zum Wildtyp zeigen. Sie fanden bei Versuchen *in vivo* eine verstärkte Tumorgenität der KAI1-splice exprimierenden Zellen sowie *in vitro* ein gesteigertes invasives Potential [Lee *et al.* 2003]. Eine prognostische Relevanz für das Magenkarzinom wurde bereits vermutet, da die Spleißvariante vor allem bei Patienten mit schlechter Prognose gefunden wurde und diese ein signifikant kürzeres Überleben zeigten.

Welche Bedeutung und prognostische Relevanz die Spleißvariante für das Ovarialkarzinom hat, war bislang noch nicht bekannt. Wir konnten mit unserer Untersuchung zeigen, dass insbesondere in der Untergruppe der Patientinnen im FIGO-Stadium III ein signifikanter Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte besteht, sowohl in Bezug auf das rezidivfreie Überleben, als auch in Bezug auf das kombinierte krankheitsfreie Überleben.

5.2.3 Expression von KAI1, KAI1-splice und ITGAV in Metastasen

Für die vorliegende Arbeit standen sieben Metastasen aus dem Omentum majus und dem Uterus zur Verfügung. Aus diesen Geweben wurde ebenfalls das Expressionsniveau von KAI1, KAI1-splice und ITGAV bestimmt und mit dem Expressionsniveau der Primärtumorgewebe verglichen.

Im Gewebe von Metastasen konnte signifikant mehr Integrin α_v Expression nachgewiesen werden als im Gewebe von Primärtumoren ($p=0,017$). Mit einem Median von 1,26 für die relative ITGAV Expression der Metastasen exprimierten diese Zellen circa die zweifache Menge ITGAV im Vergleich zu Zellen aus Primärtumoren (mediane relative ITGAV Expression: 0,65). Möglicherweise exprimieren Metastasen mehr von dem Adhäsionsmolekül Integrin α_v , damit es den Zellen möglich ist, sich nach Ablösung vom Primärtumor an neuen Stellen zu implantieren. Es ist bekannt, dass zur Entstehung von Metastasen eine feine Regulation der adhäsiven Zellkontakte nötig ist und Integrine in diesem Prozess beteiligt sind [Hapke *et al.* 2003]. Eine Veränderung der Integrinexpression während der Tumorprogression und damit zwischen Primärtumoren und Metastasen ist also durchaus erwartungsgemäß.

Die Forschungsgruppe um Goldberg hingegen konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Integrin α_v Expression zwischen Primärtumoren und Metastasen feststellen. Tendenziell zeigten jedoch Primärtumoren eine stärkere α_v -Intensität [Goldberg *et al.* 2001].

Liapis und Kollegen untersuchten die Expression von Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Ovarialkarzinomen im Vergleich zu ovariellen Tumoren mit niedriger maligner Potenz. Sie konnten dabei zeigen, dass in Ovarialkarzinomen signifikant mehr Integrin $\alpha_v\beta_3$ exprimiert wird ($p=0,009$) [Liapis *et al.* 1997]. Dies deutet auf eine Zunahme der ITGAV-Expression bei zunehmender Tumorprogression hin, welche wiederum gut mit der in dieser Arbeit festgestellten Integrin-Erhöhung in Metastasen korreliert.

Folgt man der Hypothese, dass die Funktion von Integrin α_v durch KAI1 reguliert wird, könnte dies bedeuten, dass KAI1 bei normaler Expression von ITGAV, zumindest in Assoziation mit bestimmten β -Ketten die Zelladhäsion verstärkt und

somit die Zellmotilität vermindert. Ist ITGAV überexprimiert, könnte die Funktion von KAI1 nicht mehr ausreichend sein, um die Zellmigration zu unterdrücken.

Beim Vergleich der KAI1-wt Expression zwischen Primärtumoren und Metastasen konnte kein Unterschied gefunden werden. Folgt man der Annahme, dass KAI1 die Bildung von Metastasen unterdrückt und ein Verlust von KAI1 folglich die Metastasierung fördert, würde man in Metastasen geringere Expressionswerte für KAI1 erwarten als in Primärtumoren.

Diese Ergebnisse decken sich dennoch mit den Ergebnissen von Houle und Kollegen. Sie fanden bei der immunhistochemischen Untersuchung der intrazellulären KAI1-Protein-Konzentration keinen signifikanten Unterschied zwischen Primärtumoren und Metastasen. Allerdings konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,002$) der membrangebundenen KAI1-Protein-Konzentration zwischen Metastasen und „Grad-1-Tumoren“ gefunden werden. Die Grad-Einteilung erfolgte hierbei nach histologischen Kriterien in drei Grade [Houle *et al.* 2002]. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass sich bei der Entstehung von Metastasen nicht die absolute Menge an produziertem KAI1 ändert, sondern das Verteilungsmuster zwischen Zellmembran und Zellinnerem.

Wie bereits angesprochen, könnte zudem eine Veränderung der Relation der Expression von KAI1 und seiner Spleißvariante eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielen. Bereits bei der Erstbeschreibung von KAI1-splice war aufgefallen, dass die Spleißvariante zwar im Gewebe von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden konnte, nicht aber in der angrenzenden, normalen Mukosa [Lee *et al.* 2003]. Es ist interessant, dass beim Vergleich der KAI1-splice Expression zwischen Primärtumoren und Ovarialkarzinom-Metastasen in unserem Kollektiv eine signifikant höhere Expression in den Metastasen gezeigt werden konnte ($p=0,034$). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Veränderung der KAI1-splice Expression eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Metastasen spielt. Es ist wahrscheinlich, dass Zellen, welche vermehrt die Spleißvariante von KAI1 exprimieren, veränderte Adhäsionseigenschaften zeigen, weil KAI1 die integrinabhängige Adhäsion reguliert und die Spleißvariante die Zellmigrations-unterdrückende Aktivität im Vergleich zum Wildtyp nicht mehr aufweist [Liu *et al.* 2006]. Durch den Wegfall der Metastasen-unterdrückenden Funktion könnten sich diese Zellen vom Primärtumor lösen und sich an neuer Stelle als Metastase implantieren.

5.2.4 Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Merkmalen

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von KAI1-wt und klinisch-pathologischen Merkmalen (Alter, Nodalstatus, Fernmetastasen, Operationsergebnis, FIGO-Stadium, Chemotherapie und pathologischer Subtyp) gezeigt werden. Lediglich beim Alter konnte ein beinahe signifikanter Wert gezeigt werden, sodass hier weitere Untersuchungen an einem Kollektiv mit höherer Fallzahl nötig wären, um eine genaue Aussage treffen zu können.

Wie auch in dieser Arbeit, konnten Liu und Kollegen, ebenfalls keine Assoziation zwischen dem Tumorstadium des Ovarialkarzinoms und der KAI1 Expression finden, weder auf RNA- noch auf Proteinebene [Liu *et al.* 2000]. Schindl und Kollegen fanden bei immunhistochemischen Untersuchungen eine signifikant niedrigere KAI1-Intensität im serösen Ovarialkarzinom verglichen mit anderen Subtypen ($p=0,007$). Im verwendeten Kollektiv waren hierbei wesentlich mehr nicht-seröse Ovarialkarzinome als im Kollektiv dieser Arbeit, was erklären könnte, warum dieser Unterschied in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Weitere Korrelationen zwischen der KAI1-Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen konnten auch hier nicht gefunden werden [Schindl *et al.* 2001].

Houle und Kollegen hingegen berichteten für das Ovarialkarzinom einen Zusammenhang zwischen dem Tumorgrad und der KAI1-Expression (Grad 1 vs Grad 3, $p=0,035$) und zudem eine Assoziation zur Lokalisation des KAI1-Proteins. Bei „low-grade“ Tumoren fanden sich hohe KAI1-Protein-Konzentrationen vor allem auf der Zellmembran, während bei „high-grade“ Tumoren höhere Konzentrationen intrazellulär festgestellt wurden [Houle *et al.* 2002].

Auch für die Spleißvariante des KAI1-Gens konnte kein Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Merkmalen gezeigt werden. Ausgehend von der Hypothese, dass eine verstärkte Expression der Spleißvariante zum Funktionsverlust von KAI1 und somit zu Metastasierung führt, hätte man in Karzinomen von Patientinnen mit Fernmetastasen im Vergleich zu nicht-fernmetastasierten Karzinomen eventuell höhere KAI1-splice Expressionswerte des Primärtumors erwartet. Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden. Unterschiede hätte sich möglicherweise in den Peritonealmetastasen gezeigt, deren Zahl für eine eingehende Analyse jedoch zu klein war.

Jackson und Kollegen konnten für das Blasenkarzinom ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Expression von KAI1-splice und klinisch-pathologischen Merkmalen (Invasionstiefe, Grading, Lymphknotenstatus und Rezidiv) finden [Jackson *et al.* 2007].

Auch die Expression von ITGAV korrelierte mit keinem der untersuchten klinischen oder pathologischen Merkmale.

Maubant und Kollegen fanden für die αv -Kette ebenfalls keine Korrelation mit klinischen Parametern. Sie konnten jedoch zeigen, dass die Expression der $\beta 3$ -Kette in histologisch gut differenzierte Ovarialtumoren (Grad 1 und 2) signifikant höher ist als in schlecht differenzierten Grad 3 Tumoren [Maubant *et al.* 2005]

Die Ergebnisse dieser Arbeit korrelieren ebenfalls gut mit den Ergebnissen von Liapis und Kollegen. Sie konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Integrin $\alpha v \beta 3$ Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen finden. Untersucht wurden hier das histologische Grading sowie das Tumorstadium [Liapis *et al.* 1997].

Für das Integrin $\alpha v \beta 6$ hingegen konnte eine Korrelation von Expression und Tumorgrad gezeigt werden. Grad 3 Tumoren zeigten in der immunhistochemischen Färbung hierbei die höchste Integrin $\alpha v \beta 6$ -Intensität [Ahmed *et al.* 2002].

5.3 Ausblick

Eine genaue Kenntnis über die zu erwartende Prognose ist nicht nur für Tumorpatienten selbst, sondern auch für die Auswahl der richtigen Therapie sehr wichtig. Aggressivere Tumoren verlangen in der Regel eine aggressivere Therapie. Die Expressionsmengen von KAI1 und seiner Spleißvariante können, zumindest in bestimmten Kollektiven, einen Beitrag zur Prognoseabschätzung leisten.

Da KAI1 ein Metastasensuppressorgen ist, könnte eine (Wieder-)Hochregulation die Bildung von Metastasen unterdrücken oder sogar verhindern. Möglich wäre beispielsweise, die KAI1-Expression im Rahmen einer Gentherapie durch Vektoren zu erhöhen. Im Tiermodell konnten Lungenmetastasen nach einer solchen Therapie bereits erfolgreich unterdrückt werden [Takeda *et al.* 2007]. Ein derartiges Vorgehen ist im klinischen Einsatz am Menschen jedoch noch nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit wäre es, Substanzen zu finden, welche KAI1 hochregulieren oder seine Funktion imitieren. Es sind bereits mehrere Faktoren beschrieben, welche eine Verstärkung der KAI1-Expression bewirken sollen. Hierzu zählen einige Zytokine, Wachstumsfaktoren, Phorbolster und 8-bromo-cAMP, aber auch Medikamente wie Genistein (ein Phytoöstrogen) und Etoposid [Miranti 2009].

Für Integrin $\alpha v \beta 3$ sind bereits verschiedene Inhibitoren in Entwicklung, in der Annahme, dass Integrin $\alpha v \beta 3$ die Tumorprogression fördert. Kaur und Kollegen bewerten dies jedoch kritisch, weil sie in ihrer Studie zeigten, dass Integrin $\alpha v \beta 3$ die Tumorprogression verlangsamt [Kaur *et al.* 2009]. Dieses Beispiel verdeutlicht wie wichtig es ist, die genauen Mechanismen und Funktionen von Proteinen zu kennen bevor neue Therapieansätze entwickelt werden können. Es sind deshalb weitere Studien nötig um die Rolle von KAI1, seiner Spleißvariante und seinen Interaktionspartnern besser zu verstehen.

6. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist der sechsthäufigste Tumor der Frau. Da es häufig erst in späten Stadien erkannt wird, ist das relative 5-Jahres-Überleben, beispielsweise im Vergleich zum Brustkrebs, sehr ungünstig. Das Vorhandensein von Metastasen schließt in den meisten Fällen eine vollständige Entfernung des Tumors und damit eine Heilung aus. Die Hemmung von Metastasierungsprozessen ist daher Gegenstand intensiver klinischer Forschung.

KAI1 ist als Metastasierungssuppressor bei vielen Tumorentitäten beschrieben und seine Herabregulation ist mit fortgeschrittenem Tumorstadium, erhöhtem Metastasierungspotential, einer gesteigerten Invasivität und damit einer schlechten Prognose assoziiert. Sehr wahrscheinlich kommt die Metastasen-supprimierende Funktion von KAI1 u.a. auch über eine Wechselwirkung mit Integrinen zustande. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von mechanischen Verbindungen und sind daher vermutlich bei der Entstehung von Metastasen beteiligt. Tatsächlich konnten bisher Interaktionen zwischen KAI1 und verschiedenen Integrinen nachgewiesen werden. Interessanterweise interagiert beim Magenkarzinom eine Spleißvariante von KAI1 (KAI1-splice), bei welcher Exon 7 fehlt, weniger stark als der Wildtyp mit Integrin $\alpha 3\beta 1$. Funktionelle Untersuchungen führten daraufhin zu der Annahme, dass durch die veränderte Proteinstruktur der KAI1-splice-Isoform die regulierende Funktion gegenüber Integrinen und damit die Metastasen-supprimierende Funktion von KAI1 verloren geht. Es wird vermutet, dass dies ebenso für die Interaktion von KAI1-splice mit wichtigen Integrinen im Ovarialkarzinom, wie z.B. $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$, gilt.

Die vorliegende Arbeit ging deshalb der Frage nach, ob veränderte Transkriptmengen von KAI1-Wildtyp bzw. KAI1-splice und Integrin αv (ITGAV) im Ovarialkarzinom vorliegen, was zu einem möglichen Ungleichgewicht der Interaktionspartner führen könnte. Dazu wurden mRNA-Expressionsanalysen an Ovarialkarzinomgeweben der Frauenklinik, TUM, durchgeführt, als auch öffentliche Daten herangezogen. Nach relativer Quantifizierung wurden diese Daten mit klinischen Parametern in Verbindung gebracht und statistisch ausgewertet.

Ausgehend von öffentlichen Datensätzen zeigte sich, dass hohe KAI1-Wildtyp-Expressionswerte im Ovarialkarzinom mit einem prognostischen Vorteil einhergehen. Dieser Effekt war besonders in der homogenen Subgruppe der optimal operierten

und Platin-behandelten Ovarialkarzinompatientinnen deutlich und stellte sich sowohl als signifikant längeres Gesamtüberleben ($p=0,00000055$, $HR=0,57$), als auch rezidivfreies Überleben ($p=0,00000012$, $HR=0,55$) dar. In Untersuchungen an 100 eigenen Primärtumoren und sieben Peritonealmetastasen war dies ebenfalls als Trend in den Kaplan-Meier-Kurven und Überlebenstabellen ersichtlich.

Die Spleißvariante von KAI1, welche nicht anhand öffentlicher Daten ausgewertet werden kann, konnte bei unseren Untersuchungen in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein signifikanter Vorteil in der Untergruppe der Patientinnen im FIGO-Stadium III für niedrige KAI1-splice Expressionswerte, sowohl in Bezug auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,040$, $HR=0,33$), als auch in Bezug auf das kombinierte krankheitsfreie Überleben ($p=0,039$, $HR=0,36$). In Metastasen konnte zudem eine signifikant höhere durchschnittliche Expression der Spleißvariante nachgewiesen werden als in Primärtumoren ($p=0,034$).

Es sind jedoch weitere Studien und intensive Forschung nötig, um die Funktion von KAI1 und Integrin $\alpha\beta3$ sowie die Rolle der Spleißvariante besser zu verstehen, damit in Zukunft die Prognose von Ovarialkarzinompatientinnen besser abgeschätzt werden kann und eventuell neue Therapieansätze entwickelt werden können.

7. Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

Adachi, M., Taki, T., Ieki, Y., Huang, C. L., Higashiyama, M., Miyake, M. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer research* 56 (1996) 1751-1755

Ahmed, N., Riley, C., Rice, G. E., Quinn, M. A., Baker, M. S. Alpha(v)beta(6) integrin-A marker for the malignant potential of epithelial ovarian cancer. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50 (2002) 1371-1380

Aunoble, B., Sanches, R., Didier, E., Bignon, Y. J. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *International journal of oncology* 16 (2000) 567-576

Biosystems, A. "Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR" 2008,

Biosystems, A. Getting Started Guide In: "Introduction to Gene Expression" (Hrsg.) Life Technologies Corporation, 2010,

Biosystems, A. "TaqMan® Gene Expression Assays Protocol" 2010,

Black, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry* 72 (2003) 291-336

Bristow, R. E., Tomacruz, R. S., Armstrong, D. K., Trimble, E. L., Montz, F. J. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (2002) 1248-1259

Chuaqui, R. F., Cole, K. A., Emmert-Buck, M. R., Merino, M. J. Histopathology and molecular biology of ovarian epithelial tumors. *Annals of diagnostic pathology* 2 (1998) 195-207

Dahiya, N., Morin, P. J. MicroRNAs in ovarian carcinomas. *Endocrine-related cancer* 17 (2010) F77-89

Damania, D., Roy, H. K., Kunte, D., Hurteau, J. A., Subramanian, H., Cherkezyan, L., Krosnjak, N., Shah, M., Backman, V. Insights into the field carcinogenesis of ovarian cancer based on the nanocytology of endocervical and endometrial epithelial cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* (2013)

de Kok, J. B., Roelofs, R. W., Giesendorf, B. A., Pennings, J. L., Waas, E. T., Feuth, T., Swinkels, D. W., Span, P. N. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85 (2005) 154-159

Dong, J. T., Lamb, P. W., Rinker-Schaeffer, C. W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J. T., Barrett, J. C. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 268 (1995) 884-886

Engel, J., Hölscher, G., Schubert-Fritschle, G. Epidemiologie In: "Manual Maligne Ovarialtumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge" (Hrsg.) Zuckschwerdt Verlag, 2007,

Fathalla, M. F. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2 (1971) 163

Faustino, N. A., Cooper, T. A. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & development* 17 (2003) 419-437

Felding-Habermann, B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clinical & experimental metastasis* 20 (2003) 203-213

Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J., Pfaffl, M. W. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology letters* 28 (2006) 1601-1613

Gao, J., Hu, Z., Liu, D., Liu, J., Liu, C., Hou, R., Gao, S., Zhang, D., Zhang, S., Lin, B. Expression of Lewis y antigen and integrin alpha v, beta3 in ovarian cancer and their relationship with chemotherapeutic drug resistance. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 32 (2013) 36

GEKID "Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends" Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, 2012, 8. Ausgabe,

Goldberg, I., Davidson, B., Reich, R., Gotlieb, W. H., Ben-Baruch, G., Bryne, M., Berner, A., Nesland, J. M., Kopolovic, J. Alpha v integrin expression is a novel marker of poor prognosis in advanced-stage ovarian carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7 (2001) 4073-4079

Guo, W., Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (2004) 816-826

Guo, X., Friess, H., Graber, H. U., Kashiwagi, M., Zimmermann, A., Korc, M., Buchler, M. W. KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer research* 56 (1996) 4876-4880

Gyorffy, B., Lanczky, A., Szallasi, Z. Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocrine-related cancer* 19 (2012) 197-208

Hapke, S., Kessler, H., Arroyo de Prada, N., Benge, A., Schmitt, M., Lengyel, E., Reuning, U. Integrin alpha(v)beta(3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 276 (2001) 26340-26348

Hapke, S., Kessler, H., Lubber, B., Bengel, A., Hutzler, P., Hofler, H., Schmitt, M., Reuning, U. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin $\alpha(v)\beta3$ /Vitronectin interaction. *Biological chemistry* 384 (2003) 1073-1083

Havens, M. A., Duelli, D. M., Hastings, M. L. Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 4 (2013) 247-266

Heyman, L., Kellouche, S., Fernandes, J., Dutoit, S., Poulain, L., Carreiras, F. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 29 (2008) 231-244

Hogdall, E. V., Christensen, L., Hogdall, C. K., Frederiksen, K., Gayther, S., Blaakaer, J., Jacobs, I. J., Kjaer, S. K. Distribution of p53 expression in tissue from 774 Danish ovarian tumour patients and its prognostic significance in ovarian carcinomas. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 116 (2008) 400-409

Hogdall, E. V., Christensen, L., Kjaer, S. K., Blaakaer, J., Bock, J. E., Glud, E., Norgaard-Pedersen, B., Hogdall, C. K. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study. *Cancer* 98 (2003) 66-73

Holschneider, C. H., Berek, J. S. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Seminars in surgical oncology* 19 (2000) 3-10

Holzapfel, B., Wickert, L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit* 37 (2007)

Houle, C. D., Ding, X. Y., Foley, J. F., Afshari, C. A., Barrett, J. C., Davis, B. J. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecologic oncology* 86 (2002) 69-78

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity* 6 (2005) 279-284

Jackson, P., Marreiros, A., Russell, P. J. KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37 (2005) 530-534

Jackson, P., Puisieux, A. Is the KAI1 metastasis suppressor gene a cellular target of p53? A review of current evidence. *Biochemical and biophysical research communications* 278 (2000) 499-502

Jackson, P., Rowe, A., Grimm, M. O. An alternatively spliced KAI1 mRNA is expressed at low levels in human bladder cancers and bladder cancer cell lines and is not associated with invasive behaviour. *Oncology reports* 18 (2007) 1357-1363

Jacob, F., Guertler, R., Naim, S., Nixdorf, S., Fedier, A., Hacker, N. F., Heinzelmann-Schwarz, V. Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS one* 8 (2013) e59180

Jacobs, I. J., Menon, U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Molecular & Cellular Proteomics* 3 (2004) 355-366

Kaur, S., Kenny, H. A., Jagadeeswaran, S., Zillhardt, M. R., Montag, A. G., Kistner, E., Yamada, S. D., Mitra, A. K., Lengyel, E. β 3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. *The American journal of pathology* 175 (2009) 2184-2196

Knudson, A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (1971) 820-823

Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Allo, M., Dujardin, G., Petrillo, E., Munoz, M. J. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (2013) 153-165

Kurman, R. J., Shih Ie, M. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 27 (2008) 151-160

Kurman, R. J., Shih Ie, M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Human pathology* 42 (2011) 918-931

Kuschel, B., Hauenstein, E., Kiechle, M., Meindl, A. Hereditary breast and ovarian cancer - Current clinical guidelines in Germany. *Breast Care* 1 (2006) 8-14

Lebel-Binay, S., Lagaudriere, C., Fradelizi, D., Conjeaud, H. CD82, member of the tetra-span-transmembrane protein family, is a costimulatory protein for T cell activation. *Journal of immunology* 155 (1995) 101-110

Lee, J. H., Park, S. R., Chay, K. O., Seo, Y. W., Kook, H., Ahn, K. Y., Kim, Y. J., Kim, K. K. KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN), a member of the tetraspanin family, interacts with KAI1, a tumor metastasis suppressor, and enhances metastasis of cancer. *Cancer research* 64 (2004) 4235-4243

Lee, J. H., Seo, Y. W., Park, S. R., Kim, Y. J., Kim, K. K. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer research* 63 (2003) 7247-7255

Lengyel, E. Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of pathology* 177 (2010) 1053-1064

Li, Y. L., Ye, F., Hu, Y., Lu, W. G., Xie, X. Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 394 (2009) 110-116

Liapis, H., Adler, L. M., Wick, M. R., Rader, J. S. Expression of alpha(v)beta3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Human pathology* 28 (1997) 443-449

Liu, F. S., Dong, J. T., Chen, J. T., Hsieh, Y. T., Ho, E. S., Hung, M. J. Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology* 78 (2000) 10-15

Liu, W. M., Zhang, X. A. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer letters* 240 (2006) 183-194

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25 (2001) 402-408

Marshall, C. J. Tumor suppressor genes. *Cell* 64 (1991) 313-326

Martinez, N. M., Lynch, K. W. Control of alternative splicing in immune responses: many regulators, many predictions, much still to learn. *Immunological reviews* 253 (2013) 216-236

Matias-Guiu, X., Prat, J. Molecular pathology of ovarian carcinomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 433 (1998) 103-111

Maubant, S., Cruet-Hennequart, S., Dutoit, S., Denoux, Y., Crouet, H., Henry-Amar, M., Gauduchon, P. Expression of alpha V-associated integrin beta subunits in epithelial ovarian cancer and its relation to prognosis in patients treated with platinum-based regimens. *Journal of molecular histology* 36 (2005) 119-129

Miranti, C. K. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cellular signalling* 21 (2009) 196-211

Mooez, S., Malik, F. A., Kayani, M. A., Rashid, R., Zahid, A., Khan, A. Expressional alterations and transcript isoforms of metastasis suppressor genes (KAI1 and KiSS1) in breast cancer patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 12 (2011) 2785-2791

Ohl, F., Jung, M., Xu, C., Stephan, C., Rabien, A., Burkhardt, M., Nitsche, A., Kristiansen, G., Loening, S. A., Radonic, A., Jung, K. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *Journal of molecular medicine* 83 (2005) 1014-1024

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29 (2001) e45

Pfaffl, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum* 10 (2004)

Ponder, B. A. Cancer genetics. *Nature* 411 (2001) 336-341

Rassow, J. "Duale Reihe Biochemie" Thieme, 2008,

Reuning, U. Integrin alphavbeta3 promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors. *Journal of cellular biochemistry* 112 (2011) 1909-1919

Ruseva, Z., Geiger, P. X., Hutzler, P., Kotzsch, M., Lubber, B., Schmitt, M., Gross, E., Reuning, U. Tumor suppressor KAI1 affects integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. *Experimental cell research* 315 (2009) 1759-1771

Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., Funke-Kaiser, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *Journal of molecular medicine* 84 (2006) 901-910

Schelling, M., Anthuber, C., Burges, A., Grischke, E. M., Reif, J., Stieber, P., Strauss, A. Früherkennung und Diagnostik In: "Manual Maligne Ovarialtumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge" (Hrsg.) Zuckschwerdt Verlag, 2007,

Schindl, M., Birner, P., Breiteneker, G., Oberhuber, G. Downregulation of KAI1 metastasis suppressor protein is associated with a dismal prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 83 (2001) 244-248

Schmalfeldt, B. "Manual Maligne Ovarialtumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge" Zuckschwerdt Verlag, 2007,

Schmalfeldt, B., Burges, A., Diebold, J., Harbeck, N. Prognostische und Prädiktive Faktoren In: "Manual Maligne Ovarialtumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge" (Hrsg.) Zuckschwerdt Verlag, 2007,

Shih le, M., Kurman, R. J. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American journal of pathology* 164 (2004) 1511-1518

Stauber, T. W. M. "Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe" Thieme, 2007,

Takeda, T., Hattori, N., Tokuhara, T., Nishimura, Y., Yokoyama, M., Miyake, M. Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer research* 67 (2007) 1744-1749

Tang, Y., Cheng, Y., Martinka, M., Ong, C. J., Li, G. Prognostic significance of KAI1/CD82 in human melanoma and its role in cell migration and invasion through the regulation of ING4. *Carcinogenesis* 35 (2014) 86-95

Tonoli, H., Barrett, J. C. CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends in molecular medicine* 11 (2005) 563-570

Towe, S., Kleineidam, K., Schloter, M. Differences in amplification efficiency of standard curves in quantitative real-time PCR assays and consequences for gene

quantification in environmental samples. Journal of microbiological methods 82 (2010) 338-341

Tsai, Y. C., Weissman, A. M. Dissecting the diverse functions of the metastasis suppressor CD82/KAI1. FEBS letters 585 (2011) 3166-3173

Wong, M. L., Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques 39 (2005) 75-85

Zhang, X. A., Lane, W. S., Charrin, S., Rubinstein, E., Liu, L. EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. Cancer research 63 (2003) 2665-2674

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur von KAI1, Modifiziert nach [Tsai <i>et al.</i> 2011].....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Spleißens, modifiziert nach [Kornblihtt <i>et al.</i> 2013].....	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Veränderung des Genprodukts von KAI1 durch die Spleißvariante, modifiziert nach [Lee <i>et al.</i> 2003]. Im rot markierten Bereich („Verlustregion“) befinden sich die Aminosäuren, die durch das Fehlen von Exon 7 wegfallen.	16
Abbildung 4: Workflow	25
Abbildung 5: Bild der Gelelektrophorese. 1. Spalte: Längenmarker; 2. Spalte: RNA des Gewebes S1; 3. Spalte: RNA des Gewebes S2; 4. Spalte: RNA des Gewebes S3; 5. Spalte: RNA des Gewebes S4; 6. Spalte: RNA des Gewebes S5.....	28
Abbildung 6: Funktionsweise der TaqMan Sonden aus „Abi Prism 7000 Sequence Detection System User Guide“ S.A-2.....	36
Abbildung 7: Amplifikations Plot für den ersten Lauf des KAI1 Wildtyp Gens: Die verschiedenen Farben entsprechen den verschiedenen Proben. Die grüne horizontale Linie markiert den Ct. im linken unteren Bildrand ist das Hintergrundrauschen erkennbar. Die türkise Linie entspricht der Leerprobe und erreicht entsprechend den Schwellenwert nicht.	37
Abbildung 8: Verdünnungsstufen der Ct-Werte für das ITGAV-Gen in einer logarithmischen Funktion	40
Abbildung 9: Mittels des KM-Plotters erstellte Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (links) und das rezidivfreie Überleben (rechts) in Abhängigkeit der KAI1-Expression. Dargestellt ist die Subgruppe „platinhaltige Chemotherapie und optimales OP-Ergebnis“ (Gesamtüberleben: n=690, rezidivfreies Überleben: n=590). Hohe Expressionslevel sind rot und niedrige Expressionslevel sind schwarz dargestellt. Für das Gesamtüberleben ist der p-Wert des Log-Rank-Test 5,5e-7 und die Hazard Ratio: 0,57 (0,45-0,71) und für das rezidivfreie Überleben beträgt der p-Wert des Log-Rank-Test 1,2e-8 und die Hazard Ratio: 0,55 (0,44-0,68).....	42
Abbildung 10: Gelelektrophorese nach PCR aus Gewebe M8. 1. Spalte: Vorwärtsprimer KAI1-splice + Rückwärtsprimer für das kurze PCR-Produkt; Spalte 2: Vorwärtsprimer KAI1-splice + Rückwärtsprimer für das lange PCR-Produkt; Spalte 3: Vorwärtsprimer KAI1-wt + Rückwärtsprimer für das kurze	

PCR-Produkt; Spalte 4: Vorwärtsprimer KAI1-wt + Rückwärtsprimer für das lange PCR-Produkt; Spalte 5: Vorwärtsprimer KAI1-wt + Rückwärtsprimer für das kurze PCR-Produkt in Leerprobe mit Wasser; Spalte 6: Vorwärtsprimer KAI1-wt + Rückwärtsprimer für das lange PCR-Produkt in Leerprobe mit Wasser.	45
Abbildung 11: Amplifikationsplot für KAI1-wt zur Bewertung der Rückwärtsprimer. Die Proben mit dem Primer RW1 (rot und grün) erreichen den CT ca. einen Zyklus früher als die Proben mit dem Primer RW2 (blau und lila).	46
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben nach Expression von KAI1-wt bei einem <i>cut point</i> von 1,02. 14 Proben sind > 1,02 (9 Ereignisse) und 86 Proben sind <= 1,02 (77 Ereignisse). Der p-Wert der maximalen Teststatistik beträgt 0,116 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für hohe KAI1-wt Expressionswerte zu erkennen.	51
Abbildung 13: Expression von KAI1-Wildtyp in Primärtumoren und in Metastasengewebe.	53
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben nach Expression von KAI1-splice bei einem <i>cut point</i> von 0,06. 86 Proben sind > 0,06 (75 Ereignisse) und 14 Proben sind <= 0,06 (11 Ereignisse). Der p-Wert der maximalen Teststatistik beträgt 0,389 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte zu erkennen.	55
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben nach Expression von KAI1-splice für das Subkollektiv der nicht-fernmastasierten Patientinnen bei einem <i>cut point</i> von 0,06. 51 Proben sind > 0,06 (46 Ereignisse) und 9 Proben sind <= 0,06 (6 Ereignisse). Der p-Wert der maximalen Teststatistik beträgt 0,039 und ist somit signifikant. Es besteht ein Vorteil für niedrige KAI1-splice Expressionswerte.....	57
Abbildung 16: Expression von KAI1-splice in Primärtumoren und in Metastasengewebe.	59
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für das kombinierte krankheitsfreie Überleben nach Expression von ITGAV bei einem <i>cut point</i> von 1,01. 22 Proben sind > 1,01 (17 Ereignisse) und 78 Proben sind <= 1,01 (69 Ereignisse). Der p-Wert der maximalen Teststatistik beträgt 0,731 und ist somit nicht signifikant.	61
Abbildung 18: Expression von ITGAV in Primärtumoren und in Metastasengewebe	63
Abbildung 19: Anlagerungsstellen der Primer und der Sonde im KAI1 Gen.	96
Abbildung 20: Standardkurve für ALAS1. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20, 1:10 und 1:2 (blaue Quadrate, von links nach rechts).....	97
Abbildung 21: Standardkurve für HPRT1. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20, 1:10 und 1:2 (blaue Quadrate, von links nach rechts).....	97
Abbildung 22: Standardkurve für ITGAV. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20, 1:10 und 1:2 (blaue Quadrate, von links nach rechts).....	98
Abbildung 23: Standardkurve für KAI wt. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20 und 1:10 (blaue Quadrate, von links nach rechts).....	98
Abbildung 24: Standardkurve für KAI splice. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20 und 1:10 (blaue Quadrate, von links nach rechts).....	99

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Expression von KAI1 wt bei einem <i>cut point</i> von 1,02. 14 Proben sind > 1,02 (9 Ereignisse) und 86 Proben sind <= 1,02 (71 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,209 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für hohe KAI1 wt Expressionswerte zu erkennen.	102
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben nach Expression von KAI1 wt bei einem <i>cut point</i> von 1,02. 14 Proben sind > 1,02 (7 Ereignisse) und 86 Proben sind <= 1,02 (66 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,195 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für hohe KAI1 wt Expressionswerte zu erkennen.	102
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Expression von KAI1 splice bei einem <i>cut point</i> von 0,10. 76 Proben sind > 0,10 (64 Ereignisse) und 24 Proben sind <= 0,10 (16 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,533 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für niedrige KAI1 splice Expressionswerte zu erkennen.	103
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben nach Expression von KAI1 splice bei einem <i>cut point</i> von 0,06. 86 Proben sind > 0,06 (64 Ereignisse) und 14 Proben sind <= 0,06 (9 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,389 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für niedrige KAI1 splice Expressionen zu erkennen.	103
Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben nach Expression von KAI1 splice für das Subkollektiv der nicht-metastasierten Patientinnen bei einem <i>cut point</i> von 0,06. 51 Proben sind > 0,06 (42 Ereignisse) und 9 Proben sind <= 0,06 (5 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,040 und ist somit signifikant. Es besteht ein Vorteil für niedrige KAI1 splice Expressionswerte.	104
Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Expression von ITGAV bei einem <i>cut point</i> von 0,52. 62 Proben sind > 0,52 (47 Ereignisse) und 38 Proben sind <= 0,52 (33 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,957 und ist somit nicht signifikant.	105
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben nach Expression von ITGAV bei einem <i>cut point</i> von 0,57. 56 Proben sind > 0,57 (43 Ereignisse) und 44 Proben sind <= 0,57 (30 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,978 und ist somit nicht signifikant.	105

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms, modifiziert nach den Leitlinien der AWMF (www.awmf.org)	3
Tabelle 2: Grading nach UICC	4
Tabelle 3: Merkmale Zelllinien	22
Tabelle 4: klinische Daten der Primärtumoren	23
Tabelle 5: Zusammenfassung klinische Daten Metastasen	24
Tabelle 6: Reaktionsmix cDNA Synthese	29
Tabelle 7: Temperaturprofil cDNA Synthese	29
Tabelle 8: Basenabfolge der Primer und Sonde für KAI 1	30
Tabelle 9: Pipettierschema PCR	31
Tabelle 10: Temperaturprofil PCR	31
Tabelle 11: TaqMan Gene Expression Assays	33
Tabelle 12: Verdünnung cDNA	33
Tabelle 13: Pipettierschema ITGAV, ALAS1, HPRT1	33

Tabelle 14: Pipettierschema KAI1-Wildtyp, KAI1-splice	34
Tabelle 15: Thermal Cycler Profile	34
Tabelle 16: Übersicht der statistischen Ergebnisse des KM-Plotters für das Gesamtüberleben	43
Tabelle 17: Übersicht der statistischen Ergebnisse des KM-Plotters für das rezidivfreie Überleben	43
Tabelle 18: Steigung, Bestimmtheitsmaß und Effizienz für die Gene ALAS1, HPRT1, ITGAV, KAI1-wt und KAI1-splice.....	47
Tabelle 19: Übersicht über die normierten CT-Werte der einzelnen Gene	48
Tabelle 20: Übersicht über die relativen Expressionswerte der einzelnen Gene	49
Tabelle 21: Ergebnisse des Spearman-Test zum Zusammenhang der relativen Genexpression zwischen KAI1 Wildtyp, KAI1-splice und ITGAV.....	49
Tabelle 22: Assoziationen zwischen der KAI1-wt Expression und klinisch- pathologischen Merkmalen	50
Tabelle 23: Übersicht der statistischen Auswertung für KAI1-wt. Betrachtet wurden drei verschiedene Endpunkte: Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Cp: <i>cut point</i> , Mon: Monate, KI: 95%- Konfidenzintervall, Inf: Infinity (=unendlich).....	51
Tabelle 24: Assoziationen zwischen der KAI1-splice Expression und klinisch- pathologischen Merkmalen	54
Tabelle 25: Übersicht der statistischen Auswertung für KAI1-splice. Betrachtet wurden drei verschiedene Endpunkte: Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Cp: <i>cut point</i> , Mon: Monate, KI: 95%-Konfidenzintervall, Inf: Infinity (=unendlich).....	55
Tabelle 26: Übersicht der statistischen Auswertung für KAI1-splice für das Subkollektiv der nicht-metastasierten Patientinnen. Betrachtet wurden drei verschiedene Endpunkte: Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Cp: <i>cut point</i> , Mon: Monate, KI: 95%- Konfidenzintervall, Inf: Infinity (=unendlich).....	57
Tabelle 27: Assoziationen zwischen der ITGAV Expression und klinisch- pathologischen Merkmalen	60
Tabelle 28: Übersicht der statistischen Auswertung für ITGAV. Betrachtet wurden drei verschiedene Endpunkte: Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Cp: <i>cut point</i> , Mon: Monate, KI: 95%- Konfidenzintervall, Inf: Infinity (=unendlich).....	61
Tabelle 29: Ergebnisse der TaqMan-Läufe und relative Genexpression.	100

8. Anhang

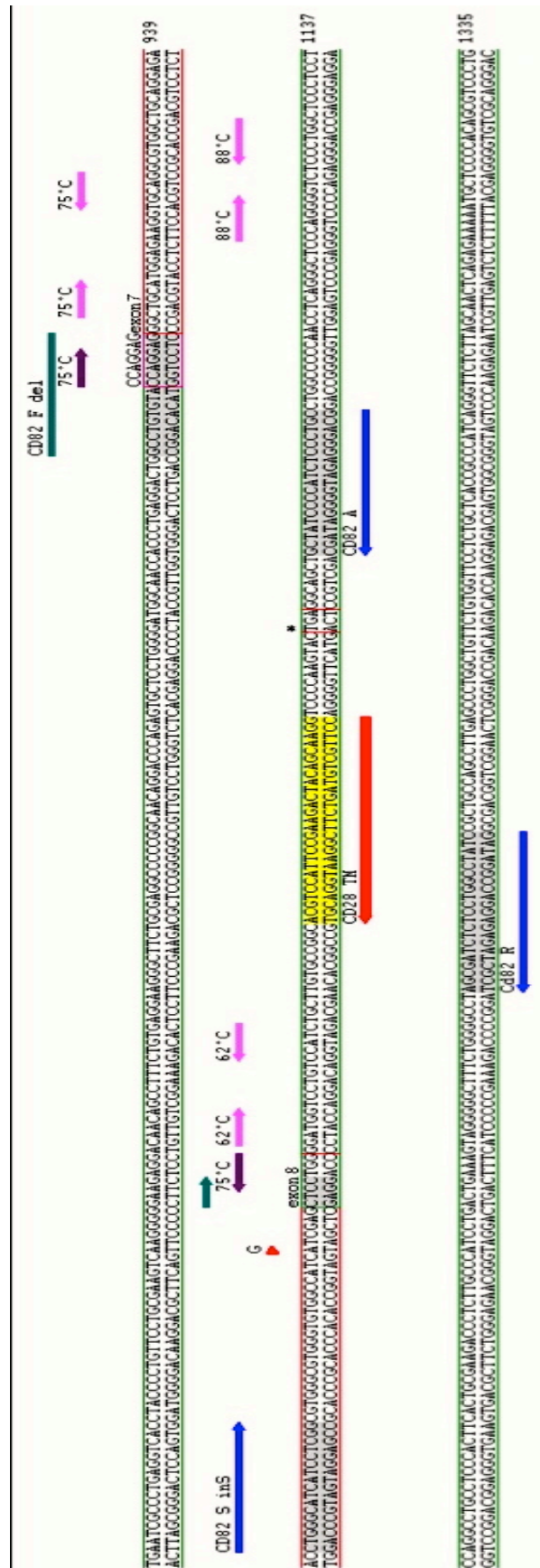


Abbildung 19: Anlagerungsstellen der Primer und der Sonde im KAI1 Gen.

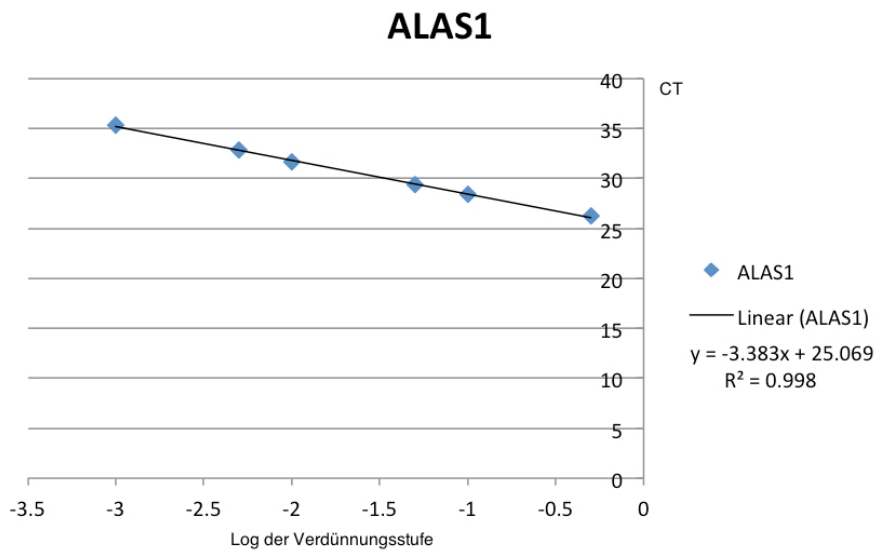


Abbildung 20: Standardkurve für ALAS1. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20, 1:10 und 1:2 (blaue Quadrate, von links nach rechts).

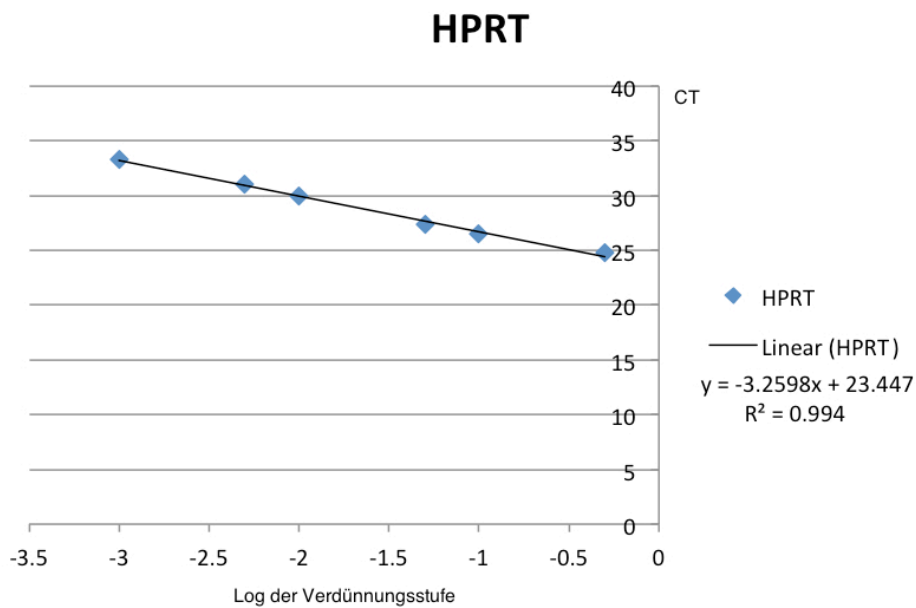


Abbildung 21: Standardkurve für HPRT1. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20, 1:10 und 1:2 (blaue Quadrate, von links nach rechts).

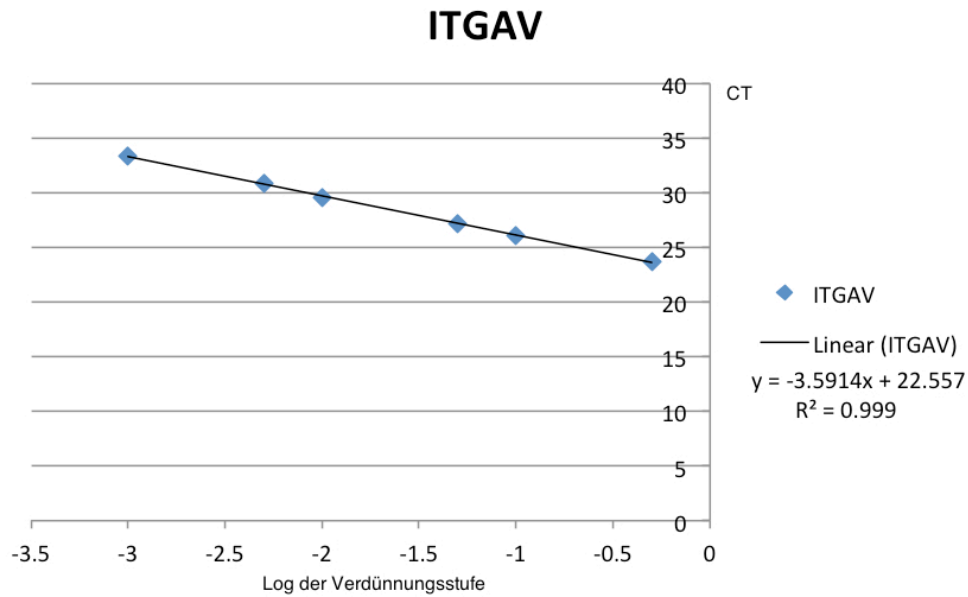


Abbildung 22: Standardkurve für ITGAV. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20, 1:10 und 1:2 (blaue Quadrate, von links nach rechts).

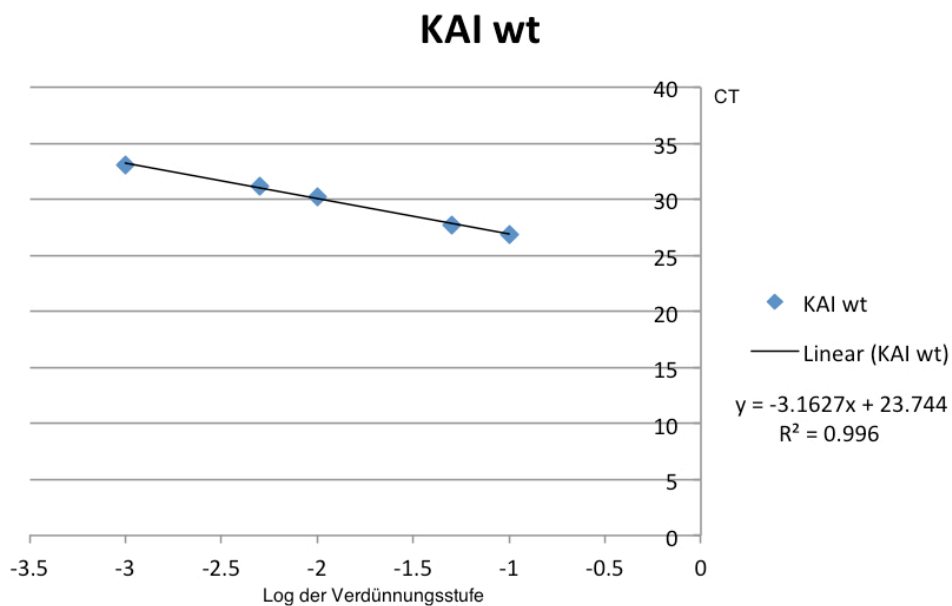


Abbildung 23: Standardkurve für KAI wt. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20 und 1:10 (blaue Quadrate, von links nach rechts).

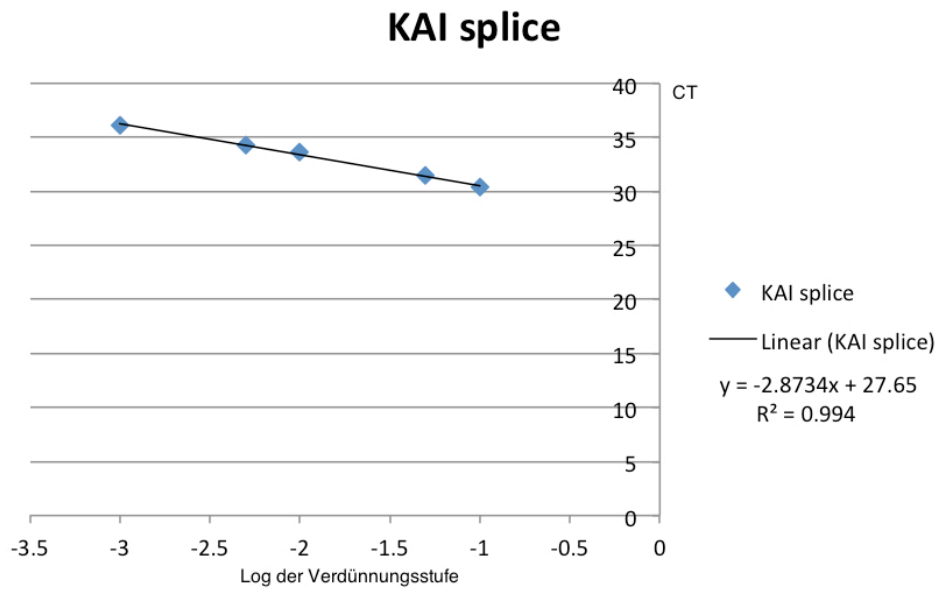


Abbildung 24: Standardkurve für KAI splice. Logarithmische Darstellung der CT-Werte gegen den Logarithmus zur Basis 10 für die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:200, 1:100, 1:20 und 1:10 (blaue Quadrate, von links nach rechts).

Tabelle 29: Ergebnisse der TaqMan-Läufe und relative Genexpression.

Name	avCT KAI1 wt	avCT KAI1 splice	avCT ITGAV	avCT ALAS1	avCT HPRT1	KAI1 wt rel. Expression	KAI1 splice rel. Expression	ITGAV rel. Expression
D1	26.07	28.46	22.15	27.19	24.79	0.20	0.74	1.98
D2	27.91	29.52	24.98	26.89	25.10	0.05	0.33	0.34
D3	27.78	30.16	26.59	27.96	24.29	0.07	0.22	0.13
D4	27.05	30.47	25.87	28.52	26.49	0.28	0.43	0.53
D5	29.61	33.91	28.96	30.84	29.20	0.26	0.16	0.44
D6	27.11	28.79	25.52	27.66	25.44	0.14	0.84	0.34
D7	26.90	31.02	24.07	27.93	25.99	0.22	0.19	1.16
D8	25.72	28.11	25.05	26.97	25.62	0.35	1.32	0.42
D9	28.97	30.11	27.00	27.94	25.92	0.05	0.38	0.17
D10	25.53	28.56	26.14	26.28	25.30	0.30	0.69	0.16
D11	25.93	32.85	26.41	29.16	25.19	0.55	0.05	0.32
D12	26.68	29.13	26.57	28.59	25.56	0.27	0.92	0.25
D13	28.54	31.20	26.46	29.31	27.19	0.16	0.40	0.61
D14	28.72	33.12	26.56	28.90	27.57	0.15	0.09	0.61
D15	27.83	30.47	27.44	28.38	26.92	0.19	0.50	0.23
D16	28.29	33.70	26.27	29.16	27.53	0.22	0.06	0.77
D17	27.45	30.16	26.34	27.93	25.34	0.11	0.29	0.21
D18	28.59	34.06	29.48	30.73	28.49	0.40	0.10	0.22
D19	28.31	30.76	24.82	28.16	25.18	0.06	0.19	0.57
D20	25.22	30.55	25.55	28.80	27.22	1.61	0.60	0.97
D21	26.67	31.63	24.17	27.71	25.33	0.19	0.08	0.79
D22	25.59	29.66	24.25	27.44	25.65	0.43	0.43	0.79
D23	28.06	31.12	27.93	29.96	27.77	0.35	0.64	0.36
D24	26.72	32.25	25.61	28.52	26.15	0.32	0.09	0.55
D25	26.27	29.82	24.25	28.03	26.09	0.37	0.53	1.11
D26	24.67	34.33	25.36	27.73	25.48	0.85	0.01	0.39
D27	25.66	31.63	23.96	28.32	26.92	0.91	0.20	2.10
D28	26.42	29.75	26.03	29.40	27.83	1.02	1.73	1.09
D29	27.13	31.34	24.19	28.14	25.70	0.18	0.14	1.02
D30	24.73	30.12	23.92	27.17	25.26	0.64	0.23	0.77
D31	25.22	29.63	25.32	28.18	26.31	0.91	0.71	0.64
D32	26.20	31.02	23.86	27.32	24.23	0.16	0.08	0.58
D33	27.86	31.56	27.07	28.66	26.58	0.17	0.19	0.27
D34	28.90	33.78	28.40	30.81	30.02	0.67	0.27	0.95
D35	25.44	30.79	25.33	29.41	27.06	1.50	0.54	1.23
D36	24.90	31.99	24.62	28.74	27.40	2.19	0.20	1.91
D37	26.49	31.59	25.52	29.02	26.23	0.45	0.19	0.70
D38	27.84	33.07	27.29	30.28	27.80	0.46	0.15	0.61
D39	25.63	30.31	25.55	29.23	27.35	1.40	0.85	1.14
D40	28.05	33.67	25.47	29.07	27.48	0.25	0.06	1.23
D41	26.03	29.54	27.11	29.25	27.34	1.05	1.58	0.42
D42	28.18	34.09	28.04	30.43	29.51	0.81	0.15	0.86
D43	28.84	31.15	26.84	29.09	28.13	0.19	0.62	0.71
D44	33.21	35.72	32.60	34.45	34.50	0.62	1.21	1.36
D45	27.57	33.88	25.65	29.80	27.38	0.41	0.06	1.27
D46	27.87	35.24	24.99	27.73	26.34	0.12	0.01	0.72
D47	26.65	31.02	25.84	29.06	27.31	0.63	0.45	0.90
D48	29.85	34.00	28.17	31.35	29.51	0.29	0.20	0.95
D49	25.98	30.84	24.98	28.68	25.98	0.54	0.28	0.81
D50	31.62	32.41	28.60	30.06	29.00	0.05	0.42	0.43
D51	28.95	34.22	26.45	29.86	27.78	0.18	0.05	0.91
D52	28.10	32.49	26.84	29.82	27.63	0.31	0.19	0.66
D53	27.68	32.58	28.95	32.52	27.71	1.36	0.59	0.56

D54	26.40	29.96	26.85	29.24	27.04	0.71	0.99	0.44
D55	29.76	34.63	24.77	30.59	27.55	0.12	0.04	3.11
D56	26.81	31.10	26.16	29.87	26.34	0.53	0.40	0.68
D57	27.49	33.61	26.98	30.16	29.83	1.56	0.26	1.97
D58	27.43	31.17	25.59	28.79	25.73	0.18	0.20	0.53
D59	26.87	31.30	24.41	29.09	26.34	0.37	0.25	1.53
D61	31.31	36.13	30.86	31.04	30.12	0.13	0.05	0.22
D62	28.23	35.79	27.54	31.06	30.17	1.24	0.06	1.87
D63	26.65	29.82	25.19	30.25	26.90	0.80	1.51	1.72
D64	28.56	33.28	27.28	29.03	27.04	0.14	0.07	0.31
D65	26.84	30.48	25.93	27.81	25.54	0.18	0.24	0.28
D66	26.56	30.58	24.13	28.07	26.41	0.35	0.34	1.40
D67	30.16	35.91	27.20	31.08	29.85	0.26	0.05	1.97
D68	25.10	30.21	25.27	26.96	26.72	0.99	0.44	0.66
D70	26.18	31.06	26.31	28.60	27.72	1.00	0.49	0.74
D72	27.05	28.65	25.23	27.82	25.62	0.16	1.06	0.46
D73	22.92	31.96	24.84	27.30	25.27	2.46	0.06	0.44
D75	27.85	32.51	26.98	30.48	28.49	0.63	0.33	1.04
D77	24.37	29.12	24.07	27.43	25.54	1.00	0.63	0.84
D78	24.93	27.36	24.95	27.05	26.43	0.97	3.74	0.69
D79	24.37	29.94	24.27	27.12	25.43	0.88	0.29	0.65
D80	25.40	29.94	25.56	28.22	25.95	0.70	0.48	0.48
D81	24.65	29.84	25.55	27.39	24.56	0.56	0.24	0.22
D82	24.47	28.38	24.38	26.62	24.94	0.58	0.71	0.43
D84	24.62	29.10	25.48	27.57	26.01	1.07	0.81	0.43
D85	23.30	29.87	24.22	27.22	23.74	1.10	0.17	0.38
D86	26.12	30.55	24.07	27.27	25.73	0.29	0.21	0.88
D87	25.39	29.80	23.32	26.39	24.78	0.26	0.20	0.75
D88	27.93	31.48	27.58	29.90	27.40	0.33	0.41	0.38
D89	25.50	32.35	27.20	28.41	26.56	0.88	0.10	0.23
D90	26.04	31.71	24.50	28.36	26.47	0.57	0.15	1.22
D91	25.59	29.41	25.85	28.23	26.97	0.97	1.17	0.63
D92	31.01	36.95	29.57	31.73	30.58	0.23	0.03	0.70
D93	25.17	27.22	24.66	27.53	24.85	0.44	2.26	0.45
D94	23.77	28.83	23.61	26.50	23.99	0.64	0.33	0.46
D95	23.72	28.72	24.53	26.28	24.63	0.80	0.43	0.31
D96	25.06	28.64	23.38	27.57	23.95	0.38	0.57	0.81
D97	23.61	27.65	24.20	27.77	25.31	1.75	2.05	0.78
D98	25.50	27.57	26.21	27.21	25.13	0.35	1.73	0.17
D99	25.36	34.23	26.99	29.68	27.90	2.44	0.05	0.65
D100	25.63	29.45	24.36	26.52	24.95	0.25	0.30	0.43
D101	26.40	30.70	25.70	28.42	25.25	0.29	0.22	0.37
D102	27.66	31.57	22.83	26.82	25.27	0.07	0.07	1.41
D103	31.89	37.26	30.35	32.46	31.94	0.28	0.06	1.01
M1	27.34	29.80	26.81	28.81	26.77	0.28	0.89	0.35
M2	26.65	31.25	26.57	29.65	28.71	1.42	0.85	1.26
M3	35.09	38.35	33.13	34.55	33.55	0.09	0.09	0.56
M4	31.59	35.47	29.28	33.05	32.65	0.57	0.42	3.26
M6	27.81	32.98	28.02	31.05	29.69	1.30	0.45	1.06
M7	28.26	32.33	25.89	29.10	27.20	0.19	0.15	0.83
M8	28.48	31.78	26.35	30.03	27.92	0.28	0.41	1.08
M9	26.11	30.88	26.70	28.75	26.39	0.58	0.32	0.32
M10	34.53	37.13	31.98	36.33	35.46	0.51	0.85	4.38
M11	32.37	34.82	30.11	32.78	32.06	0.22	0.49	1.31

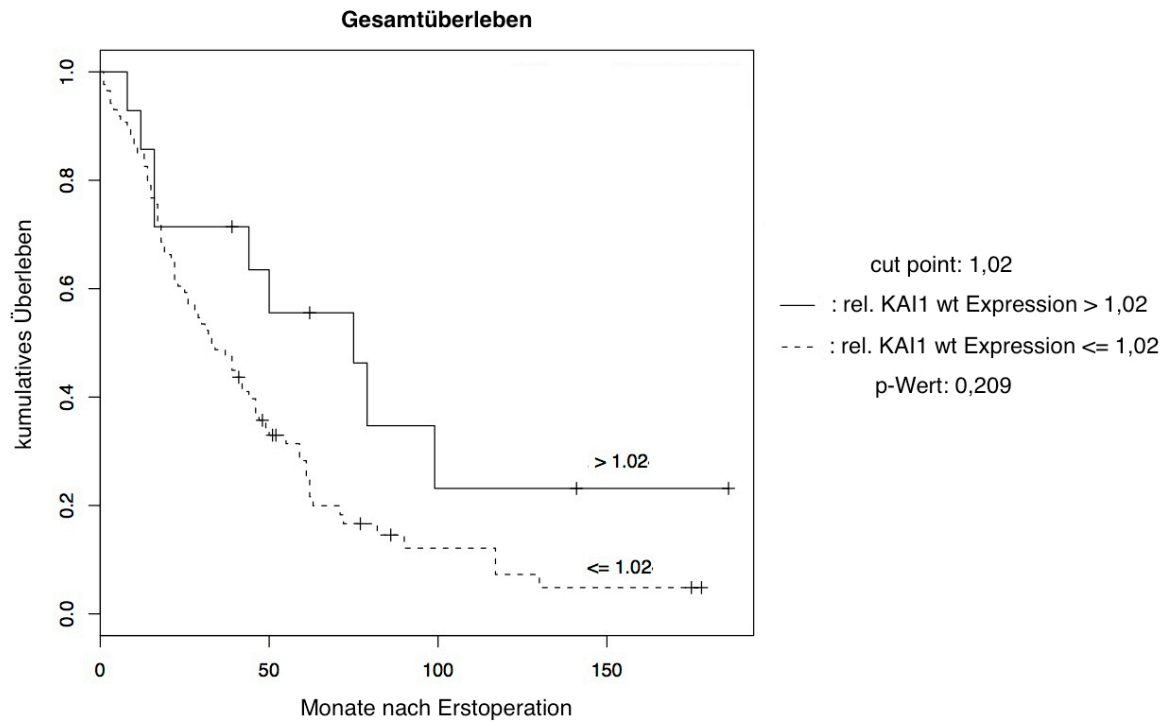


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Expression von KAI1 wt bei einem *cut point* von 1,02. 14 Proben sind > 1,02 (9 Ereignisse) und 86 Proben sind <= 1,02 (71 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,209 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für hohe KAI1 wt Expressionswerte zu erkennen.

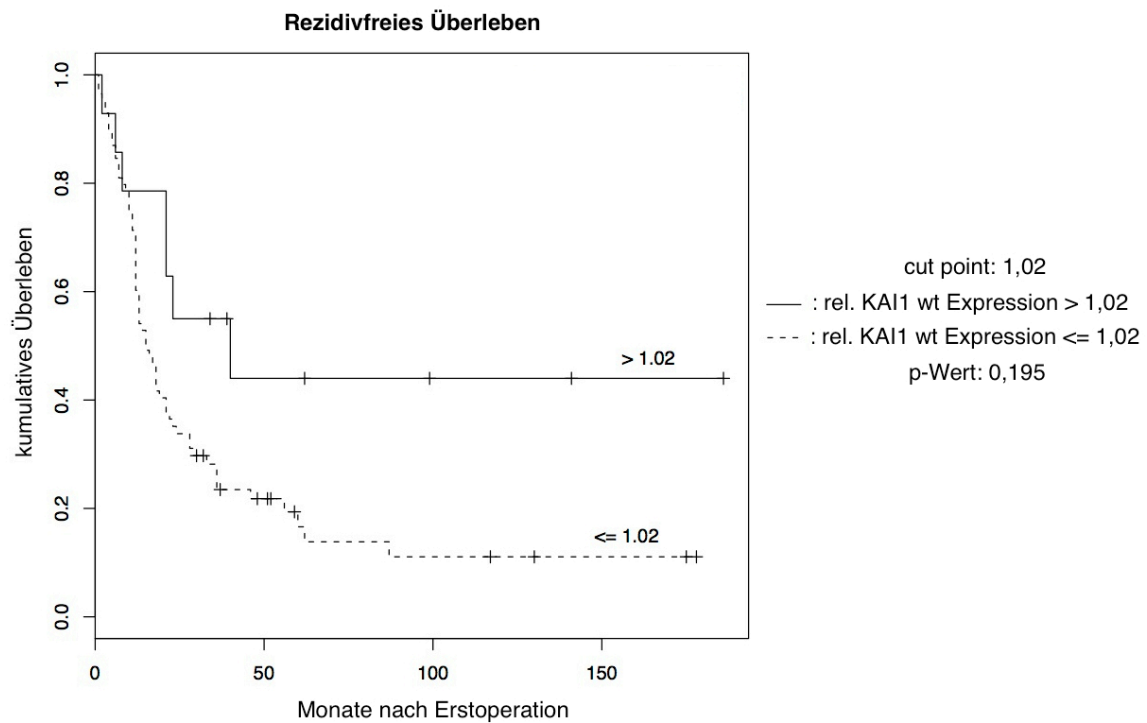


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben nach Expression von KAI1 wt bei einem *cut point* von 1,02. 14 Proben sind > 1,02 (7 Ereignisse) und 86 Proben sind <= 1,02 (66 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,195 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für hohe KAI1 wt Expressionswerte zu erkennen.

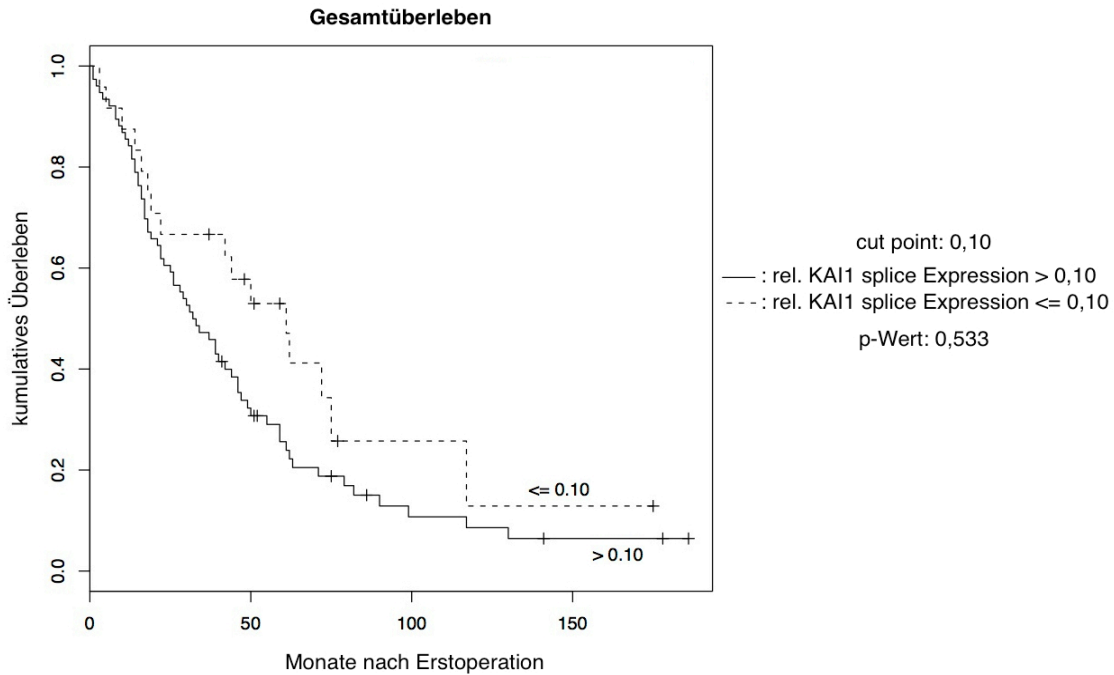


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Expression von KAI1 splice bei einem *cut point* von 0,10. 76 Proben sind > 0,10 (64 Ereignisse) und 24 Proben sind ≤ 0,10 (16 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,533 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für niedrige KAI1 splice Expressionswerte zu erkennen.

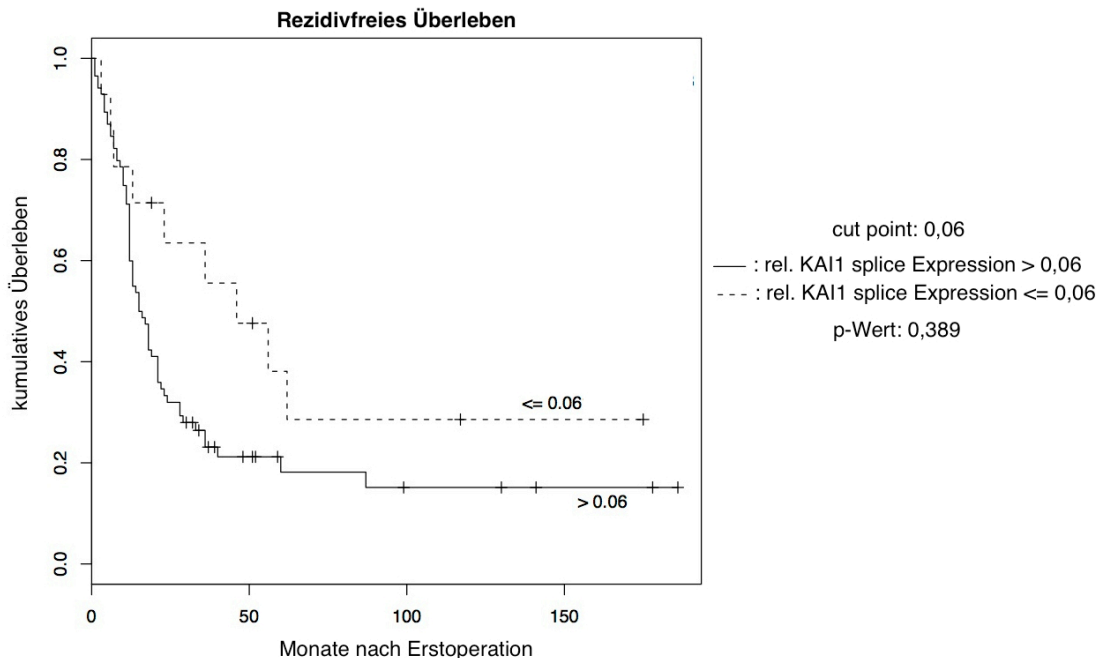


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben nach Expression von KAI1 splice bei einem *cut point* von 0,06. 86 Proben sind > 0,06 (64 Ereignisse) und 14 Proben sind ≤ 0,06 (9 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,389 und ist somit nicht signifikant. Es ist jedoch ein tendenzieller Vorteil für niedrige KAI1 splice Expressionen zu erkennen.

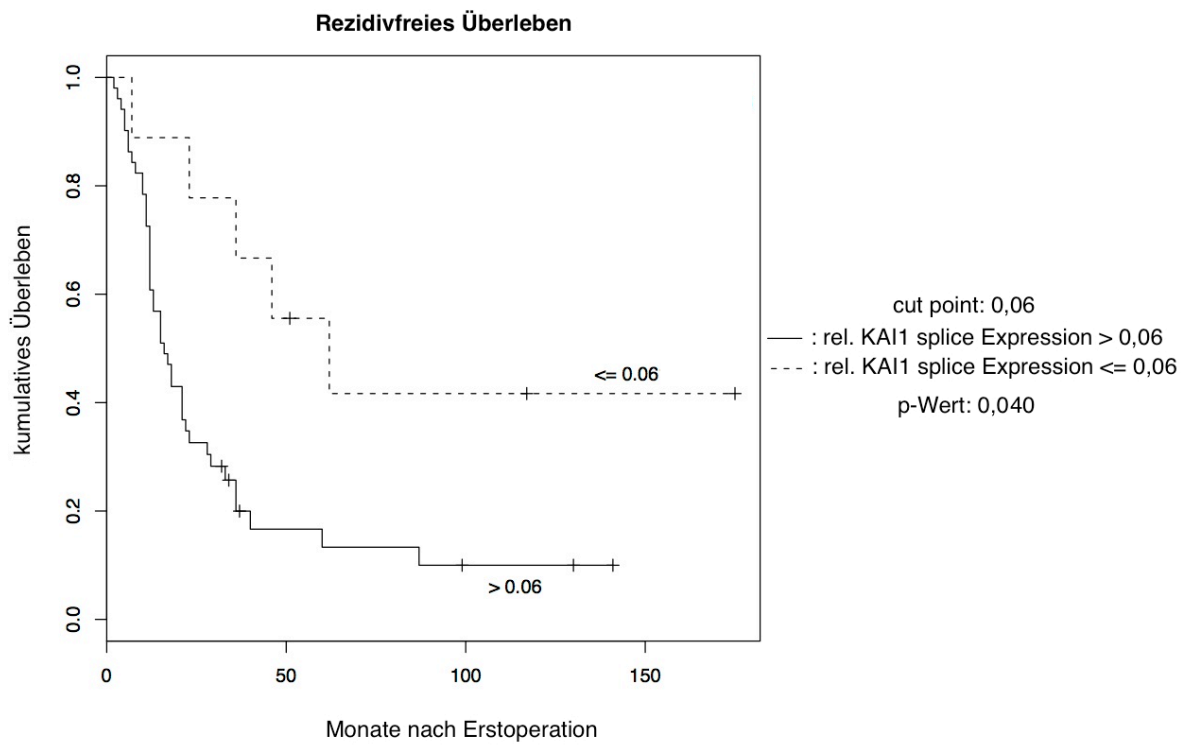


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben nach Expression von KAI1 splice für das Subkollektiv der nicht-metastasierten Patientinnen bei einem *cut point* von 0,06. 51 Proben sind > 0,06 (42 Ereignisse) und 9 Proben sind ≤ 0,06 (5 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,040 und ist somit signifikant. Es besteht ein Vorteil für niedrige KAI1 splice Expressionswerte.

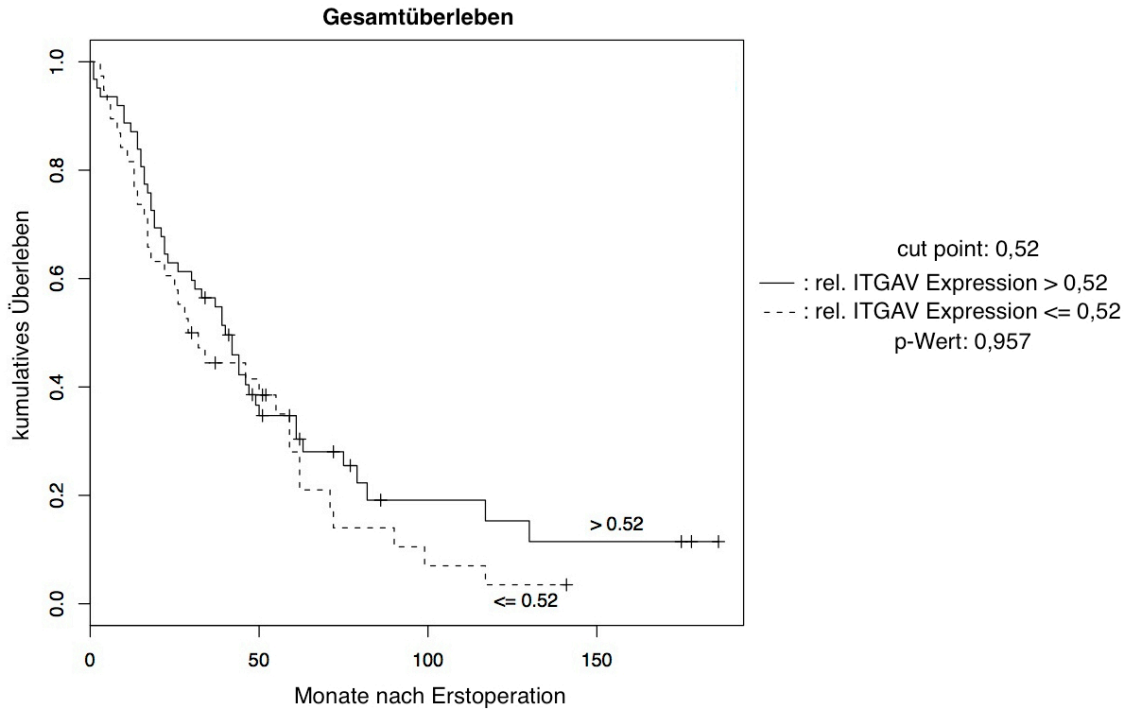


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Expression von ITGAV bei einem *cut point* von 0,52. 62 Proben sind > 0,52 (47 Ereignisse) und 38 Proben sind <= 0,52 (33 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,957 und ist somit nicht signifikant.

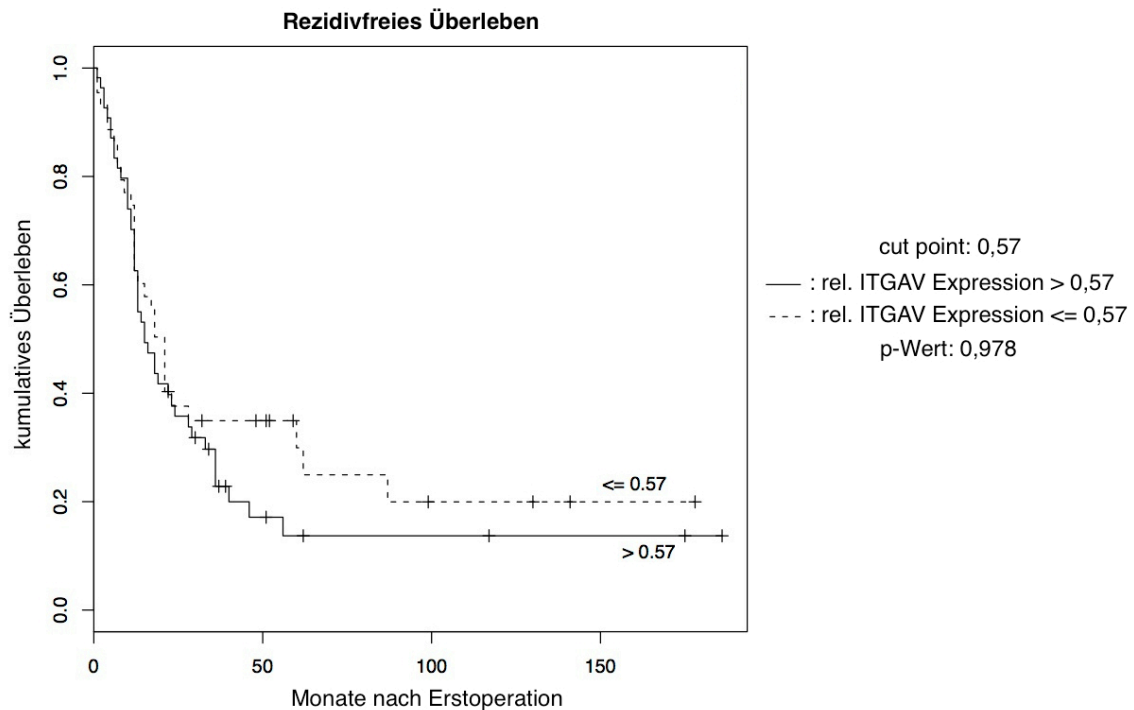


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben nach Expression von ITGAV bei einem *cut point* von 0,57. 56 Proben sind > 0,57 (43 Ereignisse) und 44 Proben sind <= 0,57 (30 Ereignisse). Der p-Wert des Log-Rank-Tests beträgt 0,978 und ist somit nicht signifikant.

9. Danksagung

Ich möchte mich gerne bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Insbesondere möchte ich Frau Dr. Eva Groß für die gute Betreuung danken, die Vergabe des Themas, der unermüdlichen Hilfe beim Erlernen von Laborfertigkeiten, Statistik und bei Problemlösung, für die vielen beantworteten Fragen, die ständige Erreichbarkeit und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Alfons Meindl für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik durchführen zu können, sowie Frau Prof. Dr. Marion Kiechle als Direktorin der Frauenklinik der TU München.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor für die Hilfe beim Einlernen und Umsetzen der Methoden.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Matthias Kotzsch vom Institut für Pathologie der Technischen Universität Dresden, für die Isolation der RNA aus den Gewebeproben und das Umschreiben dieser in cDNA.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Dr. Alexander Hapfelmeier für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Zuletzt geht ein großer Dank an Familie und Freunde, die mich immer unterstützt, beraten, motiviert und gern auch mal abgelenkt haben.

Vor allem meine Eltern, die mich immer in jeglicher Form unterstützen und mich immer wieder motiviert haben, wenn es mal nicht so gut lief.

Und natürlich Sebastian, für die geduldige Hilfe beim Umgang mit den Computerprogrammen, das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen gemeinsamen Stunden in der Bibliothek, in denen wir unsere Arbeiten geschrieben haben.