



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde  
(Direktorin: Prof. Dr. Marion B. Kiechle)

Gynäkologische Tumorgenetik  
(Leiterin: Priv.-Doz. Dr. Anne Quante)

**Genexpressionsuntersuchungen von Genen der  
homologen Rekombinationsreparatur beim  
Ovarialkarzinom**

Theresa Brunet

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Marion B. Kiechle
2. apl. Prof. Dr. Gisela Keller

Die Dissertation wurde am 05.02.2020 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.08.2020 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Ovarialkarzinom . . . . .	7
1.2 Ursachen eines homologen Rekombinationsdefizit . . . . .	7
1.2.1 Keimbahnmutationen . . . . .	8
1.2.2 Somatische Mutationen . . . . .	10
1.2.3 Epigenetische Alterationen . . . . .	11
1.2.4 „BRCAness“ . . . . .	11
1.3 PARP-Inhibitoren im Kontext eines homologen Rekombinationsdefizits . . . . .	12
1.3.1 Prinzip der synthetischen Letalität . . . . .	12
1.3.2 Stellenwert beim Ovarialkarzinom . . . . .	12
1.4 Identifizierung eines homologen Rekombinationsdefizit . . . . .	13
1.4.1 Aktuelle Ansätze . . . . .	13
1.4.2 MLPA BRCA1ness Test . . . . .	14
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1 Patientinnenkollektiv . . . . .	16
3.2 Material . . . . .	19
3.2.1 Kits und Assays . . . . .	19
3.2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer . . . . .	19
3.2.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Softwares . . . . .	20
3.3 Methoden . . . . .	22
3.3.1 DNA-Isolierung . . . . .	22
3.3.2 MLPA . . . . .	23
3.3.3 RNA-Isolierung . . . . .	26
3.3.4 cDNA Synthese . . . . .	27
3.3.5 quantitative Echtzeit-PCR . . . . .	28
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>33</b>
4.1 Identifizierung von BRCA1-ähnlichen Proben mittels des MLPA BRCA1ness Test	33
4.1.1 Datennormalisierung . . . . .	33
4.1.2 Evaluierung der Qualität . . . . .	33
4.1.3 Überlebenszeitanalysen . . . . .	34
4.1.4 Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern . . . . .	36
4.2 Untersuchung der mRNA Expression von Genen der DNA-Reparatur . . . . .	37
4.2.1 Berechnung der Effizienz . . . . .	37
4.2.2 Relative Quantifizierung . . . . .	38

4.2.3	Bestimmung der Cut-Off-Werte für statistische Berechnungen . . . . .	39
4.2.4	Gesamtüberleben . . . . .	39
4.2.5	Progressionsfreies Überleben . . . . .	45
4.2.6	Assoziation der mRNA-Daten mit den MLPA BRCAness Daten . . . . .	51
4.2.7	Korrelationsanalysen . . . . .	53
4.3	Klinisch-pathologische Parameter . . . . .	54
4.3.1	Gesamtüberleben . . . . .	54
4.3.2	Progressionsfreies Überleben . . . . .	58
4.4	Multivariable Cox-Regressionsanalyse . . . . .	61
4.4.1	Gesamtüberleben . . . . .	61
4.4.2	Progressionsfreies Überleben . . . . .	63
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1	MLPA BRCA1ness Test . . . . .	64
5.1.1	Anwendbarkeit des MLPA BRCA1ness Test beim Ovarialkarzinom . . . . .	64
5.1.2	Assoziation des <i>BRCA1</i> -ähnlichen Phänotyps mit einem besseren Gesamtüberleben . . . . .	65
5.1.3	<i>BRCA1</i> -ähnlicher Phänotyp und klinisch-pathologische Parameter . . . . .	65
5.1.4	<i>BRCA1</i> -ähnlicher Phänotyp und mRNA-Expression . . . . .	66
5.1.5	Limitationen der Studie und Ausblick . . . . .	67
5.2	Bestimmung der mRNA-Expressionswerte im Tumorgewebe . . . . .	68
5.2.1	Überlebenszeitanalysen . . . . .	68
5.2.2	Korrelation zwischen der <i>BRCA1</i> und <i>BRIP1</i> mRNA Expression . . . . .	74
5.2.3	Limitationen der Studie und Ausblick . . . . .	74
5.3	Klinisch-pathologische Parameter . . . . .	75
5.3.1	Evaluierung von etablierten klinisch-pathologischen Prognoseparametern . . . . .	75
5.3.2	Methodische Limitationen dieser Studie . . . . .	77
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>91</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>93</b>
	<b>Anhang</b>	<b>95</b>
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>104</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>aCGH</b>	Array-based Comparative Genomic Hybridization
<b>ALAS1</b>	Aminolevulinic Acid Synthase type 1 (Gen)
<b>ALAS1</b>	Aminolevulinic Acid Synthase type 1 (Protein)
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated (Gen)
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated (Protein)
<b>BRCA1</b>	BReast CAncer1 (Gen)
<b>BRCA1</b>	BReast CAncer1 (Protein)
<b>BRCA2</b>	BReast CAncer2 (Gen)
<b>BRCA2</b>	BReast CAncer2 (Protein)
<b>BRIP1</b>	BRCA1-interacting protein 1 (Gen)
<b>BRIP1</b>	BRCA1-interacting protein 1 (Protein)
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA
<b>CHEK2</b>	Checkpoint Kinase 2 (Gen)
<b>CHEK2</b>	Checkpoint Kinase 2 (Protein)
<b>CNVs</b>	Copy number variations
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FIGO</b>	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>HCL</b>	Chlorwasserstoff
<b>HR</b>	homologe Rekombination
<b>HRD</b>	Defizit der homologen Rekombination
<b>IQA</b>	Interquartilabstand
<b>LOH</b>	loss of heterozygosity
<b>MLPA</b>	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
<b>mRNA</b>	messenger RNA

<b>MW</b>	Mittelwert
<b>NER</b>	Nukleotidexzisionsreparatur
<b>NGS</b>	Next-Generation Sequencing
<b>NHEJ</b>	nicht-homologen Endverknüpfung
<b>nt</b>	Nukleotide
<b>PAM</b>	prediction analysis for microarrays
<b>PARP</b>	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
<b>PARP1</b>	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>RQ</b>	Relative Quantifizierung
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SNP</b>	single-nucleotide polymorphism
<b>STIC</b>	seröse tubare intraepitheliale Karzinome
<b>TNBC</b>	triple-negatives Mammakarzinom
<b>TRIS</b>	Tromethamin
<b>u.a.</b>	unter anderem

## Abstract

Ovarialkarzinomproben von 49 Patientinnen wurden durch den MLPA BRCA1ness Test in ein *BRCA1*-ähnliches bzw. nicht-*BRCA1*-ähnliches Tumorprofil klassifiziert und mRNA-Expressionswerte von sieben Genen (*ATM*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*), die für Proteine der homologen Rekombinationsreparatur (HR) kodieren, wurden bestimmt. Niedrige mRNA-Expressionswerte von *BRIP1*, *BRCA1* und *RAD51C* waren mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert. In der Cox-Regression waren die *BRIP1* mRNA-Expression und das MLPA Tumorprofil unabhängige prognostische Parameter.

Ovarian cancer tissues of 49 patients were classified in *BRCA1*-like or non-*BRCA1*-like by the MLPA BRCA1ness test and mRNA levels of seven genes (*ATM*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*) involved in homologous recombination (HR) were determined. Low mRNA levels of *BRIP1*, *BRCA1* and *RAD51C* were associated with favorable overall survival. Cox-regression showed a prognostic significance of *BRIP1* mRNA expression and a prognostic significance of the estimated tumor profile by MLPA.

# 1 Einleitung

## 1.1 Ovarialkarzinom

In Deutschland erkranken pro Jahr ca. 7.400 Frauen an einem Ovarialkarzinom (Kaatsch et al. 2015), womit das Ovarialkarzinom die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane darstellt. Insgesamt ist das Ovarialkarzinom die fünfthäufigste Todesursache aller Tumorerkrankungen der Frau (Siegel et al. 2016) und darüber hinaus nach dem Mammakarzinom an zweiter Stelle der tödlichen gynäkologischen Tumorerkrankungen (Ferlay et al. 2015). 70% aller Ovarialkarzinome werden aufgrund häufig fehlender Frühsymptome erst in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO Stadium III oder IV) diagnostiziert (Bowtell et al. 2015; Costa et al. 2015). Etwa ein Fünftel aller Ovarialkarzinome tritt auf dem Boden einer pathogenen *BRCA1*- oder *BRCA2*-Keimbahnmutation auf (Harter et al. 2017). Eine wichtige Therapiesäule ist die chirurgische Resektion des Tumors, wobei das Ausmaß der Resektion das wichtigste prognostische Kriterium darstellt (Du Bois et al. 2009). Im Anschluss an die Operation ist die Erstlinientherapie mit sechs Zyklen Carboplatin/Paclitaxel Standard (Bois et al. 1999). 70% der Patientinnen erleiden im weiteren Verlauf ein Rezidiv (Rochon und Du Bois 2011). Einen Wendepunkt in der Therapie des Ovarialkarzinoms markierte die Zulassung des PARP1-Inhibitor Olaparib (Lynparza®) im Dezember 2014 als Erhaltungstherapie (zunächst) zur Behandlung von *BRCA1*- oder *BRCA2*-positivem (Keimbahn- oder somatische Mutation), high-grade serösem und platinsensitivem Eierstock-, Peritoneal- oder Eileiterkarzinoms im Rezidiv (European Medicines Agency 2020a). Im Mai 2018 wurde die Zulassung auf die Behandlung von Patientinnen mit serösem epitheliales Karzinom, unabhängig vom *BRCA*-Mutationsstatus, und auf Patientinnen mit nicht-serösem epitheliales Karzinom erweitert (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen 2020). Seit Dezember 2017 ist mit Niraparib (Zejula®) zudem ein weiterer PARP-Inhibitor (ebenfalls unabhängig *BRCA*-Mutationsstatus) zugelassen (European Medicines Agency 2020b). Trotz Fortschritten in der Operationstechnik und breiter Anwendung von platinhaltiger Chemotherapie ist die 5-Jahres-Überlebensrate mit 46% (2005 bis 2011) nach wie vor niedrig (Siegel et al. 2016; Sun et al. 2014). Mögliche Ursachen des schlechten Gesamtüberlebens stellen der späte Diagnosezeitpunkt aufgrund fehlender Frühsymptome und häufiger Rezidive. Das Auftreten von Platinresistenz stellt des Weiteren eine große Herausforderung dar. Nachdem viele Patientinnen zwar anfänglich ein sehr gutes Ansprechen auf die Chemotherapie zeigen, entwickeln jedoch viele im Laufe der Therapie ein Resistenzverhalten (v.a. gegenüber Carboplatin). Die Identifizierung von platinsensiblen und -refraktären Patientinnen ist daher von hohem klinischen Interesse, auch um resistenten Erkrankten unnötige und mit Nebenwirkungen behaftete Therapien zu ersparen. (Hennessy et al. 2009).

## 1.2 Ursachen eines homologen Rekombinationsdefizit

Die homologe Rekombination (HR) ist ein komplexer und fein abgestimmter DNA-Reparaturmechanismus, der der präzisen Reparatur von Doppelstrangbrüchen und Quervernetzungen dient und eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität hat. Das Prinzip der HR beruht auf der Nutzung des intakten Schwesterchromatids als Matrize/Kopiervorlage für die Korrektur des DNA-Schadens (Stoppa-Lyonnet 2016). Die HR kann in drei Stadien

(Pre-Synapsis, Synapsis, Post-Synapsis) eingeteilt werden, wobei zahlreiche Proteine interagieren (Mazón et al. 2010). BRCA1, BRCA2 und RAD51C stellen Schlüsselkomponenten in der Aktivierung und Regulation einer funktionierenden HR dar (O'Donovan und D. M. Livingston 2010).

Eine beeinträchtigte DNA-Reparatur ist ein Schlüsselmerkmal der Krebsentstehung (Hanahan und Weinberg 2011). Eine fehlerhafte HR führt zu charakteristischen genomischen Veränderungen – hohe Anzahl an loss of heterozygosity (LOH), telomerischen allelischen Imbalancen, ausgedehnte Transitionen –, die sich in einer hohen genomischen Instabilität widerspiegeln (Geisler et al. 2002; Skytte et al. 2011). Mehrere Veränderungen dieser Art können über die Zeit die Tumorentstehung begünstigen (Stoppa-Lyonnet 2016). Beim Ovarialkarzinom lässt sich in 41-50% aller Fälle ein Defizit der homologen Rekombination (HRD) nachweisen, wobei sich die Häufigkeit hinsichtlich des histologischen Subtyps und der verwendeten Methode unterscheidet (Elvin et al. 2017; Moschetta et al. 2016). Einem HRD können initial verschiedene genetische Ursachen zugrunde liegen: Dazu zählen Keimbahnmutationen, somatische Mutationen und epigenetische Veränderungen von Genen, die an der HR beteiligt sind. In einigen Fällen eines HRD ist die initiale genetische Ursache unklar (Rigakos und Razis 2012).

### 1.2.1 Keimbahnmutationen

Bei ca. einem Fünftel aller Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom entsteht der Tumor auf dem Boden einer pathogenen Keimbahnmutation in einem Gen, das für ein an der HR beteiligtes Protein kodiert (Harter et al. 2017; Pennington et al. 2014). Im Kontext des erblichen Eierstockkrebs sind hier als häufigste Ursachen pathogene Keimbahnmutationen in *BRCA1* und *BRCA2* zu nennen (Ford et al. 1998; Harter et al. 2017; Toss et al. 2015). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Gene zusammenfassend aufgelistet und hinsichtlich ihrer Relevanz im Kontext des erblichen Ovarialkarzinoms näher beleuchtet. Alle Genprodukte sind an der HR beteiligt. Die statistischen Daten sind einer kürzlich veröffentlichten und der bislang größten Studie entnommen, bei der insgesamt 95.561 Frauen (28% mit einem Mammakarzinom, 5% mit einem Ovarialkarzinom) mithilfe eines NGS-basierten Genpanels (25 Gene) auf das Vorliegen von pathogenen Varianten in bekannten Tumorprädispositionsgenen untersucht wurden (Kurian et al. 2017).

**ATM** *ATM* (OMIM: \*607585) kodiert für eine Serin-/Threonin-Proteinkinase, die eine wichtige Rolle bei der Zellzykluskontrolle und der Regulation weiterer Tumorsuppressorproteine einnimmt. Biallelische Varianten in *ATM* sind mit der autosomal-rezessiven Erkrankung Ataxia teleangiectasia (OMIM: #208900); heterozygote pathogene Varianten in *ATM* mit einem moderat erhöhten Mammakarzinom- (OR: 1,74; 95%-KI: 1,46 - 2,07) und Ovarialkarzinomrisiko (OR: 1,69; 95%-KI: 1,19 - 2,40) assoziiert (Kurian et al. 2017). Die Häufigkeit von pathogenen Keimbahnmutationen in *ATM* bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde kürzlich mit 0,86% beziffert (Kurian et al. 2017).

**BRCA1** *BRCA1* (OMIM: \*605882) ist ein Tumorsuppressorgen und kodiert für das Protein BRCA1, das durch Komplexbildung mit zahlreichen weiteren Proteinen eine entscheidende Rolle in der DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität einnimmt. Biallelische Varianten in *BRCA1* sind mit der autosomal-rezessiven Erkrankung Fanconi Anämie Typ S verknüpft (OMIM: #617883). Heterozygote pathogene Varianten in *BRCA1* sind mit einem statistisch signifikant erhöhten Mammakarzinom- (OR: 5,91; 95%-KI: 5,25 - 6,67) und Ovarialkarzinomrisiko (OR: 11,8; 95%-KI: 9,99 - 14,0) assoziiert (OMIM: #604370) (Kurian et al. 2017). Die Häufigkeit von pathogenen Keimbahnmutationen in *BRCA1* bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde kürzlich mit ca. 5% beziffert (Kurian et al. 2017).

**BRCA2** *BRCA2* (OMIM: \*600185) ist ein Tumorsuppressorgen und kodiert für das Protein BRCA2, welches bei der Initiierung der HR eine entscheidende Rolle spielt. Biallelische Varianten in *BRCA2* sind mit der autosomal-rezessiven Erkrankung Fanconi Anämie Typ D1 assoziiert (OMIM: #605724). Ebenso wie *BRCA1* zählt *BRCA2* zu der Gruppe der Hochrisikogene für familiären Brust- und Eierstockkrebs. Heterozygote pathogene Varianten in *BRCA2* sind mit einem statistisch signifikant erhöhten Mammakarzinom- (OR: 3,31; 95%-KI: 2,95 - 3,71) und Ovarialkarzinomrisiko (OR: 5,26; 95%-KI: 4,38 - 6,31) assoziiert (OMIM: #612555) (Kurian et al. 2017). Die Häufigkeit von pathogenen Keimbahnmutationen in *BRCA2* bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde kürzlich mit 3,96% beziffert (Kurian et al. 2017).

**BRIP1** *BRIP1* (OMIM: \*605882) kodiert für ein gleichnamiges Protein, das u.a. mit BRCA1 interagiert, wobei der Bindungskomplex eine Schlüsselrolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen im Rahmen der HR spielt. Biallelische Varianten in *BRIP1* sind mit der autosomal-rezessiven Erkrankung Fanconi Anämie Typ J (OMIM: #609054); heterozygote pathogene Varianten in *BRIP1* mit einem statistisch signifikant erhöhten Ovarialkarzinomrisiko (OR: 2,62; 95%-KI: 1,72 - 3,98) assoziiert (Kurian et al. 2017). Ein Zusammenhang mit einem nennenswert erhöhten Mammakarzinomrisiko konnte in mehreren neueren Studien nicht bestätigt werden (Couch et al. 2017; Easton et al. 2016; Kurian et al. 2017). Die Häufigkeit von pathogenen Keimbahnmutationen in *BRIP1* bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde kürzlich mit ca. 1% beziffert (Kurian et al. 2017).

**CHEK2** *CHEK2* (OMIM: +604373) kodiert für eine Proteinkinase, die als Reaktion auf DNA-Schäden aktiviert wird und eine regulatorische Funktion im Zellzyklus hat. Heterozygote pathogene Varianten in *CHEK2* sind mit einem statistisch signifikant erhöhten Mammakarzinomrisiko (OR: 1,99; 95%-KI: 1,70 - 2,33), jedoch nicht mit einem erhöhten Ovarialkarzinomrisiko assoziiert (Kurian et al. 2017). Die Häufigkeit von pathogenen Keimbahnmutationen in *CHEK2* bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde kürzlich mit ca. 0,5% beziffert (Kurian et al. 2017).

**RAD51C** *RAD51C* (OMIM: \*602774) kodiert für RAD51C, eines von fünf Paralogen von RAD51 und formt mit diesen zwei verschiedene Komplexe, die unterschiedliche Aufgaben in der homologe Rekombination (HR) erfüllen. RAD51C ist somit ein integraler Bestandteil in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen. (Meindl et al. 2010). Biallelische Varianten in *RAD51C*

sind mit der autosomal-rezessiven Erkrankung Fanconi Anämie Typ O (OMIM: #613390) assoziiert. Heterozygote pathogene Varianten in *RAD51C* sind mit einem statistisch signifikant erhöhten Ovarialkarzinomrisiko (OR: 4,98; 95%-KI: 3,09 - 8,04) assoziiert (Kurian et al. 2017). In jüngeren Studien konnte hingegen keine statistisch signifikante Erhöhung des Risikos, an einem Mammakarzinom zu erkranken, nachgewiesen werden (Kurian et al. 2017; Loveday et al. 2012). Die Häufigkeit von pathogenen Keimbahnmutationen in *RAD51C* bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde kürzlich mit ca. 0,6% beziffert (Kurian et al. 2017).

***RAD51D*** *RAD51D* (OMIM: \*602954) kodiert für RAD51D, einem weiteren Paralog von RAD51. Heterozygote pathogene Varianten in *RAD51D* sind mit einem statistisch signifikant erhöhten Ovarialkarzinomrisiko (OR: 4,78; 95%-KI: 2,13 - 10,7) assoziiert (Kurian et al. 2017). In jüngeren Studien konnte hingegen keine statistisch signifikante Erhöhung des Mammakarzinomrisikos nachgewiesen werden (Kurian et al. 2017; Loveday et al. 2011). Die Häufigkeit von pathogenen Keimbahnmutationen in *RAD51D* bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurde kürzlich mit ca. 0,2% beziffert (Kurian et al. 2017).

### 1.2.2 Somatische Mutationen

Pathogene somatische Mutationen stellen eine weitere Ursache eines HRD dar. In der Studie von Pennington et al. 2014 wurden bei ca. 8% aller untersuchten Ovarialkarzinome pathogene somatische Mutationen in Genen, die für Proteine der HR kodieren, nachgewiesen. In Abbildung 1 sind die in dieser Arbeit untersuchten Gene fett markiert.

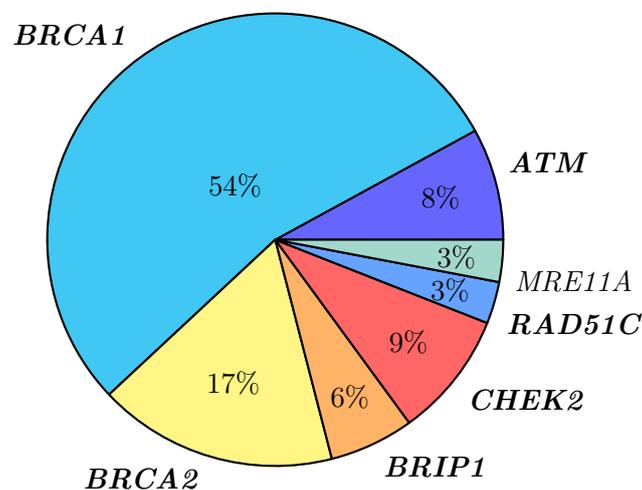


Abbildung 1: Somatische Mutationen beim Ovarialkarzinom (modifiziert nach Pennington et al. 2014)

Insgesamt treten somatische Mutationen in den dargestellten Genen der HR häufiger als entsprechende Keimbahnmutationen auf. In *RAD51D* wurden in dieser Veröffentlichung in den untersuchten Ovarialkarzinomen keine pathogenen somatischen Mutationen detektiert (Pennington et al. 2014).

### 1.2.3 Epigenetische Alterationen

Neben somatischen und Keimbahnmutationen kann ein HRD aus epigenetischen Modifikationen, die zu einer Stilllegung von Genen der HR (v.a. *BRCA1* und *RAD51C*) führen, resultieren. Im Gegensatz zu Mutationen sind epigenetische Genregulationen dynamisch und können sich je nach Mikroumgebung des Tumors verändern (Moschetta et al. 2016). Eine reduzierte *BRCA1*-mRNA-Expression als Folge einer Promotermethylierung konnte in 5-30% aller Ovarialkarzinome nachgewiesen werden (Bell et al. 2011; Chiang et al. 2006; J. Ledermann et al. 2012). Eine *RAD51C*-Promotermethylierung, die mit einer verringerten mRNA-Expression von *RAD51C* assoziiert ist, wurde in 3% aller untersuchten Ovarialkarzinome nachgewiesen (Bell et al. 2011; Pennington et al. 2014).

### 1.2.4 „BRCAness“

In Zusammenhang mit dem HRD fällt häufig das Schlagwort „BRCAness“-Phänotyp (bzw. *BRCA1*-ähnlicher Phänotyp). Der Begriff „BRCAness“ wurde eingeführt, um sporadische *BRCA*-Wildtyp Tumore zu beschreiben, die phänotypische Eigenschaften von Tumoren von *BRCA1*- bzw. *BRCA2*-Keimbahnmutationsträgerinnen aufweisen (Turner et al. 2004). Solche phänotypischen Charakteristika umfassen eine hohe genomische Instabilität des Tumors und ein gutes Ansprechen auf bestimmte Medikamente, wie platinhaltige Chemotherapeutika (Muggia und Safrá 2014). Die höhere Sensitivität von *BRCA*-defizienten Tumorzellen gegenüber platinhaltiger Chemotherapie spiegelt sich beim Ovarialkarzinom in einem besseren Outcome gegenüber Patientinnen mit einem *BRCA*-Wildtyp wider (Bolton et al. 2012; Cass et al. 2003; Foulkes 2006). Insgesamt sind die genetischen Mechanismen, die zu einem „BRCAness“-Phänotyp führen, zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig verstanden (Lord und Ashworth 2016). Bekannt ist jedoch, dass ein „BRCAness“-Phänotyp u.a. auf somatische *BRCA1*- oder *BRCA2*-Mutationen sowie Mutationen (somatische oder Keimbahnmutationen) in Genen, die für weitere Proteine der HR kodieren, zurückzuführen ist. So konnte das Vorliegen einer somatischen *BRCA1*-/*BRCA2*-Mutation sowie einer Mutation in anderen Genen der HR (u.a. *BRIP1*, *ATM*) mit Platinsensitivität und einem besseren Überleben assoziiert werden (Pennington et al. 2014). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass bei etwa 41-50% aller Ovarialkarzinome ein „BRCAness“-Phänotyp vorliegt (Elvin et al. 2017; Moschetta et al. 2016). Der Terminus „BRCAness“ wurde in den vergangenen Jahren nicht einheitlich verwendet (Chalasaní und R. Livingston 2013). Durchgesetzt hat sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt folgende Definition (Lord und Ashworth 2016): „BRCAness exists when an HRR [Homologous recombination repair] defect is present in a tumour in the absence of a germline *BRCA1* or *BRCA2* mutation“.

Die Bestimmung des „BRCAness“-Phänotyp wird insofern als relevant erachtet, als dass klinische Konsequenzen daraus abgeleitet werden könnten: So könnte die Identifizierung eines „BRCAness“-Phänotyps helfen, die Patientinnen auszuwählen, die von einer platinhaltigen Chemotherapie bzw. PARP-Inhibitoren profitieren würden. Zudem könnte „BRCAness“ ein prognostisches Tool (in Hinblick auf das progressionsfreie bzw. Gesamtüberleben) darstellen (Lord und Ashworth 2016).

## 1.3 PARP-Inhibitoren im Kontext eines homologen Rekombinationsdefizits

### 1.3.1 Prinzip der synthetischen Letalität

PARPs (Poly(ADP-ribose)-Polymerasen) wurden erstmals in den 1960er Jahren beschrieben (Chambon et al. 1963). Sie sind eine Familie von Enzymen, die eine wichtige Funktion bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen ausüben (Rigakos und Razis 2012). Eine zentrale Rolle nimmt hierbei das Enzym Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) ein. PARP1 detektiert Einzelstrangbrüche und katalysiert die Bildung von langen verzweigt-kettigen Aminosäuren. Hierdurch werden DNA-Reparaturproteine rekrutiert, welche nun gezielt Einzelstrangbrüche reparieren (Underhill et al. 2011). Eine Inhibition der PARP verursacht dementsprechend über die Hemmung der DNA-Reparatur Einzelstrangbrüche. Die Einzelstrangbrüche werden bei der Replikation verdoppelt. Bei sich replizierenden Zellen kommt es folglich zu Doppelstrangbrüchen (Boulton et al. 1999). In gesunden Zellen wirkt der Mechanismus der HR über die Reparatur der Doppelstrangbrüche dem Zelltod entgegen. Eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer PARP-Inhibition zeigt sich insbesondere bei Zellen, die eine fehlerhafte Funktion von BRCA1 oder BRCA2 (z.B. durch eine pathogene *BRCA1*- oder *BRCA2*-Keimbahnmutation) aufweisen (Bryant et al. 2005; Farmer et al. 2005). Auf zellulärer Ebene kommt es durch die Inhibition der PARP einerseits sowie der *BRCA*-Defizienz andererseits zu zwei zeitgleich beeinträchtigten DNA-Reparaturmechanismen, die sich in genomischer Instabilität, Zellzyklusarrest und Apoptose widerspiegeln. Dieses Prinzip der selektiven Toxizität der PARP-Inhibitoren gegenüber Tumorzellen mit einem HRD wird als synthetische Letalität bezeichnet (Kaelin Jr 2005). Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass nicht nur die Herunterregulation von BRCA1 bzw. BRCA2, sondern auch die weiterer Proteine der HR (z.B. RAD51, CHEK2, ATM) eine hohe Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren bewirkt (McCabe et al. 2006). Mit dem erstmaligen Nachweis, dass Zellen mit bestimmten genetischen Eigenschaften (*BRCA1*- bzw. *BRCA2*-Mutation) sehr gut auf PARP-Inhibitoren ansprechen, wurde der Grundstein für ein neues Konzept der personalisierten Tumorthherapie gelegt (Farmer et al. 2005).

### 1.3.2 Stellenwert beim Ovarialkarzinom

Der Nachweis einer hohen Sensitivität von *BRCA*-defizienten Tumorzellen gegenüber PARP-Inhibitoren in präklinischen Studien (Bryant et al. 2005; Farmer et al. 2005) führte in der Folge zur Durchführung zahlreicher Studien, die diesen Ansatz überprüften (Audeh et al. 2010; Coleman et al. 2015; Fong et al. 2009, 2010; Gelmon et al. 2011; Kaufman et al. 2015; Kristeleit et al. 2016; Matulonis et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit einer Olaparib-Erhaltungstherapie ein statistisch signifikant besseres progressionsfreies Überleben als Patientinnen mit Placebo haben, wobei der Benefit für Patientinnen mit einer *BRCA1/BRCA2*-Keimbahnmutation noch deutlicher ausfiel (J. Ledermann et al. 2014, 2012; Mirza et al. 2016; Pujade-Lauraine et al. 2017). In der Langzeitbetrachtung konnte zudem ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben der Patientinnen mit einer Olaparib-Erhaltungstherapie nachgewiesen werden (J. A. Ledermann et al. 2016). Nach der Zulassung des ersten PARP-Inhibitors Olaparib im Jahr 2014 zur Erhaltungstherapie von *BRCA1*- oder *BRCA2*-positivem, high-grade serösem und platinsensitivem Eierstock-, Peritoneal- oder Eileiterkarzinoms im Rezidiv (European Me-

dicines Agency 2020a), wurde im Jahr 2018 die Zulassung für Patientinnen mit nicht-serösem Ovarialkarzinom und unabhängig vom *BRCA*-Mutationsstatus erweitert (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen 2020).

## 1.4 Identifizierung eines homologen Rekombinationsdefizit

Die Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von „BRCAness“ bzw. eines HRD in Tumorzellen sind insbesondere seit der Einführung der PARP-Inhibitoren von großem klinischen Interesse. Die Komplexität der HR stellt hinsichtlich der Methodik eine besonders große Herausforderung dar. Zum Zeitpunkt dieser Studie existierten zwar mehrere verschiedene Ansätze, es hatte sich jedoch noch keiner dieser Ansätze als Goldstandard für die Detektion eines HRD etabliert (Hoppe et al. 2018). Im Folgenden werden die bisherigen Ansätze mit ihren Vor- und Nachteilen kurz vorgestellt:

### 1.4.1 Aktuelle Ansätze

**Platinsensitivität** Das Bestehen einer Platinsensitivität (in vitro) gilt als indirektes Merkmal eines HRD. So weisen *BRCA1*- oder *BRCA2*-defiziente Zellen typischerweise eine erhöhte Platinsensitivität auf (Gelmon et al. 2011; Tan et al. 2008). Eine Platinsensitivität kann jedoch nicht vollständig mit einer Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren gleichgesetzt werden. So sind u.a. Patientinnen mit einer Platinresistenz beschrieben, die sensitiv gegenüber PARP-Inhibitoren sind (Gelmon et al. 2011; J. Ledermann et al. 2012).

**Sequenzbasierte Methoden** Das Vorliegen einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Keimbahnmutation galt bislang als bester prognostischer Marker in Hinblick auf das Ansprechen auf PARP-Inhibitoren (Mirza et al. 2016; Robson et al. 2017). Sequenzbasierte Assays zur Feststellung einer *BRCA*-Keimbahnmutation waren Bestandteile mehrere klinischer Studien zu PARP-Inhibitoren (Fong et al. 2009; Tutt et al. 2010). Gegenwärtig existieren keine bewährten sequenzbasierten Assays zur Identifizierung eines HRD aufgrund einer Keimbahnmutation in anderen Genen der HR (Hoppe et al. 2018). Mehrere Studien zu PARP-Inhibitoren konnten zeigen, dass die Identifikation somatischer Mutationen in *BRCA1* oder *BRCA2* sowie weiteren Genen der HR eine Aussage über die potentielle Sensitivität der Tumoren auf PARP-Inhibitoren erlaubt (Mateo et al. 2015; Swisher et al. 2017). Nachteil beider sequenzbasierter Ansätze ist die Herausforderung der Interpretation von Varianten, das Nichterfassen von epigenetischen Modifikationen (z.B. *BRCA1*-Promotermethylierung) und bei Mutationssuche im Tumor die genetische Heterogenität innerhalb eines Tumors (Cunha Colombo Bonadio et al. 2018; Rigakos und Razis 2012).

**Assays der genomischen Instabilität** Ein weiterer Ansatz basiert auf der als Folge des HR-Defizits entstandenen genomischen Instabilität. Sich widerspiegelnde charakteristische genomischen Veränderungen (sog. genomische Narbe) sind eine hohe Anzahl an LOH, telomerische allelische Imbalancen (telomeric allelic imbalance (TAI)) oder ausgedehnte Transitionen (large scale state transitions (LST)) (Geisler et al. 2002; Skytte et al. 2011). Diese genomischen Alterationen bilden die Grundlage für verschiedene HRD-Scores, die verschiedene Methoden miteinander

kombinieren (NGS, aCGH, SNP-Array) und in unterschiedlichen Studien bereits mit einem verbesserten Ansprechen auf PARP-Inhibitoren assoziiert wurden (Mirza et al. 2016; Swisher et al. 2017). Vorteil eines solchen funktionellen Ansatzes ist die Beurteilung eines HRD unabhängig von den zu Grunde liegenden genetischen und epigenetischen Veränderungen. (Swisher et al. 2017). Allerdings wird keine Aussage über die ursächlichen genetischen Veränderungen getroffen, was mitunter insbesondere im humangenetischen Beratungskontext von großer Relevanz wäre. Zusammenfassend hat bislang keiner der genannten Ansätze Einzug in die klinische Routinediagnostik gefunden (Cunha Colombo Bonadio et al. 2018).

**Transkriptionsprofile** Sogenannte Genexpressionsprofile stellen den gegenwärtigen Transkriptionszustand eines Tumors dar. Auf Grundlage eines spezifischen Genexpressionsprofils konnte in Studien bereits ein „BRCAness“-Tumorprofil identifiziert und eine Platinsensitivität vorhergesagt werden (Konstantinopoulos et al. 2010; Severson et al. 2017; Vollebergh et al. 2010). Die bisherigen Genexpressionsanalysen wurden jedoch bislang nicht in Zusammenhang mit dem Ansprechen auf PARP-Inhibitoren evaluiert (Cunha Colombo Bonadio et al. 2018).

#### 1.4.2 MLPA BRCA1ness Test

Beim Mammakarzinom existiert mit dem MLPA BRCA1ness Test ein weiterer diagnostischer Ansatz (Joose et al. 2009; E. Lips et al. 2013; E. H. Lips et al. 2011) zur Identifizierung von „BRCAness“ bzw. eines HRD. Diese Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ist ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit, sodass im Folgenden die Methode im Detail beschrieben wird.

Mammakarzinome von Patientinnen mit einer pathogenen *BRCA1*-Keimbahnmutation zeigen ein charakteristisches Muster von Deletionen und Amplifikationen (Wessels et al. 2002). Auf Grundlage einer Array-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH), die dieses genomische Muster detektiert, wurde die SALSA MLPA Probemischung P376-B3 BRCA1ness entwickelt (Joose et al. 2009). Die Probemischung deckt mit 34 Sonden die in den vorherigen Studien identifizierten Deletionen und Amplifikationen im *BRCA1*-ähnlichen Tumorprofil in elf chromosomalen Regionen ab (Joose et al. 2009; E. H. Lips et al. 2011). Bestandteile der Probemischung sind zudem jeweils zwei Sonden, die *BRCA1* und *BRCA2* erfassen. 10 Referenzsonden decken sechs verschiedene autosomal chromosomale Regionen, die im Brustkrebsgenom verhältnismäßig stumm sind, ab. Zur internen Qualitätskontrolle dienen darüber hinaus neun Kontrollfragmente. Die Probemischung identifiziert sowohl sporadische Mammakarzinome mit *BRCA1*-ähnlichem Profil, als auch Mammakarzinome von Patientinnen mit einer pathogenen *BRCA1*-Keimbahnmutation (E. H. Lips et al. 2011). Beim triple-negativen Brustkrebs lässt sich in etwa einem Drittel der Fälle mithilfe des MLPA BRCA1ness Test ein *BRCA1*-ähnliches Tumorprofil identifizieren, wobei dieses mit einem guten Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert ist (Vollebergh et al. 2010). Eine Übersicht der Zusammensetzung der Probemischung zeigt Tabelle A.35 im Anhang.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das häufige Auftreten einer Platinresistenz im Therapieverlauf und das schlechte progressionsfreie Überleben sowie Gesamtüberleben stellen nach wie vor große Herausforderungen bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms dar. Spätestens mit dem Einzug der PARP-Inhibitoren in die Primärtherapie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom gewinnt die Identifizierung eines individuellen Tumorprofils für die Therapiewahl und Prognoseeinschätzung an Bedeutung. In diesem Zusammenhang ist die Feststellung eines „BRCAness“ Phänotyps bzw. eines HRD von zunehmendem Interesse. Für die Identifizierung eines HRD beim Ovarialkarzinom existieren bereits erste methodische Ansätze. In dieser Arbeit sollte erstmals mithilfe des ursprünglich für das Mammakarzinom konzipierten MLPA BRCA1ness Test das Vorliegen eines *BRCA1*-ähnlichen bzw. nicht-*BRCA1*-ähnlichen Tumorprofils in einer Kohorte von 49 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom untersucht werden. Die Bestimmung der mRNA-Expressionswerte von sieben ausgewählten Genen der HR (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*) in Tumorgewebe sollte den zweiten Teil der Tumorcharakterisierung darstellen. Die mRNA-Expressionen wurden hierzu in niedrig/hoch dichotomisiert. Zur Evaluierung, ob der Verlust eines oder mehrerer DNA-Reparaturgene mit dem „BRCAness“-Phänotyp assoziiert ist, sollten u.a. diese Ergebnisse mit den Ergebnissen des BRCA1ness Tests verglichen werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob 1.) das in der MLPA bestimmte Tumorprofil und die mRNA-Expressionswerte mit einem besseren progressionsfreien Überleben/Gesamtüberleben assoziiert sind und ob 2.) das in der MLPA bestimmte Tumorprofil und die mRNA-Expressionswerte neben etablierten klinischen Prognosefaktoren (z.B. makroskopischer Tumorrest) in der multivariablen Analyse einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellen. Die statistischen Analysen sollten Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurven, lineare Regressionsanalysen (Hazard Ratio) und abschließend multivariable Cox-Regressionsanalysen beinhalten. Durch detaillierte Charakterisierung der Patientinnenkohorte lagen zudem eine Vielzahl von klinisch-pathologischen Parametern vor, die in Hinblick auf das progressionsfreie Überleben/Gesamtüberleben statistisch ausgewertet werden sollten. Alle Ergebnisse dieser Arbeit wurden abschließend im Kontext der aktuellen Literatur bewertet und kritisch diskutiert.

Zusammenfassend beschäftigt sich diese Arbeit mit folgenden Kernfragen:

1. **Wie stellt sich das mithilfe des MLPA BRCA1ness Test bestimmten Tumorprofil dar und ist ein *BRCA1*-ähnliches Tumorprofil mit einem besserem Gesamtüberleben bzw. progressionsfreien Überlebens assoziiert?**
2. **Wie stellt sich die mRNA-Expression von ausgewählten DNA-Reparaturgenen dar und sind herunterregulierte Gene mit einem besserem Gesamtüberleben bzw. progressionsfreien Überlebens assoziiert?**

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patientinnenkollektiv

Das Patientinnenkollektiv umfasste 49 Patientinnen mit der Diagnose eines Ovarialkarzinoms. Die an diesem Patientinnenkollektiv durchgeführten Analysen fanden im Rahmen eines wissenschaftlichen Projektes statt, das durch das lokale Ethikkomitee des Klinikums rechts der Isar der TUM genehmigt wurde. Der mediane Beobachtungszeitraum (Datum der Operation bis Zensusdatum) betrug 28,1 Monate (IQA: 35,4), wobei das Zensusdatum das Ende des Beobachtungszeitraumes (Versterben der Patientin bzw. letztes Follow-up) angibt. Insgesamt verstarben 33 (67,3%) der 49 Patientinnen bis zum Zensusdatum. Das Alter der Patientinnen wurde am Tag der Operation bestimmt. Das mittlere Patientinnenalter betrug  $59,7 \pm 11,8$  (SD) Jahre.

Das in dieser Arbeit untersuchte Tumorgewebe wurde den Patientinnen in den Jahren 2004 bis 2011 an der Frauenklinik der TU München operativ entfernt. Anschließend wurde es bei  $-80^\circ\text{C}$  in RNAlater® (siehe Tabelle 4) aufbewahrt. Bei 43 Patientinnen stammte es aus dem primären Ovarialkarzinom und bei sechs Patientinnen aus sogenannten Netzmetastasen. 38 Tumore (77,6%) und somit die Mehrzahl der Karzinome wurden histologisch als serös klassifiziert. Die restlichen Tumore verteilten sich unter histologischen Gesichtspunkten auf endometrioid (12,2%), muzinös (4,1%), Karzinosarkome (4,1%) und klarzellig (2,0%). 43 Tumore (87,8%) wurden als High Grade und vier Tumore (8,2%) als Low Grade eingeordnet. Zwei Tumore (4,1%) waren sogenannte Ovarialkarzinome vom Borderlinetyp. Der Großteil der Patientinnen (89,8%) befand sich zum Zeitpunkt der Operation im FIGO Stadium III oder IV. Auf Grundlage des makroskopischen Tumorrests nach chirurgischem Debulking wurden die Patientinnen in drei Gruppen eingeteilt: Patientinnen ohne makroskopischen Tumorrest (40,8%), mit einem makroskopischen Tumorrest  $>0$  und  $<1\text{cm}$  (30,6%) und einem makroskopischen Tumorrest von  $\geq 1\text{cm}$  (26,5%). Bei einer Patientin (2,0%) lagen keine Informationen zu dem makroskopischen Tumorrest nach chirurgischem Debulking vor. 39 Patientinnen (79,6%) erhielten als adjuvante Chemotherapie eine Kombinationstherapie aus Paclitaxel und Carboplatin. Zwei Patientinnen (4,1%) wurden mit einem anderen Chemotherapieschema behandelt und eine Patientin (2,0%) bekam keine Chemotherapie. Bei sieben Patientinnen (14,3%) fehlten die Informationen bzgl. einer adjuvanten Chemotherapie.

Es lagen keine Informationen darüber vor, ob die Patientinnen auf Keimbahnmutationen in *BRCA1*, *BRCA2* bzw. weiteren Kerngenen getestet wurden. Patientinnen, bei denen Informationen zur Eigen- bzw. Familienanamnese vorlag, wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Eine positive Familienanamnese lag beim Erfüllen folgender Kriterien vor (Harter et al. 2017):

- Mammakarzinom in der eigenen medizinischen Vorgeschichte und/oder
- Verwandte mit Mammakarzinom und/oder Ovarialkarzinom

Insgesamt zeigten 25 Patientinnen (51,0%) eine positive und 16 Patientinnen (32,7%) eine negative Familienanamnese. Bei acht Patientinnen (16,3%) war die Eigen- bzw. Familienanamne-

se unbekannt. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über das Patientinnenkollektiv einschließlich der klinisch-pathologischen Parameter.

Tabelle 1: Patientinnenkollektiv Ovarialkarzinom, n=49

Variable		Anzahl	%
Alter	MW +SD	59,7 ± 11,8 Jahre	
	Spannweite	51 Jahre (26-77 Jahre)	
	Gruppierung	<60 Jahre	18
≥60 Jahre		31	63,3
Histologischer Typ	serös	38	77,6
	endometrioid	6	12,2
	muzinös	2	4,1
	Karzinoid	2	4,1
	klarzellig	1	2,0
Lymphknotenstatus	N0	19	38,8
	N1	20	40,8
	NX	10	20,4
Fernmetastasen	M0	18	36,7
	M1	7	14,3
	MX	24	49,0
FIGO Stadium	I	1	2,0
	II	4	8,1
	III	36	73,4
	IV	8	16,3
Tod bis Zensusdatum	ja	33	67,3
	nein	16	32,7
Grading	High Grade <sup>1</sup>	43	87,8
	Low Grade <sup>2</sup>	4	8,2
	GB <sup>3</sup>	2	4,1
Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking	≤0cm	20	40,8
	>0 und <1cm	15	30,6
	≥1cm	13	26,5
	unbekannt	1	2,0
Aszitesvolumen	≥500ml	21	42,9
	<500ml	19	38,8
	unbekannt	9	18,4
Adjuvante Chemotherapie	Paclitaxel + Carboplatin	39	79,6
	unbekannt	7	14,3
	andere	2	4,1
	keine Chemotherapie	1	2,0
Herkunft Tumorgewebe	Primärtumor	43	87,8
	Netzmetastase	6	12,2
Z.n. Mammakarzinom	ja	13	26,5
	nein	27	55,1
	unbekannt	9	18,4
Verwandter mit Mammakarzinom und/oder Ovarialkarzinom	ja	16	32,7
	nein	7	14,3
	unbekannt	26	53,1
Familienanamnese <sup>4</sup>	positiv	25	51,0
	negativ	16	32,7
	unbekannt	8	16,3

<sup>1</sup>High Grade: Grading 2-4, <sup>2</sup>Low Grade: Grading 1, <sup>3</sup>GB: Borderline Tumor, <sup>4</sup>Familienanamnese: Informationen über Keimbahnmutationsstörungen lagen nicht vor. Eine positive Familienanamnese war definiert als ein Mammakarzinom in der eigenen medizinischen Historie und/oder ein Verwandter mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinom (Harter et al. 2017)

## Blutproben als Kontrollen bei der MLPA

Zum Zweck der Normalisierung der Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) wurden venöse Vollblutproben von drei gesunden Probanden entnommen und diese in EDTA-Blutröhrchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Eine Übersicht der Probanden zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Kontrollproben

Probe	Alter	Geschlecht
Kontrollprobe 1	24	weiblich
Kontrollprobe 2	24	weiblich
Kontrollprobe 3	23	männlich

## 3.2 Material

### 3.2.1 Kits und Assays

In der folgenden Tabelle (Tabelle 3) sind die für die Laborexperimente verwendeten Kits und Assays aufgelistet.

Tabelle 3: Kits und Assays

Kit	Hersteller (Firmensitz, Land)
SALSA® MLPA® Probemix P376-B3 BRCA1ness	MRC-Holland MLPA® (Amsterdam, NL)
QIAamp® DNA Mini Kit (50)	Qiagen® (Hilden, DE)
RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen® (Hilden, DE)
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen® (Hilden, DE)
First-Strand cDNA Synthesis Kit	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay ALAS1 Hs00167441-m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay ATM Hs01112355-g1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRCA1 Hs01556191-m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRCA1 Hs01556193-m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRCA2 Hs00609073-m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRIP1 Hs00230743-m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay CHEK2 Hs00200485-m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay RAD51C Hs00365220-m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay RAD51D Hs00172529-m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

### 3.2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

In den nachfolgenden Tabellen sind die für die Laborexperimente verwendeten Chemikalien (Tabelle 4), Lösungen und Puffer (Tabelle 5) aufgelistet.

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller (Firmensitz, Land)
Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, DE)
Borsäure	Merck (Darmstadt, DE)
Chloroform	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Desoxyribonukleinsäure (DNA) Molekulargewichtsmarker	Roche (Basel, CH)
EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol (70%)	Staub und Co. - Silbermann GmbH (Nürnberg, DE)
Ethanol (96%)	Staub und Co. - Silbermann GmbH (Nürnberg, DE)
Ethanol (absolut)	Merck (Darmstadt, DE)
Ethidiumbromid Lösung 1%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Ficoll® PM 400	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
GeneScan™ 500 ROX™ Größenstandard	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HCL (37%)	Merck (Darmstadt, DE)
HiDi Formamid	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Orange G	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
RNAlater® RNA Stabilization Reagent	Qiagen® (Hilden, DE)
TRIS	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
<b>10 X TBE Puffer</b>	0,84M Tris 0,89M Borat 0,02M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
<b>1 X TE Puffer (pH 8,2)</b>	10mM Tris 0,1mM EDTA
<b>1 X TE Puffer (pH 8,0)</b>	10mM Tris 1mM EDTA
<b>Agarosegel</b>	1,5% Agarose TBE Puffer 0,0033% Ethidiumbromid
<b>Genmaßstab</b>	75% TE Puffer 20% 2 X Ladepuffer 5% DNA Molekulargewichtsmarker V (8-587 bp)
<b>Ladepuffer</b>	TE Puffer 25% Ficoll Orange G

### 3.2.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Softwares

In den folgenden Tabellen sind die für die Experimente verwendeten Verbrauchsmaterialien (Tabelle 6), Geräte (Tabelle 7) und Softwares (Tabelle 8) abgebildet.

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller (Firmensitz, Land)
Abdichtungsfolie LightCycler® 480II Sealing Foil	Roche Life Science (Penzberg, DE)
Einwegpinzette steril Polystyrol-Pinzette	J.Söllner AG (Deggendorf, DE)
Einwegskalpell steril Nummer 10	Feather (Osaka, JP)
Filterplatte MultiScreen PCR96 Filter Plate	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
Filterspitzen 10, 20, 200, 1000 $\mu$ l	BRAND (Wertheim, DE)
Handschuhe Sempercare® premium	Sempercare (Wien, Österreich)
Handschuhe Vasco® Nitril light	B. Braun Vet Care GmbH (Tuttlingen, DE)
Kyroröhrchen Nalgene® 1,5ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mahlkugeln aus rostfreiem Stahl für Schwingmühlen (d=9 mm)	Retsch (Haan, DE)
Mikroröhrchen 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Mikroröhrchen mit Schraubverschluss 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Mikrotitrierplatte Light Cycler® 480II 96 multiwell plate	Roche Life Science (Penzberg, DE)
Mikrotitrierplatte Corning® 96 Well	Corning Inc. (Corning, USA)
Mundschutz Sentinex Lite EL	Lohmann und Raucher (Vienna, AT)
optische 96 Well Filterplatte PM 3100	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pasteurpipette	NeoLab (Heidelberg, DE)
Petrischalen steril, d=10cm	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AT)
Präzisions-Dispenser-Tips Brand®	Brand GmbH (Wertheim, DE)
Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AT)
Röhrchen 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
selbstklebende Abdichtungsfolie Typ AB-1170	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
S-Monovette EDTA K 2,7ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Spitzen 10, 20, 200, 1000 $\mu$ l	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Spitzen elektronischer Multistepper 1,25 ml für HandyStep®	BRAND (Wertheim, DE)
Verschlussfolie Microseal® A'film	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, DE)

Tabelle 7: Geräte

Kit	Hersteller (Firmensitz, Land)
ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Autoklav Varioklav Classic 400E	H+P Labor Technik AG (Oberschleißheim, DE)
elektronischer Multistepper HandyStep®	BRAND GMBH + CO KG (Wertheim, DE)
Heizblock HBT-1-131	HLC BioTech (Bovenden, DE)
Mikro-Dismembrator S	Sartorius (Göttingen, DE)
Mikrowelle R-937	Sharp (Osaka, JP)
Molecular Imager® ChemiDoc TM XRS	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Multichannelpipette Transferpette® S -8 (10 $\mu$ l)	BRAND GMBH + CO KG (Wertheim, DE)
pH-Meter CG 842	Schott (Mainz, DE)
Pipetten Pipet-Lite (2-, 10-, 200-, 1000 $\mu$ l)	Ranin by Mettler-Toledo, LLC (Columbus, USA)
Pipettierhilfe Stripettor™ Plus	Corning (Corning, USA)
Reagenzglasschüttler Vortex® Mixer 7-2020	neoLab Migge (Heidelberg, DE)
Spektrophotometer NanoDrop™ ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)
Thermozykler MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	BioRad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Trockenofen	Memmert (Schwabach, DE)
Waage Typ BA 110 S	Sartorius (Göttingen, DE)
Waage Typ EW1500-2M	Kern und Sohn GmbH (Balingen, DE)
Wasserbad Typ 3042	Köttermann Labor Technik (Uetze/Hänigsen, DE)
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen, DE)
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus (Hanau, DE)
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich (Tuttlingen, DE)

Tabelle 8: Software

Software	Hersteller (Firmensitz, Land)
ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
GeneMapper v4.0	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
IBM SPSS Statistics 24	IBM (Armonk, USA)
Image Lab 5.1	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
ND-1000 V3.1.2	PEGLAP (Erlangen, Deutschland)
R version 3.3.3 (2017-03-06) – „Another Canoe“	The R Foundation (R)

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 DNA-Isolierung

**Tumorgewebe** Die DNA-Extraktion aus Ovarialkarzinomgewebe erfolgte mithilfe des QIAamp® DNA Mini Kits (50) der Firma Qiagen®, Hilden. Eine Bestimmung des Tumorzellgehalts wurde vor Beginn der DNA-Isolierung nicht durchgeführt. Die einzelnen Schritte wurden anhand einer Anleitung aus dem QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (*QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* 2012) (Abschnitt: „DNA Purification from Tissues“) durchgeführt.

Es wurden jeweils 25mg des Tumorgewebes verwendet. Um die Lysezeit zu verringern, wurde das Tumorgewebe im ersten Schritt mithilfe einer Einmalpipette und eines Einmalskalpells in einer Petrischale in kleine Stücke zerkleinert und in ein 1,5ml Mikrozentrifugengefäß platziert. Nach Hinzugabe von 180µl ATL Puffer und 20µl Proteinase K (im Kit enthalten) und der darauffolgenden Durchmischung auf einem Vortexmischer fand über Nacht die Inkubation und Auflösung des Tumorgewebes bei 56 °C in einem Schüttelwasserbad statt. Nach mehreren Waschschritten über eine QIAamp® Spinsäule am darauffolgenden Tag befand sich im Durchfluss die in 400µl AE Puffer (im Kit enthalten) gelöste DNA.

Die Konzentration der DNA wurde auf dem NanoDrop™ bei einer Absorption von 260nm ( $A_{260}$ ) bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde anhand der Ratio  $A_{260}/A_{280}$ , die hierbei Werte zwischen 1,7 - 1,9 annehmen sollte, bestätigt. Zuletzt wurde die isolierte DNA bei -20 °C aufbewahrt.

**Blut** Die Aufreinigung der DNA aus Blut wurde analog zur Aufreinigung aus Ovarialkarzinomgewebe mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (50) der Firma Qiagen®, Hilden, durchgeführt. Die Abläufe folgten der Anleitung des QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (*QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* 2012) (Abschnitt: „DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)“).

200µl venöses Vollblut wurden zusammen mit 200µl AL Puffer und 20µl Proteinase K in ein 1.5ml Mikrozentrifugengefäß pipettiert und nach kurzer Durchschmischung auf dem Vortexmischer zehn Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten auf der QIAamp® Spinsäule und wiederholtem Zentrifugieren verblieb im Durchfluss die in 200µl AE Puffer gelöste DNA, die bei -20 °C gelagert wurde.

### 3.3.2 MLPA

**Prinzip der MLPA** Die MLPA wurde erstmals 2002 beschrieben (Schouten et al. 2002) und ermöglicht die Gendosisbestimmung von bis zu 40 unterschiedlichen, zuvor definierten Abschnitten im Genom (=Target) in einem einzigen Reaktionsansatz. Die Erkennung bestimmter Abschnitte im Genom wird ermöglicht durch Sondenpaare, die Bestandteil jeder MLPA Probemischung sind. Im Folgenden werden Aufbau der Sondenpaare und Funktionsweise der MLPA genauer erläutert. Eine MLPA Sonde besteht jeweils aus zwei - einem kurzen und einem langen - Oligonukleotid. Das kurze Oligonukleotid enthält am 3'-Ende eine Target-spezifische Sequenz (21-30 Nukleotide (nt)), welche einen Teil der Bindungsstelle an die Zielsequenz (=Target) darstellt. Am 5'-Ende befindet sich eine Sequenz X (19 nt), welche komplementär zum später verwendeten, mit Fluoreszenzstoff markierten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Primer x ist. Das lange Oligonukleotid der Sondenpaare beinhaltet am 3'-Ende eine Sequenz Y (36 nt), die komplementär zum nicht markierten PCR Primer y ist. Am 5'-Ende befindet sich der andere Teil der Bindungsstelle, eine 25-43 nt große Target-spezifische Sequenz. Zusätzlich hat das lange Oligonukleotid zwischen dem 3' und 5' Ende eine für das Sondenpaar spezifische Füllsequenz mit einer Größe von 190 bis 370 nt, die später eine Auftrennung nach der Länge durch Gelelektrophorese bewirkt (Abbildung 2).



Abbildung 2: Aufbau eines MLPA Sondenpaares (modifiziert nach Schouten et al. 2002)

Nach Trennung der DNA Doppelstränge durch Denaturierung folgt die Hybridisierung der Target-spezifischen Sequenzen der beiden Oligonukleotiden an die Zielsequenz (=Target) im Exon. Dabei lagern sich die korrespondierenden Sonden unmittelbar aneinander an (Abbildung 3) und werden durch eine Ligase enzymatisch miteinander verbunden (Abbildung 4).

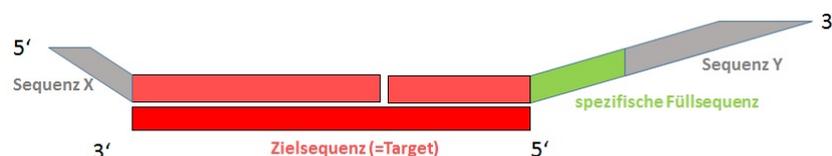


Abbildung 3: Hybridisierung der Target-spezifischen Sonden an die Zielsequenz (modifiziert nach Schouten et al. 2002)

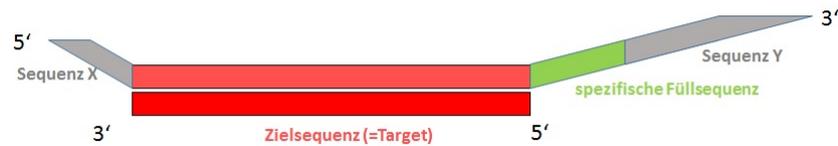


Abbildung 4: Ligation des Sondenpaares (modifiziert nach Schouten et al. 2002)

In der sich anschließenden PCR findet die Amplifikation der Target-spezifischen Sequenz und der Füllsequenz statt (Abbildung 5). Die Sequenzen X und Y, die an jeder Sonde identisch sind, stellen dabei die Bindungsstellen für den Vorwärtsprimer x und den Rückwärtsprimer y dar. Nicht gebundene und somit nicht ligierte Sonden haben nur eine Primerbindungsstelle und können folglich nicht amplifiziert werden.

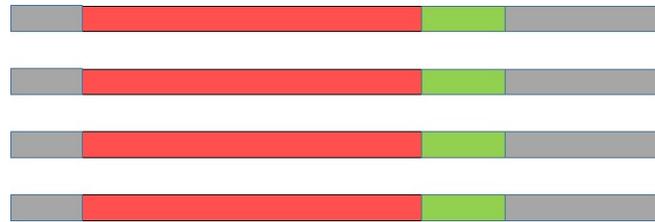


Abbildung 5: entstandene PCR Produkte (modifiziert nach Schouten et al. 2002)

Die Größen der entstanden Amplifikationsprodukte (130 bis 480 Basenpaaren) werden durch die spezifische Füllsequenz der Sonden definiert und abschließend durch Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Der mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Vorwärtsprimer wird dabei durch Laser angeregt.

Die entstandenen Peak-Höhen bzw. Peak-Flächen werden auf die Gesamtamplifikationsmenge normalisiert. Im Vergleich mit unauffälligen Kontrollen lassen sich quantitative Dosisunterschiede durch Erhöhung oder Erniedrigung der Peakhöhen bzw. Peakflächen erkennen.

**Durchführung** Die MLPA wurde mit der SALSA® MLPA® Probemischung P376-B3 BR-CA1ness von MRC-Holland MLPA® anhand einer Anleitung von MRC-Holland MLPA® (MRC Holland 2014) durchgeführt. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über den Ablauf der MLPA.

Tabelle 9: Thermozykler Programm MLPA

<b>DNA-Denaturierung</b>	1.	98 °C	5 Minuten
	2.	25 °C	Pause
<b>Hybridisierung</b>	3.	95 °C	1 Minute
	4.	60 °C	Pause
<b>Ligation</b>	5.	54 °C	Pause
	6.	54 °C	15 Minuten
	7.	98 °C	5 Minuten
	8.	20 °C	Pause
<b>PCR Reaktion</b>	9.	35 Zyklen	95 °C 30 Sekunden 60 °C 30 Sekunden 60 °C 60 Sekunden
	10.	72 °C	20 Minuten
	11.	15 °C	Pause

Es wurde je Patientinnenprobe eine DNA Gesamtmenge von 100ng gelöst in 5µl Volumen TE Puffer (pH 8.2) verwendet. Zur späteren Normalisierung wurden in jedem MLPA Durchgang DNA Proben aus Blut von drei gesunden Kontrollprobanden mitgeführt.

Zunächst wurden die DNA Doppelstränge durch DNA Denaturierung bei 98 °C voneinander getrennt. Nach Herstellung einer Hybridisierung Mastermischung (Tabelle 10) und anschließendem Mischen auf dem Vortex® wurde jeder Probe 3µl der Mastermischung zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Nach einminütiger Inkubation auf dem Thermozykler bei 95 °C folgte bei 60 °C die Hybridisierung der MLPA Sonden an die Zielsequenzen im Genom. Dieser Schritt dauerte 16 bis 20 Stunden.

Hiernach wurde die Ligase-65 Mastermischung (Tabelle 11) vorbereitet. Jeweils 32µl der Ligase-65 Mastermischung wurden zu den Proben, die währenddessen im Thermozykler standen, hinzugegeben. Das Ligase-65 Enzym ist bis 60 °C hitzestabil, sodass die Ligation der korrespondierenden und an die Zielsequenz hybridisierten Sonden bei 54 °C auf dem Thermozykler erfolgte. Im Unterschied zu anderen thermophilen Ligasen wird das Ligase-65 Enzym bei sehr hohen Temperaturen zerstört (Schouten et al. 2002). Diese Eigenschaft nutzte man im nächsten Schritt, der fünfminütigen Inkubation bei 98 °C im Thermozykler, um das Enzym zu deaktivieren.

Anschließend wurde die Polymerase Mastermischung (Tabelle 12) hergestellt. Die SALSA PCR Primer Mischung enthält Desoxynucleosidtriphosphate, den mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Vorwärtsprimer x und den unmarkierten Rückwärtsprimer y. Nachdem die SALSA PCR Mastermischung durch Auf- und Abpipettieren gut durchgemischt wurde, wurden jeweils 10µl zu jeder Probe hinzu pipettiert. Die PCR wurde in 35 Zyklen durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Inkubation bei 72 °C.

Tabelle 10: Hybridisierung  
Mastermischung

MLPA Puffer	1,5 µl
Probemischung	1,5 µl

Tabelle 11: Ligase-65 Mastermischung

dH <sub>2</sub> O	25,0 µl
Ligase Puffer A	3,0 µl
Ligase Puffer B	3,0 µl
Ligase-65 Enzym	1,0 µl

Tabelle 12: Polymerase Mastermischung

dH <sub>2</sub> O	7,5 $\mu$ l
SALSA PCR Primer Mischung	2,0 $\mu$ l
SALSA Polymerase	0,5 $\mu$ l

Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurden 0,7 $\mu$ l des entstandenen PCR Produkts mit 0,3 $\mu$ l ROX und 9 $\mu$ l Hi-Di Formamid zusammengefügt (Tabelle 13), im Thermozykler vier Minuten auf 86 °C erhitzt und zuletzt zwei Minuten bei 4 °C gekühlt. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde der ABI-Prism 3130xl Genetic Analyzer und die ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0 eingesetzt. Die verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 13: Mischung Elektrophorese

PCR Produkt	0,7 $\mu$ l
ROX	0,3 $\mu$ l
Hi-Di Formamid	9,0 $\mu$ l

Tabelle 14: Einstellungen ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0

Laufmodul:	FragmentAnalysis
Kapillartemperatur:	50 °C
Denaturierung:	90 °C für 120 sec
Injektionsspannung:	1,6 kV
Injektionszeit:	30 sec
Laufzeit:	60 min
Laufspannung:	4,8 kV
Primer Farbstoff:	FAM

Die Ergebnisse der MLPA wurden durch das Programm GeneMapper v4.0 grafisch dargestellt (Einstellungen Tabelle 15).

Tabelle 15: Einstellungen GeneMapper v4.0

Analysis Method:	AFLP Default
Size Standard:	GS500

### 3.3.3 RNA-Isolierung

Die Ribonukleinsäure (RNA) Extraktion aus Tumorgewebe erfolgte mit dem RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (50) der Firma Qiagen®, Hilden. Die einzelnen Schritte wurden anhand einer Anleitung aus dem RNeasy® Lipid Tissue Handbook (*RNeasy® Lipid Tissue Handbook* 2009) ausgeführt.

60–80mg des Tumorgewebes wurden zu Beginn zusammen mit einer Mahlkugel in ein Kryoröh-

chen überführt, in Flüssigstickstoff gekühlt und auf dem Mikro-Dismembrator zerrüttelt und dabei homogenisiert (Einstellungen: 3.000 Umdrehungen, 2 x 20sec). Anschließend wurde an Punkt 4. des Protokolls wie dort beschrieben fortgefahren. Der optionale Schritt des DNase Verdaues wurde hierbei durchgeführt. Abschließend wurde die isolierte RNA in 30µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C aufbewahrt.

Mithilfe des NanoDrops<sup>TM</sup> wurde die Konzentration der RNA bei 260 nm ( $A_{260}$ ) bestimmt. Um die Reinheit der isolierten RNA zu untersuchen, wurde die Absorption bei 280nm, 260nm und 230nm gemessen. Der Wert des  $A_{260}/A_{230}$  Quotienten sollte um 2, der Wert des  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1.8 und 2.1 liegen (*RNeasy® Lipid Tissue Handbook* 2009).

Darüber hinaus wurde zur Qualitätskontrolle nach jeder RNA Isolierung eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die gelöste RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 200ng/µl verdünnt. 1µl der verdünnten RNA wurde mit 1µl des Ladepuffers (Tabelle 5) vermischt und ebenso wie 10µl des Genmaßstabes (Tabelle 5) in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Durchführung fand bei einer Spannung von 110 Volt und mit einer Dauer von 45 Minuten statt. Die Gelelektrophorese wurde mit dem Molecular Imager<sup>®</sup> ChemiDoc TM XRS und der dazugehörigen Software Image Lab 5.1 ausgewertet.

Im Gegensatz zu messenger RNA (mRNA), die sich aufgrund ihres geringen Anteils an der Gesamt RNA Menge nicht detektieren lässt, stellt sich ribosomale RNA (rRNA) in der Gelelektrophorese als zwei Banden (18S und 28S) dar (Abbildung 6). Deutliche 18 S (5kb) und 28 S (2kb) Banden sind ein Indikator für intakte RNA (Thermo Fisher Scientific 2020).

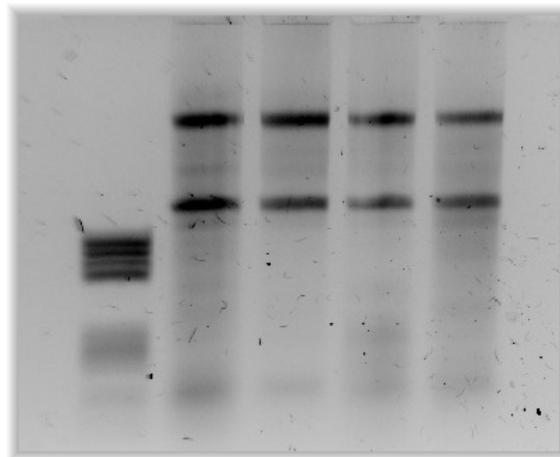


Abbildung 6: Darstellung der rRNA als 18S und 28S Banden in der Gelelektrophorese

### 3.3.4 cDNA Synthese

Mithilfe der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA Polymerase, entsteht während der Reaktion aus RNA die komplementäre DNA (cDNA), die wiederum die Messung von mRNA-Expression (siehe 3.3.5) ermöglicht.

Die cDNA Synthese wurde mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit von GE Healthcare (Little Chalfont, UK) durchgeführt. Hierbei wurde der große Reaktionsansatz (Tabelle 16) und die „random“ Primer pd(N)<sub>6</sub> gewählt.

Zu Beginn wurden 2,0 - 2,5µg RNA in 20µl RNase-freiem Wasser gelöst, zehn Minuten bei 65 °C

inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Währenddessen wurden die Primer, die DTT Lösung und die Reaktionsmischung „erster Strang“ in ein Mikrozentrifugengefäß pipettiert (Tabelle 16).

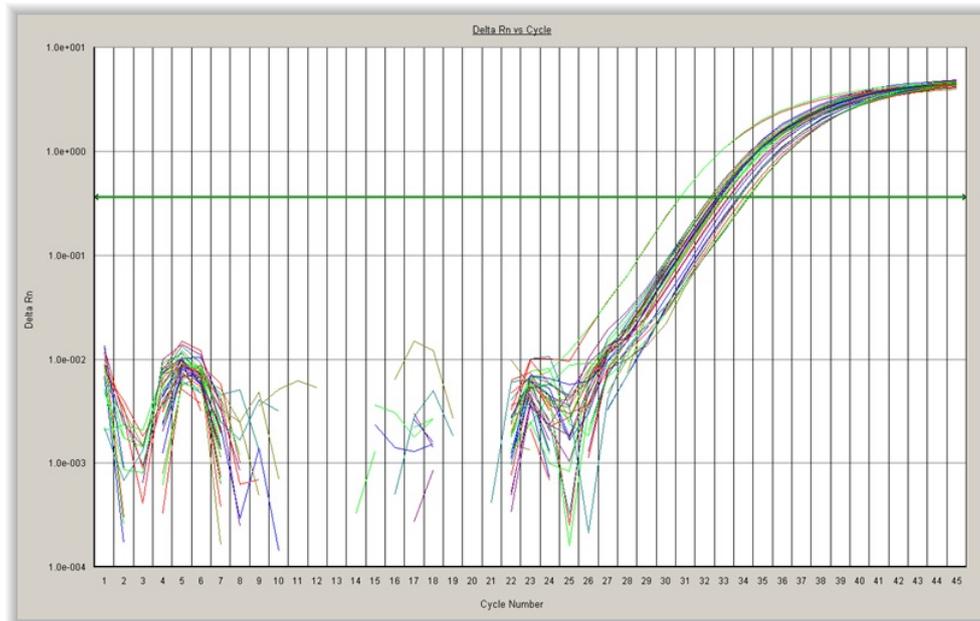
Tabelle 16: Volumina der Komponenten in der ersten-Strang Reaktion

Reaktionsmischung „erster Strang“	11 $\mu$ l
Primer	1 $\mu$ l
DTT Lösung	1 $\mu$ l
RNA	20 $\mu$ l

Nach Hinzufügen der Hitze-denaturierten RNA wurden die Komponenten der ersten-Strang Reaktion durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und 60 Minuten bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Die Konzentration der in 32 $\mu$ l gelösten cDNA wurde auf dem NanoDrop™ gemessen und die cDNA abschließend bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.3.5 quantitative Echtzeit-PCR

**Hintergrund** Die quantitative Echtzeit-PCR („real-time PCR“) ist ein semiquantitatives Verfahren, das über die Bestimmung von mRNA Menge Rückschlüsse auf die mRNA-Expression zulässt (Giulietti et al. 2001). Die Methode umfasst die Amplifikation von DNA auf Grundlage mehrerer PCR-Zyklen und darüber hinaus die Quantifizierung der entstandenen PCR Produkte. Die Akkumulation von PCR Produkten geht einher mit einer Zunahme von Fluoreszenz, die detektiert wird und Rückschlüsse auf die quantifizierte DNA Menge erlaubt. Die Quantifizierung erfolgt nur während der exponentiellen Phase der Reaktion. Der Ct-Wert („cycled threshold“) gibt den Zyklus an, bei dem das Fluoreszenzsignal während des exponentiellen Anstiegs erstmals das Hintergrundsignal übersteigt. Ein hoher Ct-Wert entspricht einer niedrigen mRNA-Expression - ein geringer Ct-Wert einer hohen mRNA-Expression. Die verwendete Software ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3 lieferte mithilfe der gemessenen Fluoreszenzsignale die Darstellung eines Amplifikationsplot (Abbildung 7).

Abbildung 7: Amplifikationsplot *RAD51C*

Zur Normalisierung der mRNA-Expressionsdaten wird eine endogene Kontrolle in Form eines Haushaltgenes benötigt. Haushaltsgene werden konstitutiv und unabhängig von äußerer Einwirkung in allen Zellen eines Organismus exprimiert (Zhu et al. 2008). Aufgrund von Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe mit Ovarialkarzinomgewebe, wurde das Aminolevulinic Acid Synthase type 1 (Gen) (*ALAS1*) Gen als Haushaltsgen gewählt. Zusätzliche Haushaltsgene wurden nicht verwendet.

**Prinzip des TaqMan®** Die quantitative Echtzeit-PCR wurde mit dem TaqMan® Gene Expression Master Mix von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) durchgeführt, dessen Grundlage das TaqMan® Prinzip ist. Seine Funktionsweise wird im Folgenden näher erläutert. Bestandteile einer Taqman® Sonde sind am 5' Ende ein Reporter-Farbstoff und am 3' Ende ein nicht-fluoreszierender Quencher (Abbildung 8). Zusätzlich befindet sich am 3' Ende ein Minor-Grove-Binder, der durch Bindung an die kleine Furche („minor groove“) die Doppelhelix stabilisiert und so die Verwendung von kurzen Sonden ermöglicht (Kutyavin et al. 2000).

Während der PCR lagert sich die Taqman® Sonde an ihre komplementäre Sequenz an. Solange die Sonde intakt ist und folglich Quencher und Reporter sich in Nähe zueinander befinden, unterdrückt der Quencher die Freisetzung der Reporterfluoreszenz (Abbildung 8). Der hierbei zugrunde liegende physikalische Prozess ist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) (Förster 1948).

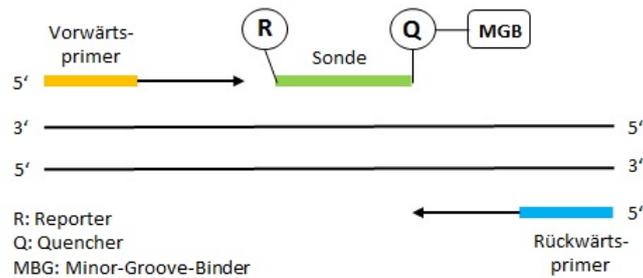


Abbildung 8: Anlagerung der Taqman®-Sonde, Beginn der Extensionsphase (modifiziert nach Livak et al. 1995)

Nach Verdrängung (Abbildung 9) und Spaltung der an die Gensequenz hybridisierten Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq® Polymerase werden Quencher und Reporter räumlich voneinander getrennt (Abbildung 10). Infolgedessen kann der Quencher die Fluoreszenz des Reporters nicht weiter inhibieren, wodurch eine Zunahme der Fluoreszenz detektiert wird. Da nicht vollständig hybridisierte Sonden verdrängt werden, bevor sie durch die 5'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq® gespalten werden, ist das Auftreten von Fluoreszenz spezifisch für die gewählte Sequenz.

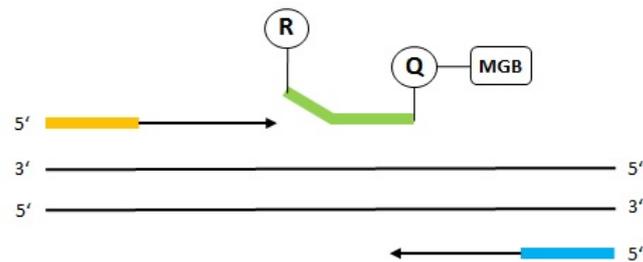


Abbildung 9: Verdrängung der Taqman®-Sonde (modifiziert nach Livak et al. 1995)

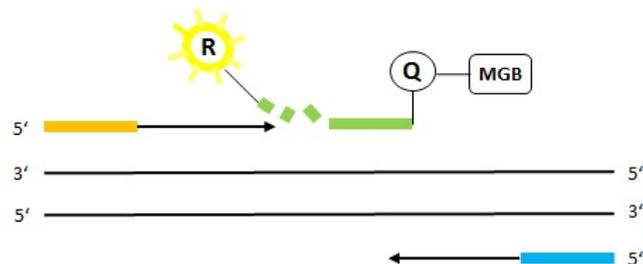


Abbildung 10: 5'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq® Polymerase und Zunahme der Fluoreszenz (modifiziert nach Livak et al. 1995)

Mit jedem neuen PCR-Zyklus kommt es nach Abschluss der Polymerisation (Abbildung 11) zu einer Häufung von PCR-Produkten. Dies resultiert bis zum Ende der Reaktionszyklen in einem zunehmenden Anstieg von Fluoreszenz, der mithilfe des ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System erfasst wird.

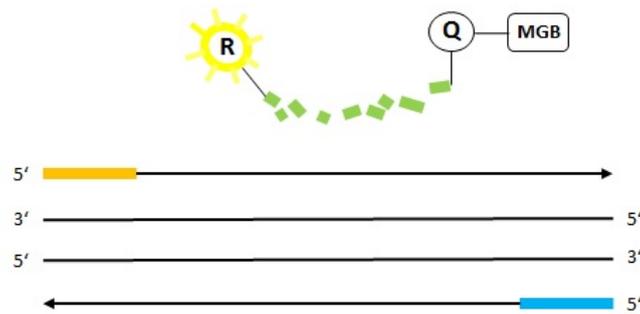


Abbildung 11: Abschluss der Polymerisation (modifiziert nach Livak et al. 1995)

**Durchführung** Die verwendeten TaqMan® Gene Expression Single-tube Assays und der TaqMan® Gene Expression Master Mix von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) sind in Tabelle 3 benannt. Die Durchführung erfolgte mithilfe des ABI PRISM® 7000 Sequence Detection Systems.

Zu Beginn wurde im Programm ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3 ein Dokument erstellt, das die Proben benennt und die Einstellungen für den Lauf festlegt. Zunächst wurden die cDNA Proben und die TaqMan® Gene Expression Single-tube Assays auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die cDNA der Proben in einer separaten 96-Well Platte mit  $dH_2O$  auf  $125 \frac{ng}{\mu l}$  verdünnt und auf Eis gekühlt.

Für das im Experiment jeweils zu untersuchende Gen und das Haushaltsgen *ALAS1* wurden Reaktionsmischungen (Tabelle 17) hergestellt, diese zentrifugiert und auf eine 96-Well Platte vorgelegt.  $4\mu l$  der auf einer separaten 96-Well Platte verdünnten cDNA wurden mithilfe einer Multichannelpipette zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt.

Tabelle 17: Reaktionsmischung TaqMan®

TaqMan® Gene Gene Expression Master Mix	20 $\mu l$
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay	2 $\mu l$
$dH_2O$	14 $\mu l$

Um die Berechnung von verlässlichen Durchschnitts-Ct-Werten zu gewährleisten und die Pipettiergenauigkeit zu überprüfen, wurde jede Probe zweifach aufgetragen (Dubletten). Als Leerwert („No Template Control“) fungierte  $dH_2O$ . Um mehrere Platten des gleichen Genes in der Auswertung miteinander verknüpfen zu können, wurde eine Linker-cDNA gewählt, die Bestandteil jedes Laufes war.

Zuletzt wurde die 96-Well Platte mit einer selbstklebenden Abdichtungsfolie verschlossen und zur Auflösung von Luftblasen und zur weiteren Durchmischung 30sec bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Zur Vermeidung von Verunreinigung war es während der gesamten Ausführung des Experiments essentiell, die 96-Platte nicht an der Unterseite zu berühren. Die 96-Well Platte wurde in das Instrument ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System überführt und die quantitative Echtzeit-PCR mithilfe der Software ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3 (Einstellungen Tabelle 18) gestartet.

Tabelle 18: Einstellungen ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3

---

50 °C	2 Minuten	
95 °C	10 Minuten	
45 Zyklen	95 °C	15 Sekunden
	60 °C	1 Minute

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung von BRCA1-ähnlichen Proben mittels des MLPA BRCA1ness Test

#### 4.1.1 Datennormalisierung

Insgesamt wurden aus der DNA von 49 Tumorproben der MLPA BRCA1ness Test durchgeführt. Die Rohdaten der MLPA wurden anlehnend an die Beschreibung von Lips et al. (E. H. Lips et al. 2011) ausgewertet. Die Normalisierung der MLPA Rohdaten bestand aus zwei Schritten:

1. **Intrasample Normalisation:** Innerhalb der Probe wird die Peakfläche jeder einzelnen Sonde durch die Summe aller Sondenpeakflächen geteilt (Abbildung A.37 (a)). Dieser Quotient wurde analog bei den Kontrollproben gebildet und ein Mittelwert der Kontrollproben berechnet (Abbildung A.37 (b)).

2. **Intersample Normalisation:** Die oben kalkulierten Quotienten wurden wiederum miteinander dividiert, wodurch für jede Sonde der Probe eine Ratio entstand (Abbildung A.37 (c)).

Zur Einteilung der Proben in *BRCA1*-ähnlich und nicht-*BRCA1*-ähnlich wurde das prediction analysis for microarrays (PAM) Verfahren mit R (Tibshirani et al. 2002) verwendet. Der Trainingsdatensatz wird von MRC Holland bereitgestellt.

Zur Aufbereitung der Daten wurden die Ratios in einem separaten Tabellendokument zusammengefasst. Den Sonden wurden vorgegebene PAM Orders zugewiesen und der Datensatz anhand dieser sortiert (Abbildung A.38). Rot hinterlegte chromosomale Positionen waren im *BRCA1*-like<sup>aCGH</sup> Profil deletiert, grün hinterlegte chromosomale Positionen amplifiziert. Das Skript für das Programm R mit dem Paket pamr ist in Listing 1 dargestellt.

Der von R berechnete Wert wurde im Verhältnis zum festgelegten Cut-Off-Wert von 0,5 gesetzt und erlaubte eine Klassifikation der Proben in BReast CAncer1 (Gen) (*BRCA1*)-ähnlich und nicht-*BRCA1*-ähnlich. Proben mit einem Wert  $\geq 0,5$  klassifizierte R als *BRCA1*-ähnlich. Proben mit einem Wert  $< 0,5$  wurden als nicht-*BRCA1*-ähnlich bezeichnet. Im gesamten Kollektiv der Ovarialkarzinome (n=49) wurden so 19 Proben (38,8%) als *BRCA1*-ähnlich und 30 Proben (61,2%) als nicht-*BRCA1*-ähnlich eingestuft (Tabelle 19).

Tabelle 19: Ergebnis des MLPA BRCA1ness Test

Ergebnis der MLPA	n=49	%
<i>BRCA1</i> -ähnlich	19	38,8
nicht- <i>BRCA1</i> -ähnlich	30	61,2

#### 4.1.2 Evaluierung der Qualität

Zur Evaluierung der Qualität der Versuche wurde das von MRC Holland zur Verfügung gestellte „Quality Control Flowchart“ angewendet. Dieses beinhaltet u.a. eine Beurteilung der insge-

samt neun Kontrollfragmente (ein Vergleichsfragment, vier D-Fragmente, vier Q-Fragmente) der SALSAS<sup>®</sup> MLPA Probemischung. Niedrige D-Fragmente ( $\leq 40\%$  des korrespondierenden Vergleichsfragments) stellten einen Hinweis auf ein Denaturierungsproblem und hohe Q-Fragmente ( $\geq 33\%$  des korrespondierenden Vergleichsfragments) einen Hinweis auf eine unzureichende DNA-Menge dar (MRC Holland 2014). Die Rohdaten jeder einzelnen Probe wurden hinsichtlich ihrer Kontrollfragmente evaluiert. Die D-Fragmente aller Ovarialkarzinome und aller TNBC befanden sich jeweils im Normbereich und es ergaben sich somit keine Hinweise auf das Vorliegen von Denaturierungsproblemen. Hinsichtlich der Q-Fragmente befanden sich 32 der 49 Proben im Normbereich. Bei 17 der 49 Ovarialkarzinomproben lagen die Q-Fragmente außerhalb des jeweiligen Normbereiches.

#### 4.1.3 Überlebenszeitanalysen

Das Gesamtüberleben (Overall Survival) ist definiert als die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Versterben des Patienten (unabhängig der Todesursache) (Prentice 1989). Das progressionsfreie Überleben (Progression-Free Survival) ist definiert als die Zeitspanne zwischen Behandlungsbeginn und Tumorprogress bzw. Versterben des Patienten (unabhängig der Todesursache) als Endpunkt (Saad und Katz 2008). In dieser Arbeit wurde der Zeitpunkt der Operation jeweils als Beginn des Gesamt- bzw. progressionsfreien Überlebens gewählt. Die berechnete Zeitspanne wurde in Monaten angegeben. Auf Grundlage der Ergebnisse des MLPA BRCA1ness Tests wurden die Patientinnen in zwei Gruppen (*BRCA1*-ähnlich/nicht-*BRCA1*-ähnlich) dichotomisiert. Die Überlebensanalysen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan und Meier 1958) durchgeführt und Unterschiede mit dem Log-Rank Test (Mantel 1966) abgeschätzt. Die Hazard Ratio wurde mit dem Cox Proportional-Hazard model errechnet (Cox 1972). P-Werte wurde mit dem „likelihood ratio“-Test abgeschätzt (Huelsenbeck und Crandall 1997).

#### Gesamtüberleben

Das Gesamtüberleben wurde explorativ in der Gesamtkohorte, in der Kohorte der Patientinnen im FIGO Stadium III/IV und in der Kohorte der Patientinnen mit seröser Histologie betrachtet (Tabelle 20). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich in der Kohorte der Patientinnen im FIGO Stadium III/IV, die folgend dargestellt wird.

Tabelle 20: Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Ergebnis des MLPA BRCA1ness Tests

	Anzahl	Überleben (in Monaten)	p-Wert (Log Rank)	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b>Gesamtkohorte</b>	<b>49</b>		0,104	0,55 [0,27; 1,14]	0,102
nicht- <i>BRCA1</i> -ähnlich	30	28,1			
<i>BRCA1</i> -ähnlich	19	48,6			
<b>FIGO III/IV</b>	<b>44</b>		<b>0,036</b>	0,46 [0,22; 0,97]	<b>0,037</b>
nicht- <i>BRCA1</i> -ähnlich	25	27,3			
<i>BRCA1</i> -ähnlich	19	48,6			
<b>seröse Histologie</b>	<b>38</b>		0,201	0,57 [0,24; 1,36]	0,196
nicht- <i>BRCA1</i> -ähnlich	24	29,3			
<i>BRCA1</i> -ähnlich	14	48,9			

In der Kohorte der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (n=44) definierte der MLPA BRCA1ness Tests 19 Tumorproben als *BRCA1*-ähnlich und 25 Tumorproben als nicht-*BRCA1*-ähnlich. Patientinnen mit *BRCA1*-ähnlichem Tumorprofil (n=19) hatten ein medianes Gesamtüberleben von 48,6 Monaten (95%-KI=[29,6; ]) und Patientinnen mit einem nicht-*BRCA1*-ähnlichem Tumorprofil (n=25) ein medianes Gesamtüberleben von 27,3 Monaten (95%-KI=[18,5; 41]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant (p=0,036). Die Hazard Ratio betrug 0,46 (95%-KI=[0,22; 0,97]) (Abbildung 12).

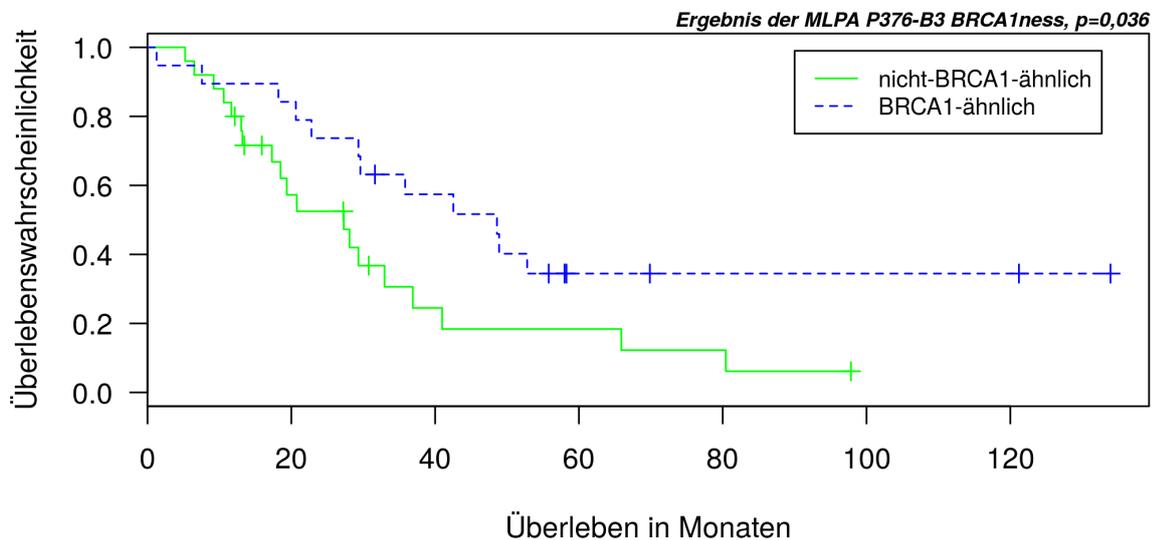


Abbildung 12: Ergebnis des MLPA BRCA1ness Tests, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Patientinnen im FIGO-Stadium III oder IV (n=43), p=0,036, HR=0,46 (95%-KI=[0,22; 0,97])

### Progressionsfreies Überleben

Das progressionsfreie Überleben wurde explorativ in der Gesamtkohorte, in der Kohorte der Patientinnen im FIGO Stadium III/IV und in der Kohorte der Patientinnen mit seröser Histologie betrachtet (Tabelle 21). In keiner Kohorte zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 21: Progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Ergebnis des MLPA BRCA1ness Tests

	Anzahl	Überleben (in Monaten)	p-Wert (Log Rank)	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b>Gesamtkohorte</b>	<b>49</b>		0,618	0,85 [0,44; 1,62]	0,617
nicht- <i>BRCA1</i> -ähnlich	30	14,7			
<i>BRCA1</i> -ähnlich	19	15,6			
<b>FIGO III/IV</b>	<b>44</b>		0,418	0,76 [0,39; 1,47]	0,416
nicht- <i>BRCA1</i> -ähnlich	25	13,0			
<i>BRCA1</i> -ähnlich	19	15,6			
<b>seröse Histologie</b>	<b>38</b>		0,948	0,97 [0,46; 2,09]	0,948
nicht- <i>BRCA1</i> -ähnlich	24	15,0			
<i>BRCA1</i> -ähnlich	14	15,6			

#### 4.1.4 Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern

Mithilfe des exakten Tests nach Fisher (Fisher 1922) (Signifikanzniveau von 95%) wurde der Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des MLPA BRCA1ness Tests und den klinischen Variablen untersucht (Tabelle 22). Der MLPA BRCA1ness Test von MRC-Holland MLPA® ermöglichte eine Einteilung der untersuchten Ovarialkarzinome in *BRCA1*-ähnlich und nicht-*BRCA1*-ähnlich. Zwischen dem klinischen Parameter Familienanamnese (eine positive Familienanamnese war definiert als ein Mammakarzinom in der eigenen medizinischen Historie und/oder ein Verwandter mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinom (Harter et al. 2017); Informationen über Keimbahnmutationstestungen lagen nicht vor) und dem Ergebnis des MLPA BRCA1ness Test ergab der exakte Test nach Fisher einen p-Wert von 0,012 (OR=6,19). Somit ist davon auszugehen, dass eine Assoziation zwischen diesen beiden Merkmalen besteht. Bei der Evaluierung der anderen klinischen Parameter ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

Tabelle 22: Assoziation des MLPA BRCA1ness-Profiles mit klinischen Daten, exakter Test nach Fisher, Gesamtkohorte (n=49)

Variable	Anzahl	Ergebnis der MLPA		Odds Ratio	p-Wert
		nicht-BRCA1-ähnlich	BRCA1-ähnlich		
<b>Alter bei OP</b>	<b>49</b>	<b>30</b>	<b>19</b>	0,70	0,762
<60 J.	18	12	6		
≥60 J.	31	18	13		
<b>Familienanamnese<sup>1</sup></b>	<b>41</b>	<b>23</b>	<b>18</b>	6,19	<b>0,012</b>
negativ	16	13	3		
positiv	25	10	15		
<b>Fernmetastasen</b>	<b>25</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	0,22	0,355
M0	18	10	8		
M1	7	6	1		
<b>Grading</b>	<b>47</b>	<b>28</b>	<b>19</b>		0,234
low grade	4	4	0		
high grade	43	24	19		
<b>Histologie</b>	<b>49</b>	<b>30</b>	<b>19</b>	0,71	0,729
nicht-serös	11	6	5		
serös	38	24	14		
<b>Lymphknotenstatus</b>	<b>39</b>	<b>23</b>	<b>16</b>	2,12	0,333
N0	19	13	6		
N1	20	10	10		
<b>Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking</b>	<b>48</b>	<b>29</b>	<b>19</b>	2,93	0,134
≤0cm	20	15	5		
>0cm	28	14	14		
<b>Z.n. Mammakarzinom</b>	<b>40</b>	<b>22</b>	<b>18</b>	2,65	0,185
nein	27	17	10		
ja	13	5	8		

<sup>1</sup>Familienanamnese: Informationen über Keimbahnmutationstestungen lagen nicht vor. Eine positive Familienanamnese war definiert als ein Mammakarzinom in der eigenen medizinischen Historie und/oder ein Verwandter mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinom (Harter et al. 2017)

## 4.2 Untersuchung der mRNA Expression von Genen der DNA-Reparatur

Ein wesentlicher Punkt dieser Arbeit stellte die Untersuchung der mRNA-Expressionen von insgesamt sieben DNA-Reparaturgenen (*ATM*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *RAD51C* und *RAD51D*) im Ovarialkarzinomgewebe dar. Nach Auswertung der mRNA-Expressionswerte (Berechnung der Effizienz, Relative Quantifizierung) und Dichotomisierung der Patienten in zwei Gruppen (niedrige/hohe mRNA-Expression im Tumor) mithilfe eines Cut-Off-Wertes wurden die Gene jeweils in Hinblick auf ihr prognostisches Potential (Gesamtüberleben, progressionsfreien Überleben) evaluiert und abschließend mit klinischen Daten und dem Ergebnis des MLPA BRCA1ness Test korreliert.

### 4.2.1 Berechnung der Effizienz

Die Effizienz gibt Auskunft über die Zunahme des PCR Produktes nach jedem abgelaufenen Amplifikationszyklus (Taylor et al. 2010). Hierzu wurden cDNA Verdünnungsreihen (500ng, 250ng, 125ng, 62,5ng) erstellt und mit jedem genspezifischen Assay (Tabelle 3) eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Die  $\log_{10}$  Werte der cDNA Menge in ng wurden auf die x-Achse und die Ct-Werte auf die y-Achse aufgetragen. Durch das Legen einer linearen Regressionsgerade

(beispielhaft für *BRCA2* in Abbildung 13) wurde die Steigung  $m$  ermittelt. Im Anhang in den Abbildungen A.39 - A.44 befinden sich die linearen Regressionsgeraden der weiteren Gene.

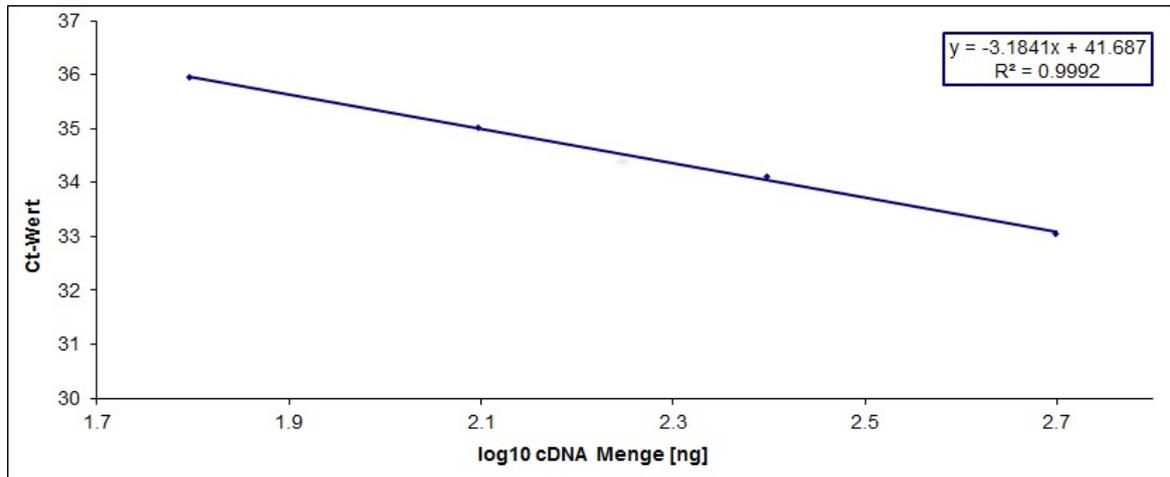


Abbildung 13: Darstellung der linearen Regressionsgerade, TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRCA2 Hs00609073-m1,  $m = -3,18$

Das Bestimmen der linearen Regressionsgerade bildete die Grundlage zur Berechnung der Effizienz mithilfe folgender Formel:

$$E = 10^{-1/m} - 1 \quad (1)$$

Die berechnete Effizienz ist in Tabelle 23 für jeden im Experiment verwendeten genspezifischen Assay aufgelistet. Eine Effizienz zwischen 90 und 110% gilt hierbei als zulässig. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  (Quadrat des Korrelationskoeffizienten) gibt Auskunft darüber, wie gut ein Wert einen anderen vorhersagen kann. Er sollte  $> 0,99$  sein.

Tabelle 23: Ergebnisse des cDNA Verdünnungsreihe

genspezifischer Assay	Effizienz	$R^2$
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay ALAS1 Hs00167441-m1	1,03	0,9954
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay ATM Hs01112355-g1	0,95	0,9610
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRCA1 Hs01556191-m1	1,05	0,9996
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRCA2 Hs00609073-m1	1,06	0,9992
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRIP1 Hs00230743-m1	1,06	0,9597
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay CHEK2 Hs00200485-m1	0,96	0,9886
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay RAD51C Hs00365220-m1	1,01	0,9996
TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay RAD51D Hs00172529-m1	1,07	0,9756

#### 4.2.2 Relative Quantifizierung

Zur Auswertung wurde unter Verwendung der vergleichenden Ct-Methode (Comparative Ct-method) die Relative Quantifizierung (RQ) gewählt.

Der Schwellenwert (Threshold) wurde von der Software ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3 automatisch gewählt und zusätzlich vom Benutzer kontrolliert. Als Kalibratorprobe wurde für alle untersuchten Gene ein Ovarialkarzinom vom Borderlinetyp (Probe G12-I-06) ausgewählt. Da keine DNA von Normalgewebe vorhanden war, ist die Verwendung des Borderlinetumors als Kompromiss beziehungsweise als Annäherung an Normalgewebe zu verstehen. Die Berechnung der Relativen Quantifizierung erfolgte durch folgende Rechenschritte (Livak und Schmittgen 2001):

$$\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{endogeneKontrolle} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Kalibrator} \quad (3)$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (4)$$

Die RQ-Werte beinhalten demnach mit  $\Delta\Delta Ct$  eine Differenzkomponente, die einen Bezug zwischen der mRNA-Expression der einzelnen Proben und der Kalibratorprobe aufstellt. Diese Differenzkomponente fällt durch Berücksichtigung in der Potenz (Formel 4) besonders stark ins Gewicht. Die anhand von Formel 4 berechneten RQ-Werte bilden die Grundlage für weitere statistische Auswertungen. Die RQ-Werte werden im Folgenden auch als mRNA-Expressionswerte bezeichnet.

Im Anhang (Tabelle A.45) sind die Histogramme der RQ-Werte abgebildet. Aufgrund des explorativen Charakters dieser Studie (n=49) und der in den meisten Fällen tendenziell zu den niedrigen Werten hin verschobenen Verteilungskurven (a.e. logarithmischer Normalverteilung entsprechend) wurden in dieser Arbeit nicht-parametrische Tests den korrespondierenden parametrischen Tests vorgezogen.

#### 4.2.3 Bestimmung der Cut-Off-Werte für statistische Berechnungen

Horton und L. (2003) schlugen die mittlere mRNA-Expression als quantitativen Faktor zur Unterscheidung zwischen zwei Gruppen hinsichtlich des Gesamtüberleben bzw. des progressionsfreien Überlebens vor. Die Cut-Off-Werte bewegten sich hierbei zwischen der 10% - 90% Quantile der mittleren mRNA-Expression (Hothorn und Lausen 2003). Mithilfe der Programmiersprache R (Maximally Selected Rank Statistics) wurden auf Grundlage der mRNA-Expressionswerte und des Überlebens Cut-Off-Werte für die ausgesuchten Gene berechnet (Listings 2 und 3) (Hothorn und Lausen 2002). mRNA-Expressionswerte unterhalb des Cut-Off-Wert wurden zusammenfassend als eine niedrige - und mRNA-Expressionswerte oberhalb des Cut-Off-Werts als eine hohe mRNA-Expression klassifiziert. So gelang eine Unterscheidung zwischen einer Hoch- und Niedrigrisiko Patientengruppe.

#### 4.2.4 Gesamtüberleben

Das Gesamtüberleben (Overall Survival) ist definiert als die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Versterben des Patienten (unabhängig der Todesursache) (Prentice 1989). In dieser Arbeit wurde der Zeitpunkt der Operation als Zeitpunkt der Diagnosestellung gewählt. Auf

Grundlage der genspezifisch berechneten Cut-Off-Werte (siehe 4.2.3) wurden die Patientinnen in zwei Gruppen (niedrige/hohe mRNA-Expression im Tumor) dichotomisiert. Die Überlebensanalysen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan und Meier 1958) durchgeführt und Unterschiede mit dem Log-Rank Test (Mantel 1966) abgeschätzt. Die Hazard Ratio wurde mit dem Cox Proportional-Hazard model errechnet (Cox 1972). P-Werte wurde mit dem „likelihood ratio“-Test abgeschätzt (Huelsenbeck und Crandall 1997). Das Skript für die Berechnungen mit R sind in Listing 2 dargestellt. Die Tabelle 24 gibt einen Überblick über die statistische Auswertung. Im Folgenden werden die Ergebnisse der sieben untersuchten Gene im Einzelnen vorgestellt.

**ATM** In der Gesamtkohorte ( $n=48$ ) wurde für *ATM* ein Cut-Off-Wert von 0,363 berechnet. Die RQ-Werte von 23 Patientinnen (47,9%) waren  $\leq 0,363$ . In dieser Patientinnengruppe zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 33,0 Monaten (95%-KI=[18,5; 52,8]). Bei 25 Patientinnen (52,1%) waren die RQ-Werte  $> 0,363$ . Das mediane Gesamtüberleben betrug in dieser Patientinnengruppe 29,6 Monate (95%-KI=[28,1; ]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ( $p=0,504$ ). Die Hazard Ratio betrug 0,79 (95%-KI=[0,40; 1,58]) (Abbildung 14).

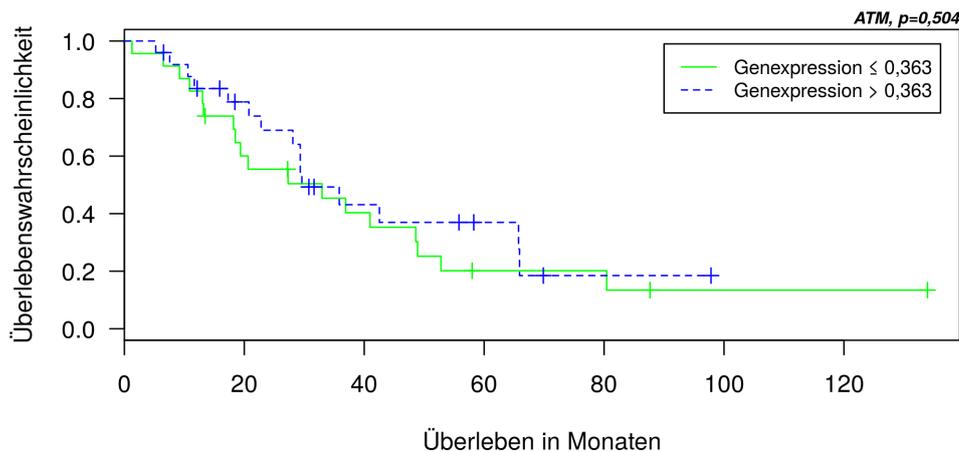


Abbildung 14: mRNA-Expression *ATM*, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte ( $n=48$ ),  $p=0,504$ ,  $HR=0,79$  (95%-KI=[0,40; 1,58])

**BRCA1** Der für *BRCA1* in der Gesamtkohorte ( $n=48$ ) berechnete Cut-Off-Wert lag bei 0,726. Bei 21 Patientinnen (43,8%) waren die korrespondierenden RQ-Werte  $\leq 0,726$ , bei 27 Patientinnen (56,2%)  $> 0,726$ . Das mediane Gesamtüberleben in der Patientinnengruppe mit RQ-Werten unterhalb des Cut-Off-Wertes lag bei 52,8 Monaten (95%-KI=[29,3; ]). In der anderen Gruppe war das mediane Gesamtüberleben 28,1 Monate (95%-KI=[18,5; 42,5]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ( $p=0,034$ ). Die Hazard Ratio betrug 2,20 (95%-KI=[1,04; 4,64]) (Abbildung 15).

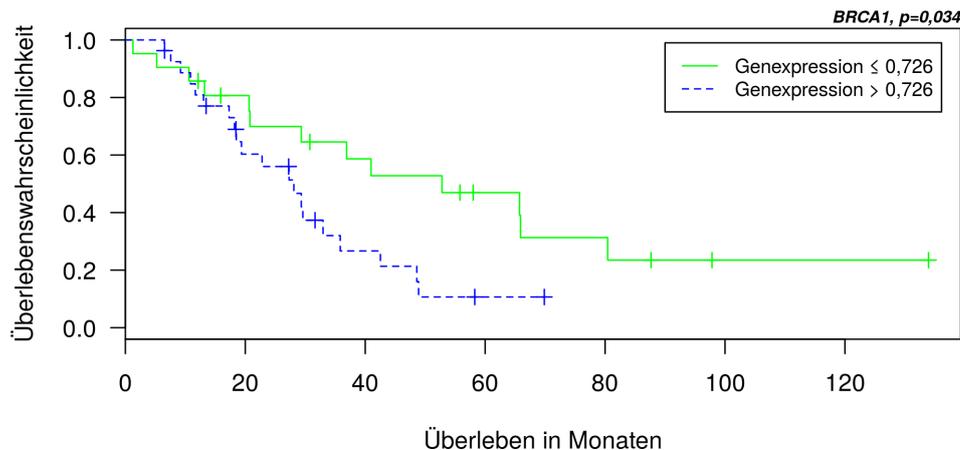


Abbildung 15: mRNA-Expression *BRCA1*, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,034, HR=2,20 (95%-KI=[1,04; 4,64])

**BRCA2** In der Gesamtkohorte (n=48) lag der für *BRCA2* errechnete Cut-Off-Wert bei 0,382. Sechs Patientinnen (12,5%) wurden der Gruppe mit einem Cut-Off-Wert von  $\leq 0,382$  zugeordnet. Das mediane Gesamtüberleben war hierbei 65,7 Monate (95%-KI=[36,9; ]). Die RQ-Werte von 42 Patientinnen (87,5%) waren  $> 0,382$ . In der Gruppe zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 29,3 Monaten (95%-KI=[29,3; 48,6]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant (p=0,218). Die Hazard Ratio betrug 1,93 (95%-KI=[0,67; 5,58]) (Abbildung 16).

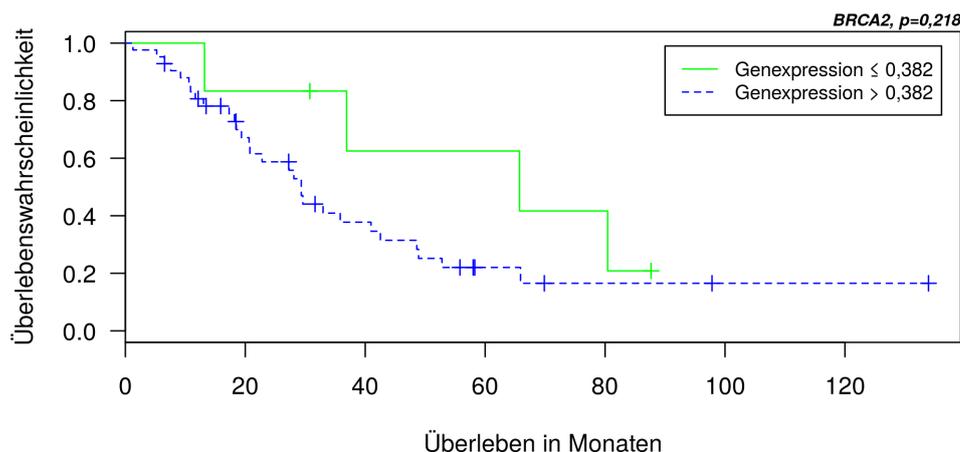


Abbildung 16: mRNA-Expression *BRCA2*, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,218, HR=1,93 (95%-KI=[0,67; 5,58])

**BRIP1** Für *BRIP1* wurde in der Gesamtkohorte (n=48) ein Cut-Off-Wert von 0,440 bestimmt. Die RQ-Werte bei zehn Patientinnen (20,8%) waren  $\leq 0,440$ . Das mediane Gesamtüberleben

dieser Gruppe betrug 65,9 Monate (95%-KI=[65,7; ]). Bei 38 Patientinnen (79,2%) waren die RQ-Werte  $> 0,440$ . In dieser Gruppe war das mediane Gesamtüberleben 28,1 Monate (95%-KI=[19,4; ]). Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch signifikant ( $p=0,011$ ). Die Hazard Ratio betrug 3,40 (95%-KI=[1,27; 9,15]) (Abbildung 17).

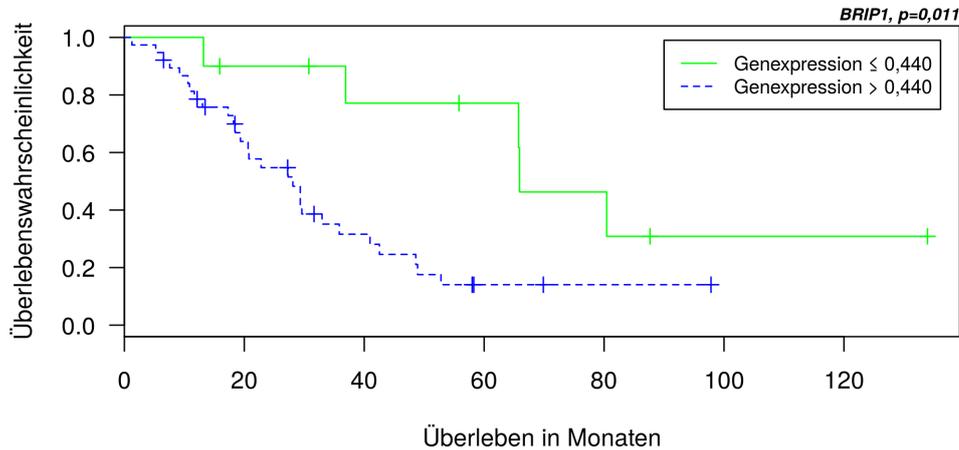


Abbildung 17: mRNA-Expression *BRIP1*, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte ( $n=48$ ),  $p=0,011$ , HR=3,40 (95%-KI=[1,27; 9,15])

**CHEK2** Der für *CHEK2* berechnete Cut-Off-Wert betrug für die Gesamtkohorte ( $n=48$ ) 1,698. Bei 41 Patientinnen (85,4%) waren die korrespondierenden RQ-Werte  $\leq 1,698$ ; bei sieben Patientinnen (14,6%)  $> 1,698$ . Das mediane Gesamtüberleben in der ersten Patientinnengruppe lag bei 33,0 Monaten (95%-KI=[27,3; 65,7]). In der zweiten Gruppe lag das mediane Gesamtüberleben bei 28,1 Monaten (95%-KI=[18,5; ]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ( $p=0,186$ ). Die Hazard Ratio betrug 1,82 (95%-KI=[0,74; 4,48]) (Abbildung 18).

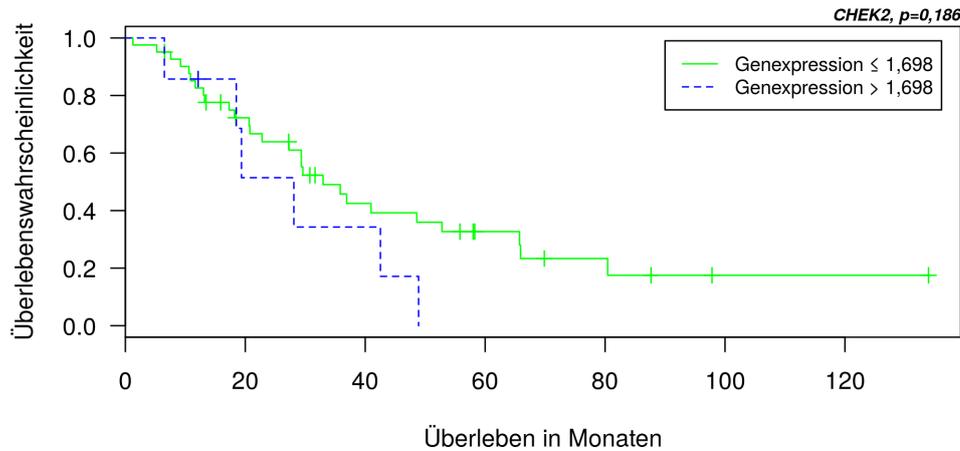


Abbildung 18: mRNA-Expression *CHEK2*, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,186, HR=1,82 (95%-KI=[0,74; 4,48])

***RAD51C*** In der Gesamtkohorte (n=48) lag der für *RAD51C* berechnete Cut-Off-Wert bei 0,462. 27 Patientinnen (56,3%) wurden der Gruppe mit einem Cut-Off-Wert von  $\leq 0,462$  zugeordnet. Das mediane Gesamtüberleben war hierbei 41,0 Monate (95%-KI=[27,3; ]). Die RQ-Werte von 21 Patientinnen (43,7%) waren  $> 0,462$ . In dieser Gruppe zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 29,3 Monaten (95%-KI=[18,5; ]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant (p=0,036). Die Hazard Ratio betrug 2,16 (95%-KI=[1,04; 4,50]) (Abbildung 19).

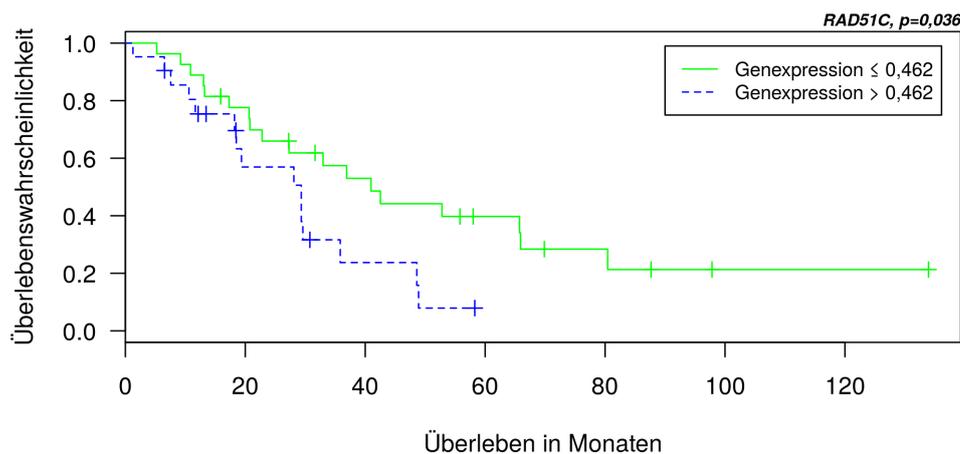


Abbildung 19: mRNA-Expression *RAD51C*, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,036, HR=2,16 (95%-KI=[1,04; 4,50])

**RAD51D** In der Gesamtkohorte (n=48) ergab sich für *RAD51D* ein Cut-Off-Wert von 0,092. Zehn Patientinnen (20,8%) wurden der Gruppe mit einem Cut-Off-Wert von  $\leq 0,092$  zugeordnet. Das mediane Gesamtüberleben lag dort bei 52,8 Monaten (95%-KI=[20,6; ]). Die RQ-Werte von 38 Patientinnen (79,2%) waren  $> 0,092$ . In dieser Gruppe zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben von 29,3 Monaten (95%-KI=[20,8; 48,6]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ( $p=0,180$ ). Die Hazard Ratio betrug 1,83 (95%-KI=[0,75; 4,46]) (Abbildung 20).

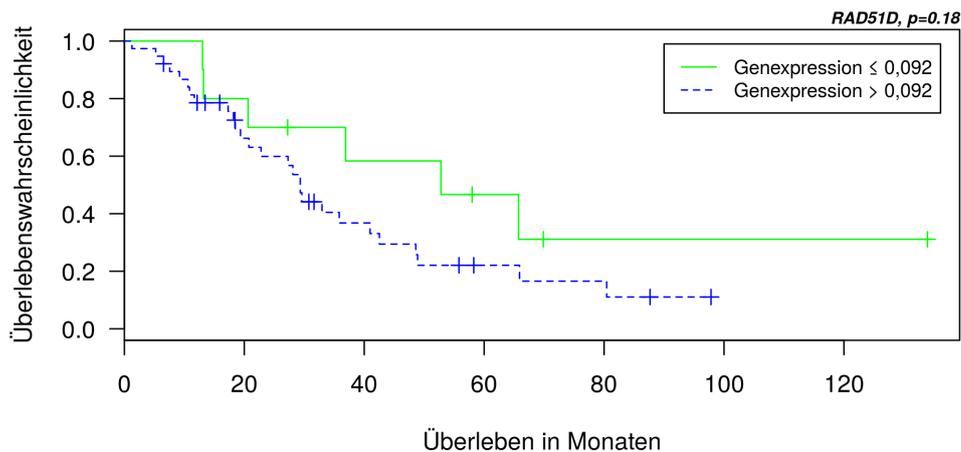


Abbildung 20: mRNA-Expression *RAD51D*, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48),  $p=0,180$ , HR=1,83 (95%-KI=[0,75; 4,46])

**Zusammenfassung** Patientinnen mit jeweils niedriger mRNA-Expression von *BRCA1* (HR=2,20), *BRIP1* (HR=3,40) bzw. *RAD51C* (HR=2,16) im Tumorgewebe wiesen ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben auf (Tabelle 24).

Tabelle 24: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der mRNA-Expression in der Gesamtkohorte (n=48)

	Anzahl	Überleben (in Monaten)	p-Wert (Log Rank)	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b>ATM</b>	<b>48</b>		0,504	0,79 [0,40; 1,58]	0,509
niedrig	23	33,0			
hoch	25	29,6			
<b>BRCA1</b>	<b>48</b>		<b>0,034</b>	<b>2,20</b> [1,04; 4,64]	<b>0,034</b>
niedrig	21	52,8			
hoch	27	28,1			
<b>BRCA2</b>	<b>48</b>		0,218	1,93 [0,67; 5,58]	0,190
niedrig	6	65,7			
hoch	42	29,3			
<b>BRIP1</b>	<b>48</b>		<b>0,011</b>	<b>3,40</b> [1,27; 9,15]	<b>0,006</b>
niedrig	10	65,9			
hoch	38	28,1			
<b>CHEK2</b>	<b>48</b>		0,186	1,82 [0,74; 4,48]	0,221
niedrig	41	33,0			
hoch	7	28,1			
<b>RAD51C</b>	<b>48</b>		<b>0,036</b>	<b>2,16</b> [1,04; 4,50]	<b>0,042</b>
niedrig	27	41,0			
hoch	21	29,3			
<b>RAD51D</b>	<b>48</b>		0,180	1,83 [0,75; 4,46]	0,160
niedrig	10	52,8			
hoch	38	29,3			

#### 4.2.5 Progressionsfreies Überleben

Das progressionsfreie Überleben (Progression-Free Survival) ist definiert als die Zeitspanne zwischen Behandlungsbeginn und Tumorprogress bzw. Versterben des Patienten (unabhängig der Todesursache) als Endpunkt (Saad und Katz 2008). In dieser Arbeit wurde der Zeitpunkt der Operation als Behandlungsbeginn gewählt und die Zeitspanne in Monaten angegeben. Auf Grundlage der genspezifisch berechneten Cut-Off-Werte (siehe 4.2.3) wurden die Patientinnen in zwei Gruppen (niedrige/hohe mRNA-Expression im Tumor) eingeteilt. Das progressionsfreie Überleben (Progression Free Survival) wurde mit der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan und Meier 1958) berechnet und Unterschiede mit dem Log-Rank Test (Mantel 1966) abgeschätzt. Die Hazard Ratio wurde mit dem Cox Proportional-Hazard model errechnet (Cox 1972). P-Werte wurde mit dem „likelihood ratio“-Test abgeschätzt (Huelsenbeck und Crandall 1997). Das Skript für die Berechnungen mit R sind in Listing 3 dargestellt. Unterschiede hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens wurden in der Gesamtkohorte (n=48) untersucht. Tabelle 25 gibt einen Überblick über die statistische Auswertung. Im Folgenden werden die Ergebnisse der sieben untersuchten Gene vorgestellt.

**ATM** Der für *ATM* berechnete Cut-Off-Wert bezüglich des progressionsfreien Überlebens betrug in der Gesamtkohorte ( $n=48$ ) 0,396. Bei 29 Patientinnen (60,4%) waren die korrespondierenden RQ-Werte  $\leq 0,396$ , bei 19 Patientinnen (39,6%)  $> 0,396$ . Das progressionsfreie Überleben in der ersten Patientinnengruppe lag bei 13,8 Monaten (95%-KI=[11,4; 19,6]). In der zweiten Gruppe zeigte sich ein progressionsfreies Überleben von 19,7 Monaten (95%-KI=[12,4; ]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ( $p=0,230$ ). Die Hazard Ratio betrug 0,66 (95%-KI=[0,34; 1,30]) (Abbildung 21).

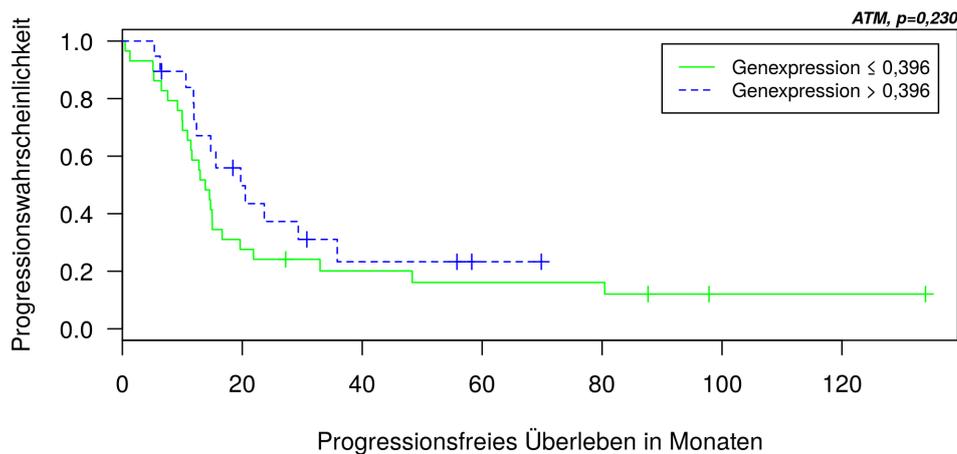


Abbildung 21: mRNA-Expression *ATM*, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte ( $n=48$ ),  $p=0,230$ , HR=0,66 (95%-KI=[0,34; 1,30])

**BRCA1** In der Gesamtkohorte ( $n=48$ ) ergab sich für *BRCA1* hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens ein Cut-Off-Wert von 1,611. 41 Patientinnen (85,4%) wurden der Gruppe mit einem Cut-Off-Wert von  $\leq 1,611$  zugeordnet. Das mediane progressionsfreie Überleben betrug in dieser Gruppe 15 Monate (95%-KI=[11,9; 33,0]). Die RQ-Werte von sieben Patientinnen (14,6%) waren  $> 1,611$ . In dieser Gruppe zeigte sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 13 Monaten (95%-KI=[11,9; ]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ( $p=0,127$ ). Die Hazard Ratio betrug 1,92 (95%-KI=[0,82; 4,51]) (Abbildung 22).

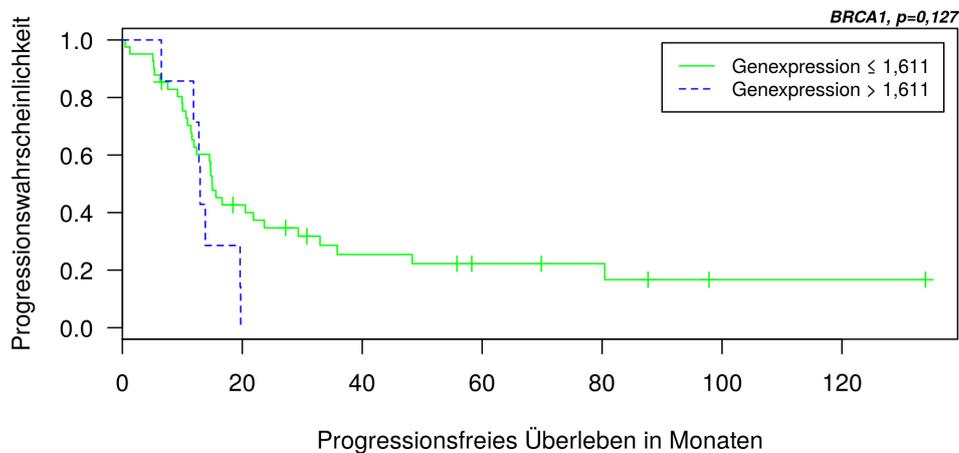


Abbildung 22: Genexprssion *BRCA1*, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,127, HR=1,92 (95%-KI=[0,82; 4,51])

**BRCA2** In der Gesamtkohorte (n=48) lag der für *BRCA2* errechnete Cut-Off-Wert bei 0,382. Sechs Patientinnen (12,5%) wurden der Gruppe mit einem Cut-Off-Wert von  $\leq 0,382$  zugeordnet. Das mediane progressionsfreie Überleben war hierbei 47,7 Monate (95%-KI=[14,7; ]). Die RQ-Werte von 42 Patientinnen (85,5%) waren  $> 0,382$ . In der Gruppe zeigte sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 14,5 Monaten (95%-KI=[11,9; 20,5]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte keine statistische Signifikanz (p=0,228). Die Hazard Ratio betrug 1,89 (95%-KI=[0,66; 5,37]) (Abbildung 23).

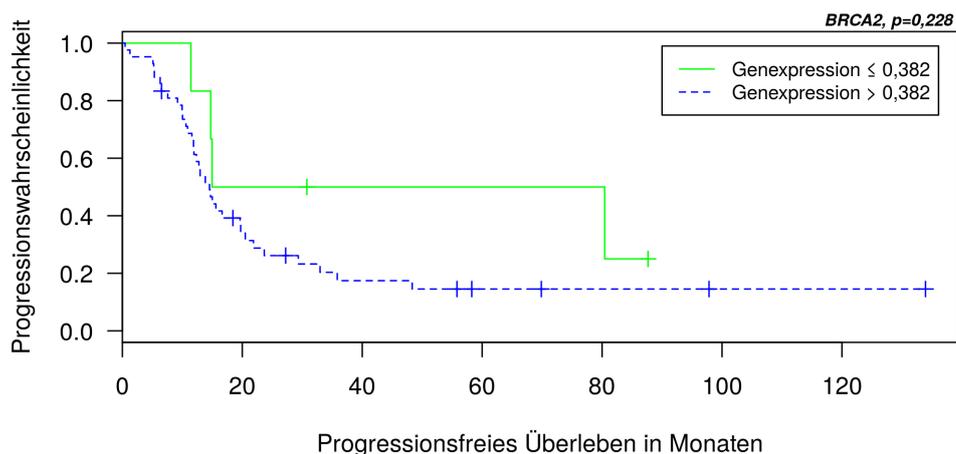


Abbildung 23: mRNA-Expression *BRCA2*, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,228, HR=1,89 (95%-KI=[0,66; 5,37])

**BRIP1** In der Gesamtkohorte (n=48) lag der für *BRIP1* berechnete Cut-Off-Wert hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens bei 0,440. Zehn Patientinnen (20,8%) wurden der Gruppe

mit einem Cut-Off-Wert von  $\leq 0,440$  zugeordnet. Das mediane progressionsfreie Überleben war hierbei 48,3 Monate (95%-KI=[14,7; ]). Die RQ-Werte von 38 Patientinnen (79,2%) waren  $> 0,440$ . In der Gruppe zeigte sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 13,0 Monaten (95%-KI=[11,6; 19,7]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ( $p=0,019$ ). Die Hazard Ratio betrug 2,81 (95%-KI=[1,15; 6,89]) (Abbildung 24).

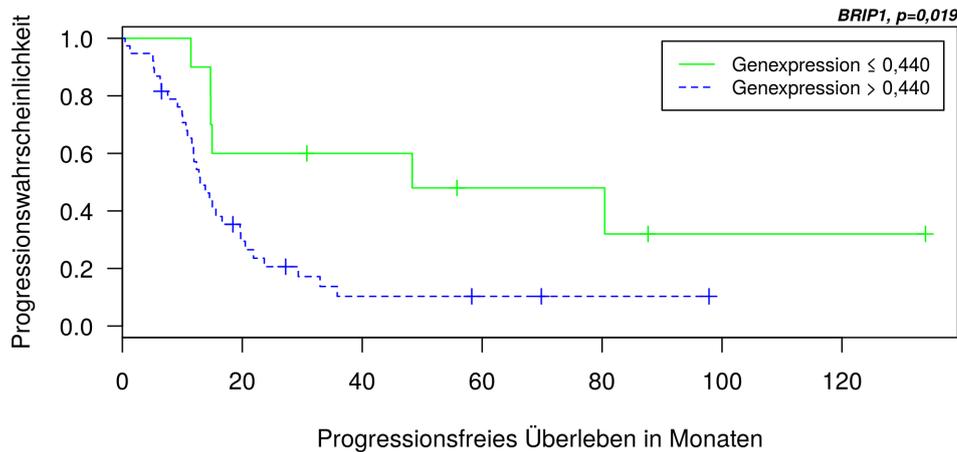


Abbildung 24: mRNA-Expression *BRIP1*, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48),  $p=0,019$ , HR=2,81 (95%-KI=[1,15; 6,89])

**CHEK2** Der für *CHEK2* berechnete Cut-Off-Wert beim progressionsfreien Überleben betrug für die Gesamtkohorte (n=48) 0,713. Bei 13 Patientinnen (27,1%) waren die korrespondierenden RQ-Werte  $\leq 0,713$ , bei 35 Patientinnen (72,9%)  $> 0,713$ . Das mediane progressionsfreie Überleben in der ersten Patientinnengruppe lag bei 11,4 Monaten (95%-KI=[9,2; ]). In der zweiten Gruppe zeigte sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 19,6 Monaten (95%-KI=[13,8; 33,0]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ( $p=0,127$ ). Die Hazard Ratio betrug 0,58 (95%-KI=[0,28; 1,18]) (Abbildung 25).

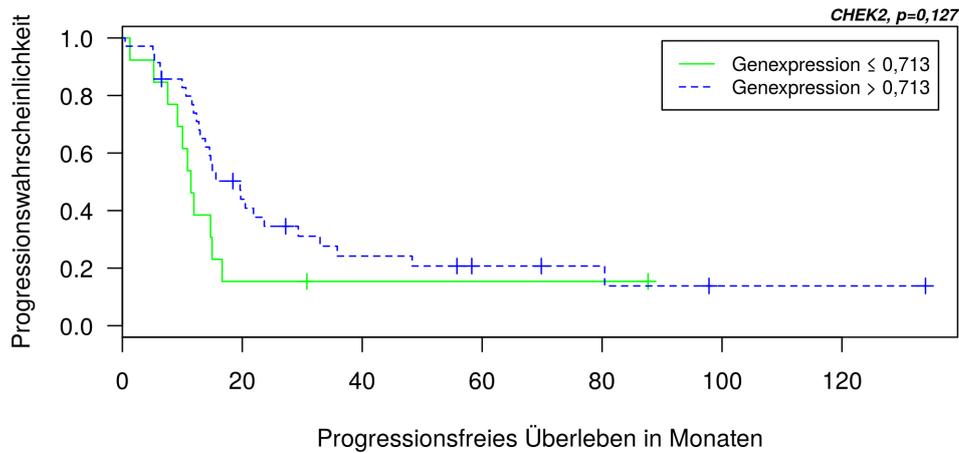


Abbildung 25: mRNA-Expression *CHEK2*, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,127, HR=0,58 (95%-KI=[0,28; 1,18])

**RAD51C** In der Gesamtkohorte (n=48) lag der für *RAD51C* berechnete Cut-Off-Wert beim progressionsfreien Überleben bei 0,268. Elf Patientinnen (22,9%) wurden der Gruppe mit einem Cut-Off-Wert von  $\leq 0,268$  zugeordnet. Das mediane progressionsfreie Überleben war hierbei 13,0 Monate (95%-KI=[10,9; ]). Die RQ-Werte von 37 Patientinnen (77,1%) waren  $> 0,268$ . In dieser Gruppe zeigte sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 15,6 Monaten (95%-KI=[12,8; 33]). Zwischen den beiden Gruppen war der Unterschied statistisch nicht signifikant (p=0,193). Die Hazard Ratio betrug 0,62 (95%-KI=[0,30; 1,28]) (Abbildung 26).

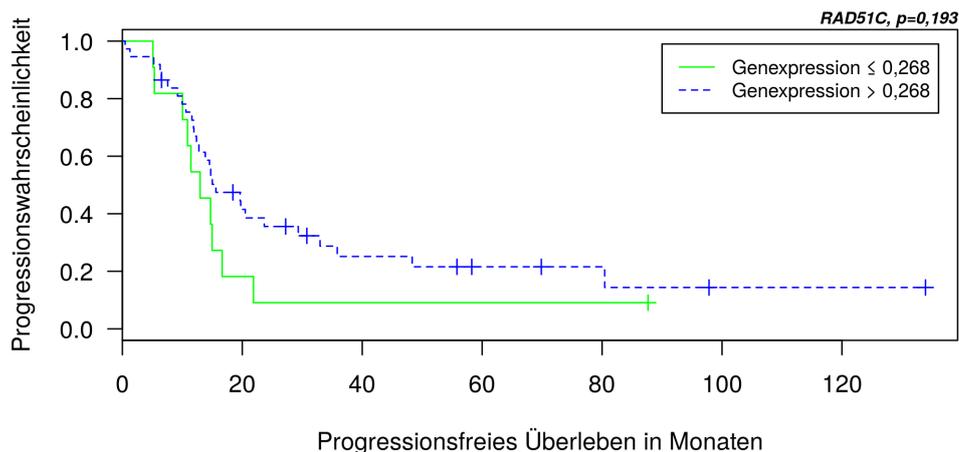


Abbildung 26: mRNA-Expression *RAD51C*, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,193, HR=0,62 (95%-KI=[0,30; 1,28])

**RAD51D** In der Gesamtkohorte (n=48) ergab sich für *RAD51D* hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens ein Cut-Off-Wert von 0,366. 40 Patientinnen (83,3%) wurden der Gruppe mit

einem Cut-Off-Wert von  $\leq 0,366$  zugeordnet. Das mediane progressionsfreie Überleben lag dort bei 14,6 Monaten (95%-KI=[11,6; 21,9]). Die RQ-Werte von acht Patientinnen (16,7%) waren  $> 0,366$ . In dieser Gruppe zeigte sich ein medianes progressionsfreie Überleben von 20,5 Monaten (95%-KI=[12,4; ]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte keine statistische Signifikanz ( $p=0,211$ ). Die Hazard Ratio betrug 0,52 (95%-KI=[0,18; 1,47]) (Abbildung 27).

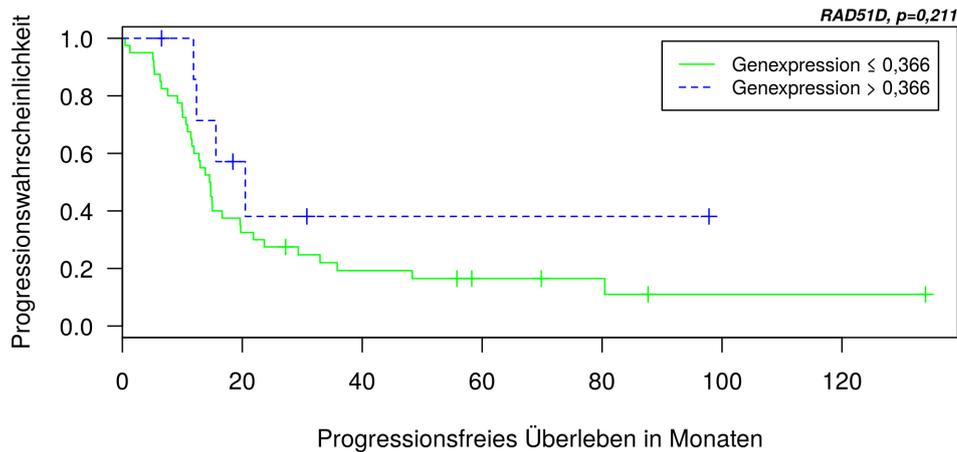


Abbildung 27: mRNA-Expression *RAD51D*, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte ( $n=48$ ),  $p=0,211$ ,  $HR=0,52$  (95%-KI=[0,18; 1,47])

**Zusammenfassung** Patientinnen mit niedriger mRNA-Expression von *BRIP1* im Tumorgewebe wiesen ein statistisch signifikant besseres progressionsfreies Überleben auf ( $HR=2,81$ ) (Tabelle 25).

Tabelle 25: Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit der mRNA-Expression in der Gesamtkohorte (n=48)

mRNA-Expression	Anzahl	Überleben (in Monaten)	p-Wert (Log Rank)	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b><i>ATM</i></b>	<b>48</b>		0,230	0,66 [0,34; 1,30]	0,225
niedrig	29	13,8			
hoch	19	19,7			
<b><i>BRCA1</i></b>	<b>48</b>		0,127	1,92 [0,82; 4,51]	0,158
niedrig	41	15,0			
hoch	7	13,0			
<b><i>BRCA2</i></b>	<b>48</b>		0,228	1,89 [0,66; 5,37]	0,198
niedrig	6	47,7			
hoch	42	14,5			
<b><i>BRIP1</i></b>	<b>48</b>		<b>0,019</b>	<b>2,81 [1,15; 6,89]</b>	<b>0,012</b>
niedrig	10	48,3			
hoch	38	13,0			
<b><i>CHEK2</i></b>	<b>48</b>		0,127	0,58 [0,28; 1,18]	0,147
niedrig	13	11,4			
hoch	35	19,6			
<b><i>RAD51C</i></b>	<b>48</b>		0,193	0,62 [0,30; 1,28]	0,215
niedrig	11	13,0			
hoch	37	15,6			
<b><i>RAD51D</i></b>	<b>48</b>		0,211	0,52 [0,18; 1,47]	0,181
niedrig	40	14,6			
hoch	8	20,5			

#### 4.2.6 Assoziation der mRNA-Daten mit den MLPA BRCAness Daten

Im Folgenden werden die mRNA-Expressionswerte mit den Ergebnissen des MLPA BRCA1ness Tests verglichen. Statistisch erfolgte der Vergleich anhand des exakten Test nach Fisher (Fisher 1922), welcher die mRNA-Expression unter Berücksichtigung des Cut-off-Wertes mit dem Ergebnis der MLPA (*BRCA1*-ähnlich/nicht-*BRCA1*-ähnlich) in Hinblick auf mögliche Assoziationen untersuchte (Tabelle 26). Bei einem p-Wert  $<0,05$  wurde von einem statistisch signifikanten Zusammenhang ausgegangen. Darüber hinaus wurden zur Berücksichtigung der absoluten RQ-Werte - vor allem in Hinblick auf Werte nahe des Cut-Off-Schwellenwerts - zusätzliche statistische Tests (Mann-Whitney-U-Test (Mann und Whitney 1947; Wilcoxon 1945)) durchgeführt. Auch hierbei wurde bei einem p-Wert  $<0,05$  vom einem statistisch signifikanten Zusammenhang ausgegangen. Die Ergebnisse des exakten Test nach Fisher zeigt Tabelle 26. Tabelle 27 fasst die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests zusammen. Die korrespondierenden Boxplots finden sich in Abbildung 28. Bei beiden Analysen wurden jeweils keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen.

Tabelle 26: Assoziation des MLPA BRCA1ness Tests mit mRNA-Expressionswerten, exakter Test nach Fisher, Gesamtkohorte (n=48)

mRNA-Expression	Anzahl	Ergebnis der MLPA		Odds Ratio	p-Wert
		nicht-BRCA1-ähnlich	BRCA1-ähnlich		
<b>ATM</b>	<b>48</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	1,24	0,772
niedrig	23	15	8		
hoch	25	15	10		
<b>BRCA1</b>	<b>48</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	1,97	0,369
niedrig	21	15	6		
hoch	27	15	12		
<b>BRCA2</b>	<b>48</b>	<b>30</b>	<b>18</b>		0,071
niedrig	6	6	0		
hoch	42	24	18		
<b>BRIP1</b>	<b>48</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	2,85	0,282
niedrig	10	8	2		
hoch	38	22	16		
<b>CHEK2</b>	<b>48</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	0,63	0,696
niedrig	41	25	16		
hoch	7	5	2		
<b>RAD51C</b>	<b>48</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	1,49	0,558
niedrig	27	18	9		
hoch	21	12	9		
<b>RAD51D</b>	<b>48</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	0,53	0,468
niedrig	10	5	5		
hoch	38	25	13		

Tabelle 27: Vergleich des MLPA BRCA1ness Tests mit mRNA-Expressionswerten, Mann-Whitney-U-Test, Gesamtkohorte (n=48)

Gen	mRNA-Expressionshöhe	Ergebnis der MLPA		p-Wert
		nicht-BRCA1-ähnlich (n=30)	BRCA1-ähnlich (n=18)	
<b>ATM</b>	Median	0,366	0,395	0,496
	IQA	0,275	0,185	
<b>BRCA1</b>	Median	0,742	1,260	0,113
	IQA	0,562	0,906	
<b>BRCA2</b>	Median	1,184	1,576	0,123
	IQA	1,152	1,325	
<b>BRIP1</b>	Median	0,741	1,155	0,207
	IQA	0,646	0,895	
<b>CHEK2</b>	Median	0,793	0,897	0,476
	IQA	0,614	0,325	
<b>RAD51C</b>	Median	0,430	0,459	0,958
	IQA	0,436	0,215	
<b>RAD51D</b>	Median	0,228	0,118	0,173
	IQA	0,196	0,055	

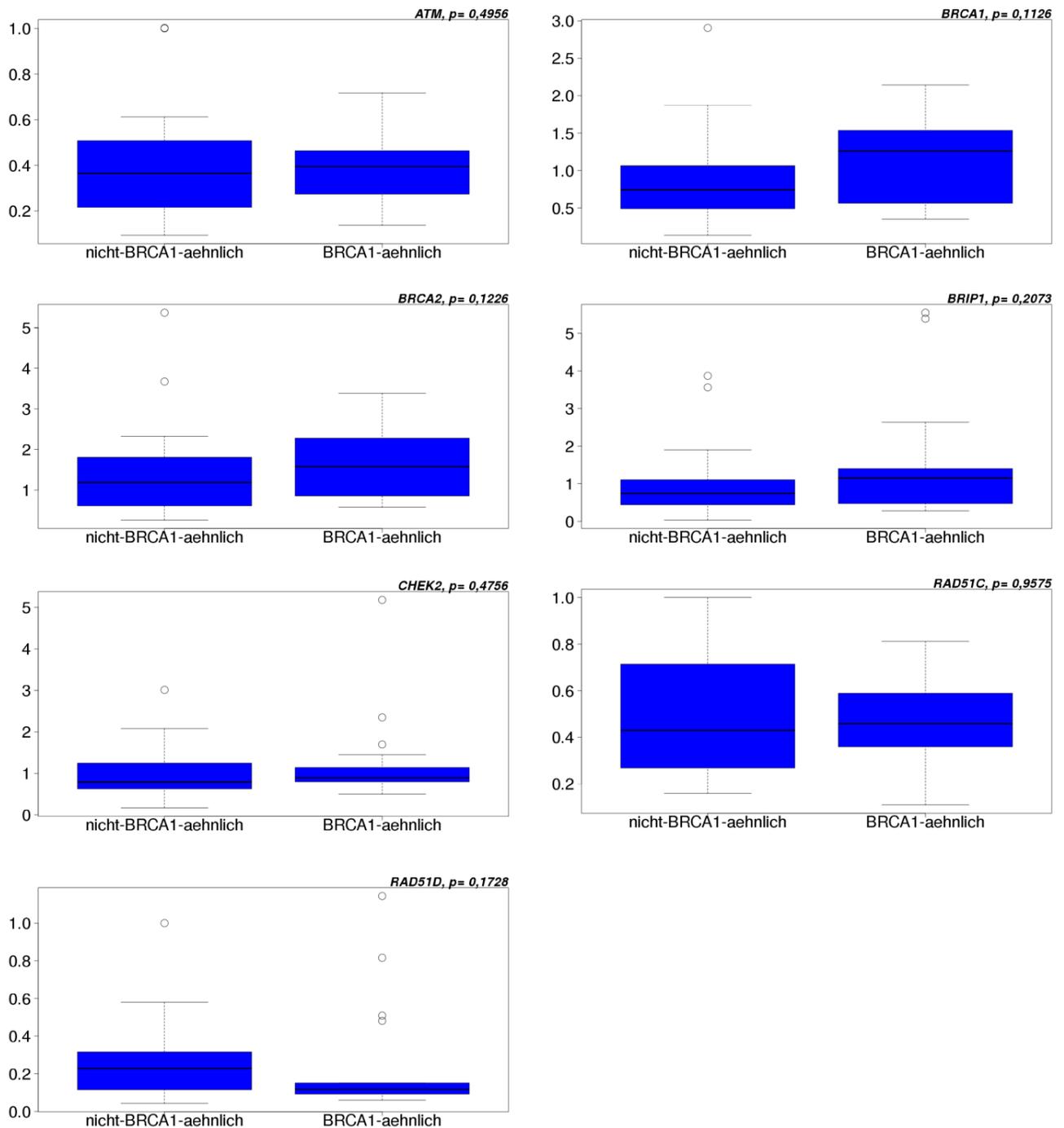


Abbildung 28: Mann-Whitney-U-Test,  $n=48$ , x-Achse: Ergebnis des MLPA BRCA1ness Test (BRCA1-ähnlich und nicht-BRCA1-ähnlich), y-Achse: RQ-Werte

#### 4.2.7 Korrelationsanalysen

Zur Untersuchung, ob zwischen den mRNA-Expressionswerten der sieben betrachteten Gene Korrelationen vorliegen, wurde für alle Beobachtungspaare der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet (Übersicht in Tabelle 28). Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ( $r_s$ ) ist ein Maß für die Stärke des Zusammenhangs zweier ordinalskalierten Variablen (Spearman

1904). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ( $r_s$ ) nimmt Werte zwischen -1 und +1 an. Für die mRNA-Expressionswerte des Beobachtungspaares *BRCA1* - *BRIP1* wurde ein  $r_s$  von 0.817 bestimmt ( $p < 0,05$ ). Zwischen der Höhe der mRNA-Expressionen von *BRCA1* und *BRIP1* liegt somit ein starker Zusammenhang vor. Das korrespondierende Streudiagramm für *BRCA1* - *BRIP1* ist in Abbildung 29 dargestellt. Die übrigen Beobachtungspaare wiesen keine statistisch signifikanten Korrelationen auf (Abbildung A.46).

Tabelle 28: Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten der mRNA-Expressionsdaten

	<i>ATM</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>CHEK2</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51D</i>
<i>ATM</i>	1,000	0,107	0,039	0,063	0,285	0,401	0,220
<i>BRCA1</i>	0,107	1,000	0,570	<b>0,817</b>	0,519	0,498	0,267
<i>BRCA2</i>	0,039	0,570	1,000	0,660	0,566	0,462	0,114
<i>BRIP1</i>	0,063	<b>0,817</b>	0,660	1,000	0,439	0,472	0,131
<i>CHEK2</i>	0,285	0,519	0,566	0,439	1,000	0,555	0,187
<i>RAD51C</i>	0,401	0,498	0,462	0,472	0,555	1,000	0,414
<i>RAD51D</i>	0,220	0,267	0,114	0,131	0,187	0,414	1,000

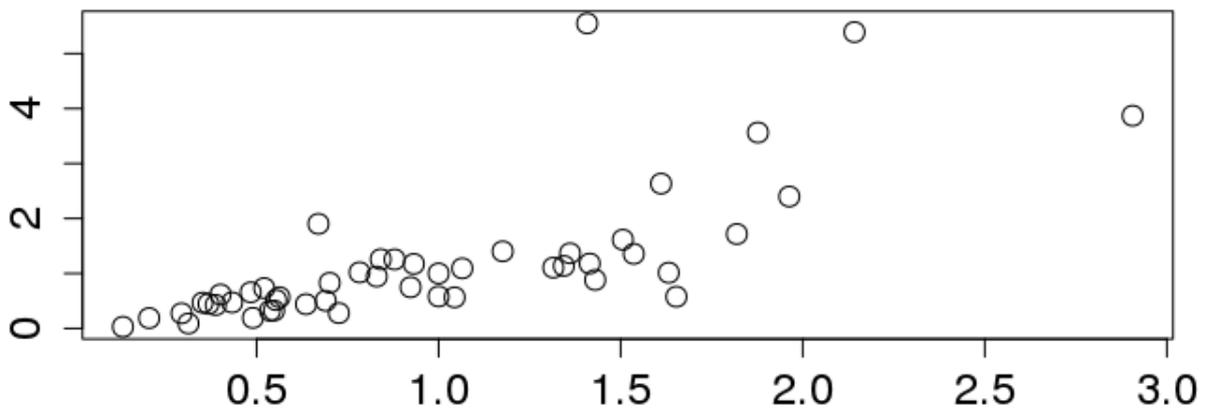


Abbildung 29: Streudiagramm der mRNA-Expressionswerte, x-Achse: RQ-Werte von *BRCA1*, y-Achse: RQ-Werte von *BRIP1*,  $r_s=0.817$ ,  $p < 0,05$

### 4.3 Klinisch-pathologische Parameter

#### 4.3.1 Gesamtüberleben

Das Gesamtüberleben wurde hinsichtlich acht klinischer Parameter (Alter, Aszites, Familienanamnese, Fernmetastasen, Histologie, Lymphknotenstatus, makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking und Z.n. Mammakarzinom) in der Gesamtkohorte evaluiert (Tabelle 29).

Tabelle 29: Gesamtüberleben, klinisch-pathologische Parameter

	Anzahl	Überleben (in Monaten)	p-Wert (Log Rank)	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b>Alter</b>	<b>49</b>		0,392	1,37 [0,67; 2,80]	0,386
<60 J.	18	36,9			
≥60 J.	31	29,3			
<b>Aszites</b>	<b>40</b>		0,822	0,92 [0,43; 1,95]	0,822
<500ml	19	35,8			
≥500ml	21	33,0			
<b>Familienanamnese<sup>1</sup></b>	<b>41</b>		0,355	0,69 [0,31; 1,53]	0,369
negativ	16	28,1			
positiv	25	48,6			
<b>Fernmetastasen</b>	<b>25</b>		0,329	1,70 [0,57; 5,00]	0,355
M0	18	29,6			
M1	7	22,8			
<b>Histologie<sup>2</sup></b>	<b>49</b>		0,097	0,52 [0,24; 1,14]	0,120
serös	38	36,9			
endometrioid	6	26,8			
andere	5	17,3			
<b>Lymphknotenstatus</b>	<b>39</b>		0,483	1,34 [0,60; 2,98]	0,476
N0	19	41,0			
N1	20	33,0			
<b>Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking<sup>3</sup></b>	<b>48</b>		0,109	1,81 [0,87; 3,77]	0,105
≤0cm	20	41,0			
>0 und <1cm	15	29,6			
≥1cm	13	19,4			
<b>Z.n. Mammakarzinom</b>	<b>40</b>		<b>0,005</b>	0,26 [0,10; 0,71]	0,004
nein	27	28,1			
ja	13	80,4			

<sup>1</sup>Familienanamnese: Informationen über Keimbahnmutationstestungen lagen nicht vor. Eine positive Familienanamnese war definiert als ein Mammakarzinom in der eigenen medizinischen Historie und/oder ein Verwandter mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinom (Harter et al. 2017), <sup>2</sup>Patientinnen mit einem serösen Tumor wurden mit Patientinnen mit einem nicht-serösen Tumor verglichen, <sup>3</sup>Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest wurden mit Patientinnen ohne einen makroskopischen Tumorrest verglichen

**Histologie** Basierend auf der Tumorhistologie wurden die Patientinnen in drei Gruppen eingeteilt: Bei 38 Patientinnen war die Tumorhistologie serös und bei sechs Patientinnen endometrioid. Die verbleibenden fünf Patientinnen mit einer anderen Histologie (muzinös, klarzellig, Karzinosarkom) wurden in einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst. Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom seröser Histologie zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 36,9 Monaten. Patientinnen mit einem endometrioiden Ovarialkarzinom wiesen ein medianes Gesamtüberleben von 26,8 Monaten auf. Patientinnen, deren Ovarialkarzinom eine andere Histologie aufwies (muzinös, klarzellig oder Karzinosarkom), hatten ein medianes Gesamtüberleben von 17,3 Monaten. Zwischen den Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom und den Patientinnen mit einem nicht-serösen Ovarialkarzinom war der Unterschied beim Gesamtüberleben statistisch nicht signifikant (Log Rank  $p=0,097$ ). Die Hazard Ratio betrug 0,52 (Abbildung 30).

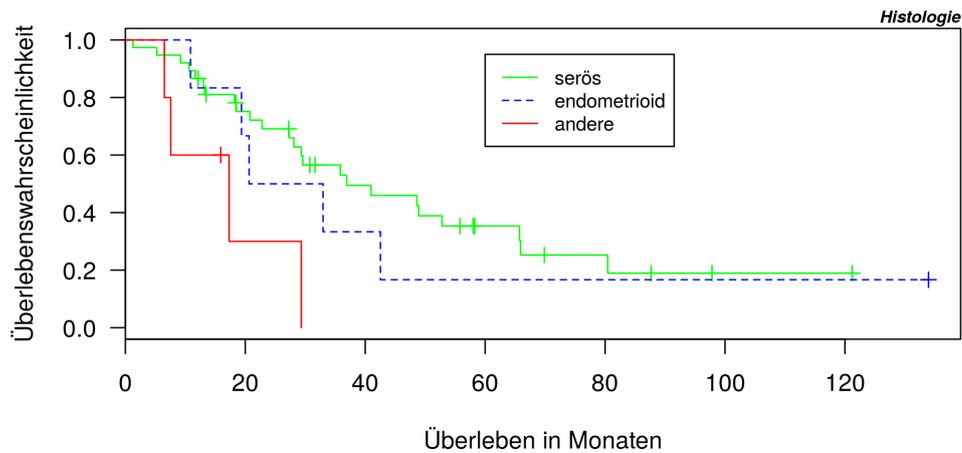


Abbildung 30: Tumorhistologie, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, n=49

**Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking** Bei 48 der 49 Patientinnen lagen Informationen über den Tumorrest nach chirurgischem Debulking in Form einer eindimensionalen Distanzmessung (in cm) vor. Basierend auf dem makroskopischen Tumorrest wurden die Patientinnen in drei Gruppen eingeteilt: Bei 20 Patientinnen war kein makroskopischer Tumorrest vorhanden ( $\leq 0\text{cm}$ ), bei 15 Patientinnen war die Größe des Tumorrestes  $>0$  und  $<1\text{cm}$  und bei 13 Patientinnen war die Größe des Tumorrestes  $\geq 1\text{cm}$ . Patientinnen ohne einen makroskopischen Tumorrest wiesen ein medianes Gesamtüberleben von 41,0 Monaten auf. Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest  $>0$  und  $<1\text{cm}$  zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 29,6 Monaten; Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest  $\geq 1\text{cm}$  ein medianes Gesamtüberleben von 19,4 Monaten. Zwischen den Patientinnen ohne einen makroskopischen Tumorrest und den Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest (unabhängig der Größe) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Log Rank  $p=0,105$ ). Die Hazard Ratio betrug 1,81 (Abbildung 31).

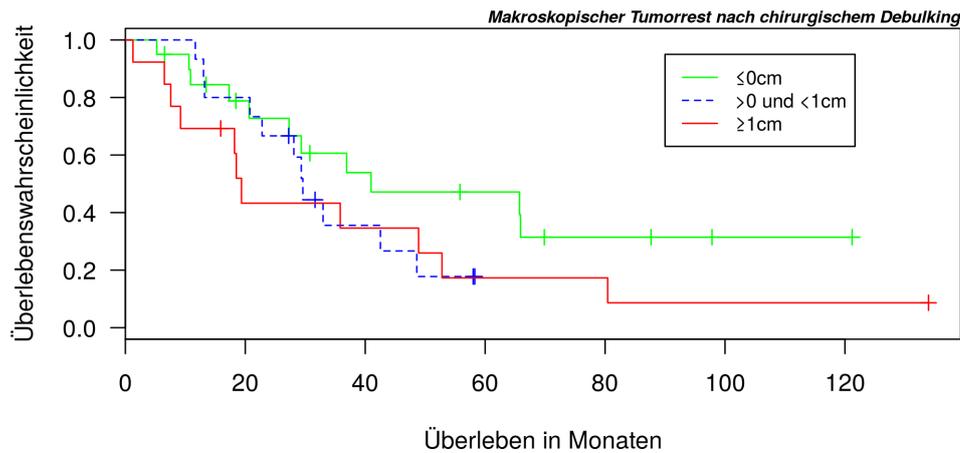


Abbildung 31: Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier,  $n=48$

**Zustand nach Mammakarzinom** In der Gesamtkohorte waren 13 Patientinnen mit einem Mammakarzinom in der medizinischen Vorgeschichte. 27 Patientinnen hatten in der Anamnese ein Mammakarzinom verneint. Bei neun Patientinnen war nicht bekannt, ob diese bereits an einem Mammakarzinom erkrankt waren oder nicht. Bei den Patientinnen mit Z.n. Mammakarzinom ( $n=13$ ) betrug das mediane Gesamtüberleben 80,4 Monate (95%-KI=[65,7; ]). Bei den Patientinnen ohne ein Mammakarzinom in der Anamnese ( $n=27$ ) lag das mediane Gesamtüberleben bei 28,1 Monaten (95%-KI=[19,4; 48,9]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ( $p=0,005$ ). Die Hazard Ratio betrug 0,26 (Abbildung 32).

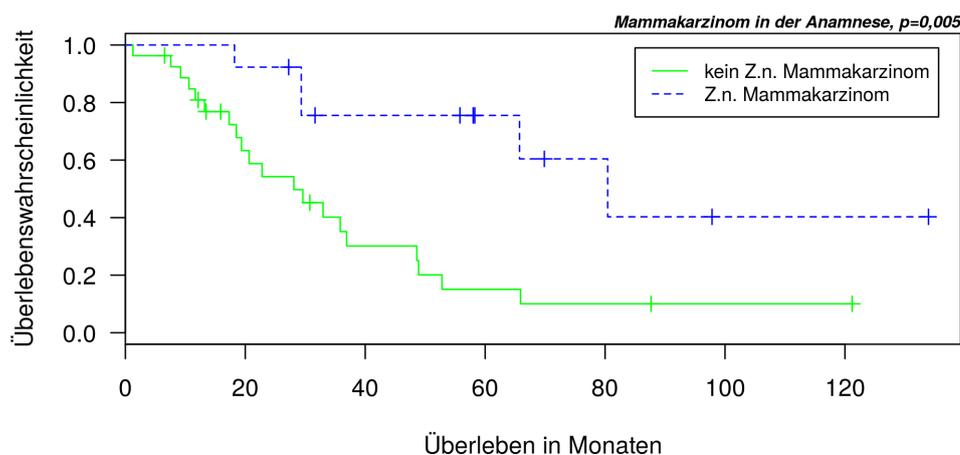


Abbildung 32: Zustand nach Mammakarzinom, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier,  $n=40$ ,  $p=0,005$ ,  $HR=0,26$

### 4.3.2 Progressionsfreies Überleben

Das progressionsfreie Überleben wurde hinsichtlich acht klinischer Parameter (Alter, Aszites, Familienanamnese, Fernmetastasen, Histologie, Lymphknotenstatus, makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking und Z.n. Mammakarzinom) in der Gesamtkohorte evaluiert (Tabelle 30).

Tabelle 30: Progressionsfreies Überleben, klinisch-pathologische Parameter

	Anzahl	Überleben (in Monaten)	p-Wert (Log Rank)	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b>Alter</b>	<b>49</b>		<b>0,596</b>	1,19 [0,62; 2,30]	0,593
<60 J.	18	15,0			
≥60 J.	31	13,8			
<b>Aszites</b>	<b>40</b>		<b>0,977</b>	0,99 [0,49; 2,02]	0,977
<500ml	19	14,5			
≥500ml	21	16,6			
<b>Familienanamnese<sup>1</sup></b>	<b>41</b>		<b>0,032</b>	0,46 [0,23; 0,95]	0,040
negativ	16	12,8			
positiv	25	19,6			
<b>Fernmetastasen</b>	<b>25</b>		<b>0,333</b>	1,62 [0,60; 4,37]	0,352
M0	18	14,6			
M1	7	11,9			
<b>Histologie<sup>2</sup></b>	<b>49</b>		<b>0,279</b>	0,67 [0,33; 1,38]	0,298
serös	38	15,0			
endometrioid	6	18,2			
andere	5	7,6			
<b>Lymphknotenstatus</b>	<b>39</b>		<b>0,743</b>	0,88 [0,42; 1,85]	0,743
N0	19	14,7			
N1	20	19,7			
<b>Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking<sup>3</sup></b>	<b>48</b>		<b>0,244</b>	1,49 [0,76; 2,92]	0,239
≤0cm	20	15,0			
>0 und <1cm	15	19,6			
≥1cm	13	13,8			
<b>Z.n. Mammakarzinom</b>	<b>40</b>		<b>0,001</b>	0,26 [0,11; 0,61]	0,0008
nein	27	12,8			
ja	13	80,4			

<sup>1</sup>Familienanamnese: Informationen über Keimbahnmutationstestungen lagen nicht vor. Eine positive Familienanamnese war definiert als ein Mammakarzinom in der eigenen medizinischen Historie und/oder ein Verwandter mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinom (Harter et al. 2017). <sup>2</sup>Patientinnen mit einem serösen Tumor wurden mit Patientinnen mit einem nicht-serösen Tumor verglichen, <sup>3</sup>Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest wurden mit Patientinnen ohne einen makroskopischen Tumorrest verglichen

**Histologie** Basierend auf der Tumorphistologie wurden die Patientinnen in drei Gruppen eingeteilt: Bei 38 Patientinnen war die Tumorphistologie serös und bei sechs Patientinnen endometrioid. Die verbleibenden fünf Patientinnen mit einer anderen Histologie (muzinös, klarzellig, Karzinosarkom) wurden in einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst. Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom seröser Histologie zeigten ein medianes progressionsfreies Überleben von 15,0 Monaten. Patientinnen mit einem endometrioiden Ovarialkarzinom wiesen ein medianes progressionsfreies Überleben von 18,2 Monaten auf. Patientinnen, deren Ovarialkarzinom eine andere

Histologie aufwies (muzinös, klarzellig oder Karzinosarkinom), hatten ein medianes progressionsfreies Überleben von 7,6 Monaten. Zwischen den Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom und den Patientinnen mit einem nicht-serösen Ovarialkarzinom war der Unterschied beim progressionsfreien Überleben statistisch nicht signifikant (Log Rank  $p=0,279$ ). Die Hazard Ratio betrug 0,67 (Abbildung 33).

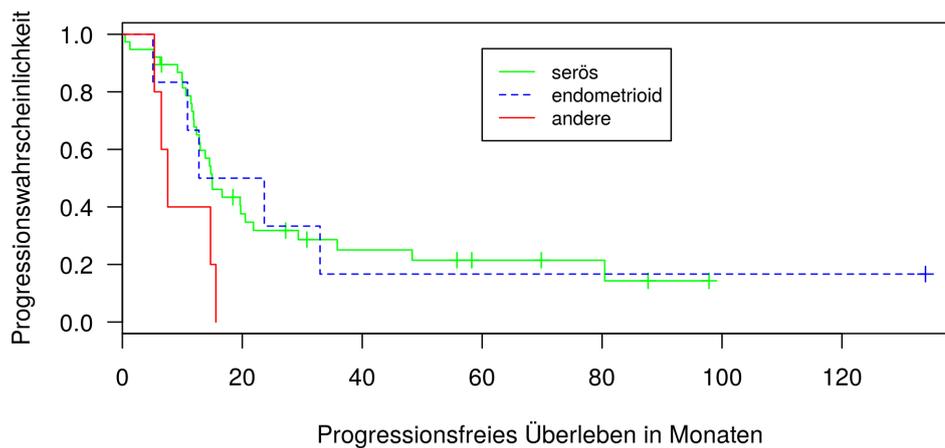


Abbildung 33: Tumorhistologie, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier,  $n=49$

**Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking** Bei 48 der 49 Patientinnen lagen Informationen über den Tumorrest nach chirurgischem Debulking in Form einer eindimensionalen Distanzmessung (in cm) vor. Basierend auf dem makroskopischen Tumorrest wurden die Patientinnen in drei Gruppen eingeteilt: Bei 20 Patientinnen war kein makroskopischer Tumorrest vorhanden ( $\leq 0\text{cm}$ ) und bei 15 Patientinnen bzw. 13 Patientinnen war die Größe des Tumorrestes  $>0$  und  $<1\text{cm}$  bzw.  $\geq 1\text{cm}$ . Patientinnen ohne einen makroskopischen Tumorrest wiesen ein medianes progressionsfreies Überleben von 15,0 Monaten auf. Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest  $>0$  und  $<1\text{cm}$  zeigten ein medianes progressionsfreies Überleben von 19,6 Monaten. Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest  $\geq 1\text{cm}$  hatten ein medianes progressionsfreies Überleben von 13,8 Monaten. Zwischen den Patientinnen ohne einen makroskopischen Tumorrest und den Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest (unabhängig der Größe) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Log Rank  $p=0,244$ ). Die Hazard Ratio betrug 1,49 (Abbildung 34).

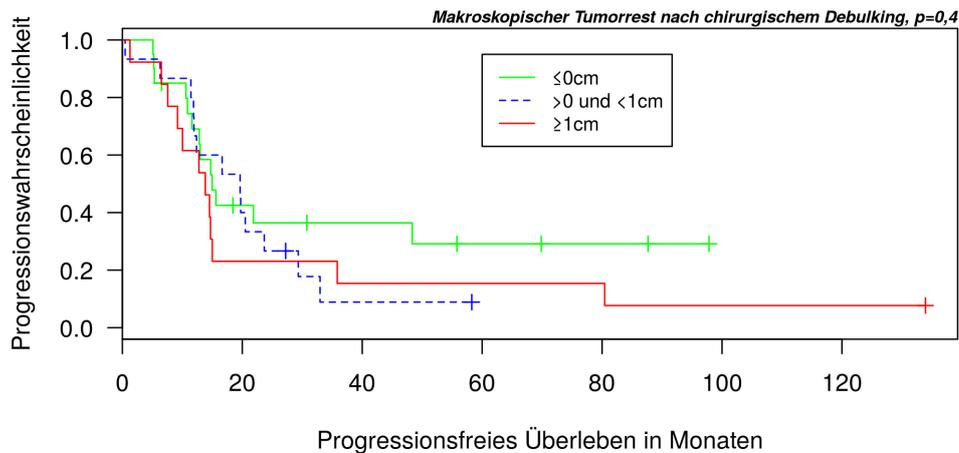


Abbildung 34: Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, n=48

**Familienanamnese** In der Gruppe mit positiver Familienanamnese (n=25) betrug die mediane progressionsfreie Überlebenszeit 19,6 Monate (95%-KI=[14,5; ]). In der Gruppe mit negativer Familienanamnese (n=16) zeigte sich ein medianes progressionsfreie Überleben von 12,8 Monaten (95%-KI=[10,0; 19,7]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant (p=0,032). Die Hazard Ratio betrug 0,46 (95%-KI=[0,23; 0,95]) (Abbildung 35).

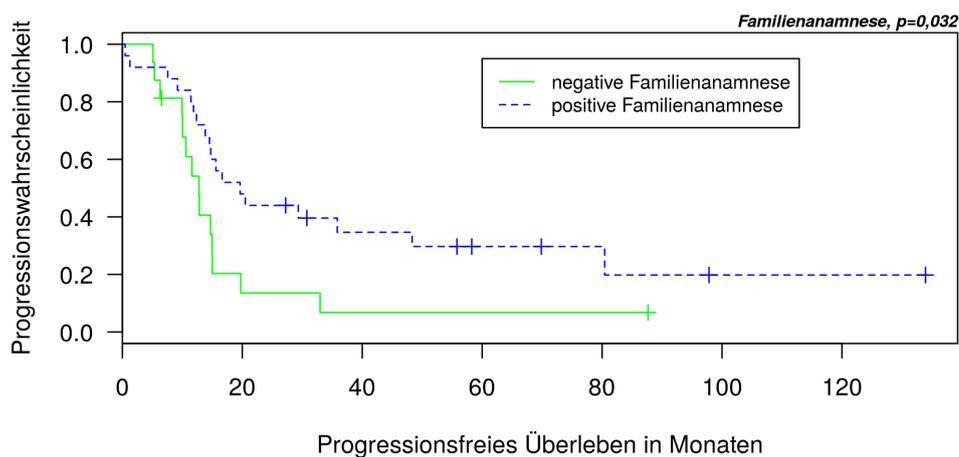


Abbildung 35: Familienanamnese, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, n=41, p=0,032, HR=0,46

**Zustand nach Mammakarzinom** In der Gruppe der Patientinnen mit einem Z.n. Mammakarzinom (n=13) war das mediane progressionsfreie Überleben 80,4 Monate (95%-KI=[16,6; ]). Bei den Patientinnen ohne ein Mammakarzinom in der Anamnese (n=27) betrug das mediane Ge-

samtüberleben 12,8 Monate (95%-KI=[10,6; 19,6]). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ( $p=0,001$ ). Die Hazard Ratio betrug 0,26 (95%-KI=[0,11; 0,61]) (Abbildung 36).

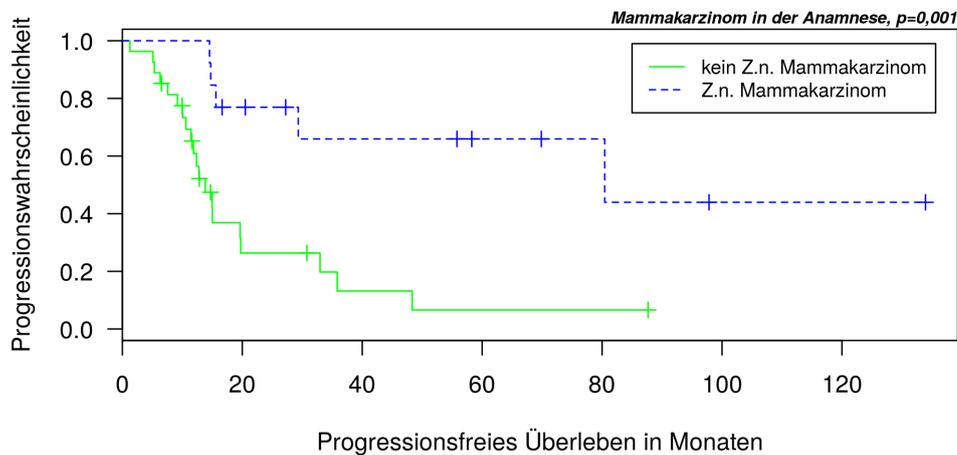


Abbildung 36: Zustand nach Mammakarzinom, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier,  $n=40$ ,  $p=0,001$ ,  $HR=0,26$

#### 4.4 Multivariable Cox-Regressionsanalyse

Die multivariable Cox-Regressionsanalyse untersucht mehrere Einflussgrößen auf das Überleben (Wei et al. 1989). Die Hazard Ratio wurde mit dem Cox Proportional-Hazard model errechnet (Cox 1972) und p-Werte wurde mit dem „likelihood ratio“-Test abgeschätzt (Listings 4 und 5) (Huelsenbeck und Crandall 1997). Pro stattgefundenen zehn „Events“ wurde eine Variable untersucht (Harrell et al. 1984; Peduzzi et al. 1996). Gene, die in den linearen Regressionanalyse einen p-Wert  $< 0,05$  aufwiesen, wurden in die multivariablen Analysen als mögliche Einflussgrößen miteingeschlossen. Das Ergebnis des MLPA BRCA1ness Tests und das Vorliegen eines makroskopischen Tumorrests nach chirurgischem Debulking, dessen prognostischer Wert in der Literatur als ausreichend belegt gilt (Rosen et al. 2014), wurden ebenfalls berücksichtigt.

##### 4.4.1 Gesamtüberleben

Da 33 Patientinnen im Beobachtungszeitraum verstorben sind (33 „Events“), wurden für das Gesamtüberleben jeweils drei Variablen ausgewählt und in einer multivariablen Analyse untersucht, wobei die in Frage kommenden Variablen in unterschiedlichen Konstellationen miteinander verglichen wurden (insgesamt drei Kombinationen). In den Tabellen 31, 32 und 33 sind die Ergebnisse der multivariablen Analysen dargestellt. In den multivariablen Analysen des Gesamtüberlebens waren hierbei die *BRIP1* mRNA-Expression ( $HR=4,38$ ,  $p=0,005$  und  $HR=2,86$ ,  $p=0,048$ ) sowie das Ergebnis des MLPA BRCA1ness Tests ( $HR=0,33$ ,  $p=0,008$ ) unabhängige prognostische Marker (Tabellen 31 und 32).

Tabelle 31: Multivariable Cox-Regressionsanalyse, Gesamtüberleben, Gesamtkohorte (n=48), Variablen: *BRIP1* mRNA-Expression, Ergebnis des MLPA *BRCA1*ness Test, makroskopischer Tumorrest

Variable	Anzahl	univariable Cox-Regression		multivariable Cox-Regression	
		Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b><i>BRIP1</i></b>	<b>48</b>	3,40 [1,27; 9,15]	<b>0,006</b>	4,38 [1,56; 12,32]	<b>0,005</b>
niedrig	10				
hoch	38				
<b>MLPA P376-B3 <i>BRCA1</i>ness</b>	<b>49</b>	0,55 [0,27; 1,14]	0,102	0,33 [0,14; 0,75]	<b>0,008</b>
nicht- <i>BRCA1</i> -ähnlich	30				
<i>BRCA1</i> -ähnlich	19				
<b>Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking</b>	<b>48</b>	1,81 [0,87; 3,77]	0,105	1,93 [0,86; 4,35]	0,118
≤0cm	20				
>0cm	28				

Tabelle 32: Multivariable Cox-Regressionsanalyse, Gesamtüberleben, Gesamtkohorte (n=48), Variablen: *BRIP1* mRNA-Expression, *RAD51C* mRNA-Expression, makroskopischer Tumorrest

Variable	Anzahl	univariable Cox-Regression		multivariable Cox-Regression	
		Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b><i>BRIP1</i></b>	<b>48</b>	3,40 [1,27; 9,15]	<b>0,006</b>	2,86 [1,01; 8,13]	<b>0,048</b>
niedrig	10				
hoch	38				
<b><i>RAD51C</i></b>	<b>48</b>	2,16 [1,04; 4,50]	<b>0,042</b>	1,58 [0,73; 3,46]	0,248
niedrig	27				
hoch	21				
<b>Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking</b>	<b>48</b>	1,81 [0,87; 3,77]	0,105	1,16 [0,52; 2,57]	0,717
≤0cm	20				
>0cm	28				

Tabelle 33: Multivariable Cox-Regressionsanalyse, Gesamtüberleben, Gesamtkohorte (n=48), Variablen: *BRIP1* mRNA-Expression, *BRCA1* mRNA-Expression, makroskopischer Tumorrest

Variable	Anzahl	univariable Cox-Regression		multivariable Cox-Regression	
		Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b><i>BRIP1</i></b>	<b>48</b>	3,40 [1,27; 9,15]	<b>0,006</b>	2,87 [0,91; 8,93]	0,071
niedrig	10				
hoch	38				
<b><i>BRCA1</i></b>	<b>48</b>	2,20 [1,04; 4,64]	<b>0,034</b>	1,24 [0,53; 2,91]	0,627
niedrig	21				
hoch	27				
<b>Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking</b>	<b>48</b>	1,81 [0,87; 3,77]	0,105	1,27 [0,58; 2,75]	0,550
≤0cm	20				
>0cm	28				

#### 4.4.2 Progressionsfreies Überleben

Bei 38 „Events“ im Beobachtungszeitraum wurden für das progressionsfreie Überleben drei Variablen ausgewählt und in einer multivariablen Analyse untersucht. In Tabelle 34 ist das Ergebnis der multivariablen Analyse dargestellt. Die *BRIP1* mRNA-Expression (HR=3,34, p=0,021) war hierbei ein unabhängiger prognostischer Marker (Tabelle 34).

Tabelle 34: Multivariable Cox-Regressionsanalyse, progressionsfreies Überleben, Gesamtkohorte (n=48), Variablen: *BRIP1* mRNA-Expression, *RAD51C* mRNA-Expression, makroskopischer Tumorrest

Variable	Anzahl	univariable Cox-Regression		multivariable Cox-Regression	
		Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert	Hazard Ratio [95%-KI]	p-Wert
<b><i>BRIP1</i></b>	<b>48</b>	2,81 [1,15; 6,89]	<b>0,012</b>	3,34 [1,20; 9,30]	<b>0,021</b>
niedrig	10				
hoch	38				
<b><i>RAD51C</i></b>	<b>48</b>	0,62 [0,30; 1,28]	0,215	0,46 [0,19; 1,10]	0,082
niedrig	11				
hoch	37				
<b>Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking</b>	<b>48</b>	1,49 [0,76; 2,92]	0,239	1,49 [0,68; 3,26]	0,317
≤0cm	20				
>0cm	28				

## 5 Diskussion

### 5.1 MLPA BRCA1ness Test

Eine große Herausforderung bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms stellt - neben des meist späten Diagnosezeitpunktes und des Vorkommens von Rezidiven - das häufige Auftreten einer Platinresistenz im weiteren Therapieverlauf dar. Die Kenntnis eines HRD bzw. eines „BRCAness“ Phänotyps ist von großer Relevanz, da klinische Konsequenzen (Welche Patientinnen profitieren von einer platinbasierten Therapie? Welchen Patientinnen kann eine nebenwirkungsreiche Behandlung erspart werden?) abgeleitet werden könnten: Ovarialkarzinome mit einer pathogenen *BRCA1*-Variante zeigen in der Regel eine hohe Sensitivität gegenüber Carboplatin, da ein DNA-Reparatur-defizienter Hintergrund die Tumorzellen besonders empfindlich gegenüber DNA-schädigenden Agenzien (wie sie platinbasierte Medikamente darstellen) macht. Darüber hinaus lassen neuere Studien vermuten, dass auch der Verlust anderer DNA-Reparaturgene einen *BRCA1*-ähnlichen Phänotyp hervorrufen könnte, der mit Platinsensitivität einhergeht (Pennington et al. 2014). Diese molekulare Eigenschaft wird mit dem Schlagwort „BRCAness“ (oder alternativ als HRD) bezeichnet. In Hinblick auf den MLPA BRCA1ness Test sollten im Rahmen dieser Arbeit mehrere Aspekte untersucht und diskutiert werden: Zunächst sollte evaluiert werden, ob der ursprünglich für das Mammakarzinom entwickelte MLPA BRCA1ness Test analog auch beim Ovarialkarzinom anwendbar ist und die Tumore in einen *BRCA1*-ähnlichen bzw. nicht-*BRCA1*-ähnlichen Phänotyp dichotomisieren kann. In einem nächsten Schritt sollte diskutiert werden, ob der MLPA BRCA1ness Test das Potential eines diagnostischen Tests zur Feststellung eines HRD bzw. „BRCAness“ Phänotyps beim Ovarialkarzinom hat. Zu diesen Zwecken sollte das Ergebnis des MLPA Tests mit klinisch-pathologischen Daten und den Ergebnissen der Genexpressionsuntersuchungen assoziiert und im Anschluss im Kontext der aktuellen Literatur bewertet werden. Des Weiteren sollte durch Überlebenszeitanalysen (Gesamtüberleben, progressionsfreies Überleben) der MLPA BRCA1ness Test hinsichtlich seiner prognostischen Wertigkeit evaluiert werden (Arbeitshypothese: ein *BRCA1*-ähnlicher Phänotyp ist mit einem besseren Überleben assoziiert).

#### 5.1.1 Anwendbarkeit des MLPA BRCA1ness Test beim Ovarialkarzinom

Die Rohdaten jeder einzelnen Probe wurden zu Qualitätszwecken mithilfe des von MRC Holland zur Verfügung gestellten „Quality Control Flowchart“ bewertet. Mit Ausnahme des Vorliegens von Q-Fragmenten außerhalb des Normbereichs bei 17 von 49 Proben wurden alle Anforderungen erfüllt. Die außerhalb des Normbereichs liegenden Q-Fragmente sind Hinweise auf eine zu gering eingesetzte DNA-Menge. Da alle sonstigen Qualitätsanforderungen dem Standard entsprachen, wurde auf eine Versuchswiederholung bei den genannten 17 Proben verzichtet. Das Vorliegen der erfüllten Qualitätsparameter wurde als Nachweis dafür gewertet, dass der MLPA BRCA1ness Test - ursprünglich für das Mammakarzinom konzipiert - rein technisch in unserer Kohorte aus Ovarialkarzinomen anwendbar ist und Ergebnisse liefert. Die Frage, ob und wie diese Ergebnisse zu interpretieren sind, ist Bestandteil der folgenden Ausführungen.

Der MLPA BRCA1ness Test klassifizierte 19 Proben (38,8%) als *BRCA1*-ähnlich und 30 Proben (61,2%) als nicht-*BRCA1*-ähnlich. Nach aktuellem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass rund 40-50% aller Ovarialkarzinome (unabhängig vom histologischen Subtyp) ein Defizit

der HR aufweisen, das zu einem „BRCAness“ Phänotyp führt (Elvin et al. 2017; Moschetta et al. 2016). Es ist jedoch festzuhalten, dass die Häufigkeitsangaben in der Literatur aufgrund unterschiedlicher Tests stark schwanken. Grundsätzlich ist die in dieser Arbeit mit der MLPA nachgewiesene Häufigkeit eines „BRCAness“ Phänotyp mit 38,8% vereinbar mit der aktuellen Literatur, allerdings sollten aufgrund der sehr geringen Stichzahl von  $n=49$  untersuchten Proben keine allgemeingültigen Schlüsse gezogen werden.

### 5.1.2 Assoziation des *BRCA1*-ähnlichen Phänotyps mit einem besseren Gesamtüberleben

Auf Grundlage vorangegangener Veröffentlichungen (Pennington et al. 2014; Swisher et al. 2017) wurde angenommen, dass ein *BRCA1*-ähnliches Tumorprofil ein HRD widerspiegeln könnte, welches wiederum mit einer besseren Sensitivität gegenüber platinhaltiger Chemotherapie und mit einem konsekutiv besseren Outcome assoziiert sein könnte. Mithilfe von Kaplan-Meier-Überlebenskurven und Cox-Regressionsanalysen wurde in drei Subgruppen diese Annahme untersucht und zudem in der multivariablen Analyse evaluiert, ob das Ergebnis der MLPA ggf. eine prognostische Wertigkeit besitzt. In der Gruppe der Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO-Stadium III/IV) konnte die Annahme des Überlebensvorteils bestätigt werden ( $p=0,036$ ). In der multivariablen Cox-Regressionsanalyse konnte in der Gesamtkohorte ein als *BRCA1*-ähnlich klassifiziertes Tumorprofil zudem als positive prognostische Variable für das Gesamtüberleben identifiziert werden.

Allerdings ist limitierend festzuhalten, dass die Ergebnisse der MLPA auf einer nicht für das Ovarialkarzinom etablierten Methode beruhen und durch eine andere Methode bestätigt werden sollten (siehe 5.1.5). In Hinblick auf die Ergebnisse der MLPA liegen zum Vergleich in der Literatur lediglich Ergebnisse für das Mammakarzinom vor: In einer Studie zum triple-negativen Mammakarzinom (TNBC) wiesen Patientinnen mit einem *BRCA1*-ähnlichen Profil ein statistisch signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben auf. Zudem wurde hier auf Grundlage multivariabler Analysen das Vorliegen eines *BRCA1*-ähnlichen Tumorprofils in der MLPA als ein negativer prognostischer Faktor aufgeführt (Mori et al. 2016). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte entweder auf die unterschiedlichen Tumorentitäten und/oder auf die verschiedenen Chemotherapeutika (anthrazyklinbasierte vs. platinhaltige Therapie) zurückzuführen sein.

### 5.1.3 *BRCA1*-ähnlicher Phänotyp und klinisch-pathologische Parameter

**Assoziation des *BRCA1*-ähnlichen Phänotyps mit einer positiven Familienanamnese** Zwischen dem Parameter Familienanamnese und dem Ergebnis der MLPA ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p=0,012$ ,  $OR=6,19$ , Tabelle 22). Eine positive Familienanamnese wurde definiert als ein Mammakarzinom in der Eigenanamnese und/oder mind. einem Verwandten mit einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom (Harter et al. 2017). Hervorzuheben ist, dass keine Informationen darüber vorlagen, ob bei den Patientinnen dieser Studie eine Testung auf Keimbahnmutationen in den Kerngenen durchgeführt wurde. Somit ist unklar, welche Patientinnen eine prädisponierende Keimbahnmutation in den bekannten Genen haben/hatten. Man könnte annehmen, dass eine positive Familienanamnese eine erbliche Prädisposition widerspiegelt, die in einem *BRCA1*-ähnlichen Phänotyp in der MLPA zu Tragen kommt. Um diese Annahme zu bestätigen, müssten die Patientinnen auf das Vorliegen einer Keimbahnmutation

(z.B. durch TruRisk® Gen-Panel) getestet werden. Auf Grundlage der aktuellen Empfehlungen des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs ist der Gentest für alle Patientinnen mit einer Ovarialkarzinomerkrankung vor dem 80. Geburtstag indiziert (Deutsches Konsortium: Familiärer Brust- und Eierstockkrebs 2020). Da die Mehrheit der Patientinnen zum Zensusdatum bereits verstorben waren (67,3%), ist davon auszugehen, dass mittlerweile weitere Patientinnen verstorben sind und die Testung auf Keimbahnmutationen zum jetzigen Zeitpunkt nicht mehr möglich ist.

**Fehlende Assoziation des *BRCA1*-ähnlichen Phänotyps mit einer serösen Histologie** Ovarialkarzinome mit einer serösen Histologie sind häufiger mit einem HRD assoziiert als Ovarialkarzinome mit einer anderen Histologie (Elvin et al. 2017). In dieser Studie konnte zwischen dem Ergebnis des MLPA *BRCA1*ness Test und der Histologie (serös/nicht-serös) in der betrachteten Gesamtkohorte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ( $p=0,729$ ,  $OR=0,71$ , Tabelle 22). Dieses Ergebnis könnte zum einen auf eine zu geringe Stichprobengröße zurückzuführen sein. Zum anderen ist der MLPA *BRCA1*ness Test beim Ovarialkarzinom (noch) nicht validiert (siehe 5.1.5).

#### 5.1.4 *BRCA1*-ähnlicher Phänotyp und mRNA-Expression

Zur genaueren molekularen Charakterisierung eines HRD bzw. eines „BRCAness“ Phänotyps sollte evaluiert werden, welche der sieben ausgewählten Gene (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *RAD51C* und *RAD51D*) herunterreguliert sind und mit einem „BRCAness“ Phänotyp assoziiert sind. Mithilfe von statistischen Tests (exakter Test nach Fisher, Mann-Whitney-U-Test) wurden die mRNA-Expressionen mit dem Ergebnis der MLPA (*BRCA1*-ähnliches ( $n=18$ ) bzw. nicht-*BRCA1*-ähnliches ( $n=30$ ) Tumorprofil im MLPA *BRCA1*ness Test) verglichen. Die Hypothese zu Beginn der Arbeit war, dass ein Zusammenhang zwischen einer niedrigen *BRCA1* mRNA-Expression und einem *BRCA1*-ähnlichen Tumorprofil besteht. Es wurde angenommen, dass (ohne Kenntnis der genauen zugrunde liegenden Genveränderung) eine reduzierte *BRCA1* mRNA-Expression in einer beeinträchtigten HR und somit in einem „BRCAness-Phänotyp“ resultieren würde. Diese Annahme konnte in den Analysen nicht bestätigt werden: Die Patientinnengruppen zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der *BRCA1* mRNA-Expression (Tabellen 26 und 27, Abbildung 28). Da der MLPA *BRCA1*ness Test ursprünglich für die Anwendung beim Mammakarzinom konzipiert und somit keine Daten für das Ovarialkarzinom vorliegen, muss für die Interpretation dieser Ergebnisse auf Daten für das Mammakarzinom zurückgegriffen werden. Beim Mammakarzinom wurde bislang nur die *BRCA1* mRNA-Expression (in Hinblick auf einen Zusammenhang mit dem MLPA *BRCA1*ness Test) evaluiert: In einer neueren Veröffentlichung konnte bei 151 untersuchten triple-negativen Mammakarzinomen ein *BRCA1*-ähnliches Tumorprofil im MLPA *BRCA1*ness Test mit einer statistisch signifikant niedrigeren *BRCA1* mRNA-Expression assoziiert werden (Tian et al. 2019). Des Weiteren zeigten in der Studie von E. H. Lips et al. 2011 alle 13 Mammakarzinome mit einer niedrigen *BRCA1* mRNA-Expression ein *BRCA1*-ähnliches Tumorprofil im MLPA *BRCA1*ness Test.

Neben der *BRCA1* mRNA-Expression wurden in dieser Arbeit analog die mRNA-Expressionen

der anderen Gene (*ATM*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*) mit dem Ergebnis des MLPA BRCA1ness Test verglichen. Die Überlegung war, dass sich auch pathogene Mutationen (somatisch oder in der Keimbahn) in anderen Genen der HR jeweils in einer reduzierten mRNA-Expression und einem HRD bzw. einem „BRCAness“-Phänotyp widerspiegeln würden. Anlass dieser Annahme war die Veröffentlichung von Pennington et al. 2014, bei der sich nicht nur das Vorliegen einer *BRCA1*- oder *BRCA2*-Keimbahnmutation, sondern auch der Nachweis einer somatischen Mutation bzw. Keimbahnmutation in anderen Genen der HR als Prädiktor für das Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie und das Gesamtüberleben darstellte. Das Ansprechen auf Chemotherapie gilt als indirekter Indikator von „BRCAness“ (Gelmon et al. 2011). In dieser Arbeit konnten jedoch keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den beiden Patientinnengruppen (*BRCA1*-ähnliches oder nicht-*BRCA1*-ähnliches Tumorprofil) und den jeweiligen mRNA-Expressionen der untersuchten Gene nachgewiesen werden (Tabellen 27 und 26, Abbildung 28). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein *BRCA1*-ähnliches Tumorprofil nicht mit einer reduzierten Genexpression eines bestimmten Gens der HR assoziiert werden. Dies könnte zum einen auf die geringe Stichprobenanzahl von n=49 zurückzuführen sein. Zum anderen ist nicht ausgeschlossen, dass das Ergebnis der MLPA, die initial für die Anwendung beim Mammakarzinom entwickelt wurde, in dieser Arbeit (teilweise) falsch negative oder falsch positive Ergebnisse erbracht hat und somit valide Daten als Grundlage für die durchgeführten statistischen Analysen fehlen (siehe 5.1.5).

### 5.1.5 Limitationen der Studie und Ausblick

Ob der MLPA BRCA1ness Test geeignet ist, ein *BRCA1*-ähnliches bzw. nicht-*BRCA1*-ähnliches Tumorprofil auf Grundlage von charakteristischen genomischen Deletionen bzw. Amplifikationen (genomische Signatur) beim Ovarialkarzinom zu identifizieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Für eine Validierung der Anwendbarkeit des MLPA BRCA1ness Tests beim Ovarialkarzinom ist es essentiell, die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse (*BRCA1*-ähnliches bzw. nicht-*BRCA1*-ähnliches Tumorprofil) zunächst mithilfe anderer Methoden zu evaluieren und ggf. Unterschiede herauszuarbeiten. Dies könnte z.B. durch eine aCGH oder eine SNP-Array-Analyse geschehen. Eine vergleichende Untersuchung der Proben mithilfe der seit kurzem zur Verfügung stehenden LOH-Scores (Mirza et al. 2016; Swisher et al. 2017) wäre eine weitere Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Arbeit einzuordnen. Die kürzliche Etablierung eines NGS-basierten homologen Rekombinationsassays, der den *BRCA1*-Mutationsstatus und den Anteil von genomweiten LOH in einem neuen Algorithmus kombiniert und so das Ansprechen auf PARP-Inhibitoren bei Patienten mit einem Ovarialkarzinomrezidiv vorhersagt (Swisher et al. 2017), gibt Anlass, das diagnostische Potential einer MLPA grundsätzlich kritisch zu diskutieren. Eine MLPA bietet zwar den Vorteil als kosteneffiziente (aktuelle Kosten einer MLPA Reaktion bei MRC Holland: EUR 12/USD 15) und robuste Methode ideal für die klinische Routineanwendung zu sein, jedoch erfordert sie die vorherige Festlegung auf die zu analysierenden genomischen Loci (E. H. Lips et al. 2011; Stuppia et al. 2012). Ein weiterer Nachteil gegenüber eines NGS-basierten Ansatzes stellt insbesondere die fehlende Möglichkeit einer parallelen Sequenzanalyse dar. Es bleibt abzuwarten, ob die MLPA als diagnostisches Tool im Allgemeinen und der MLPA BRCA1ness Test im Speziellen gegenüber NGS-basierten genom-

weiten Methoden in der Zukunft bestehen wird.

Das Ergebnis des durch den MLPA BRCA1ness Test kategorisierten Tumorprofils sollte zudem unbedingt in Zusammenschau mit potentiell vorliegenden Keimbahnmutationen und somatischen Mutationen von Genen der HR sowie epigenetischen Alterationen bewertet werden. Zur Identifizierung solcher könnten ein NGS-basiertes Multigen-Panel, eine Exom-Sequenzierung oder eine methylierungssensitive MLPA zum Einsatz kommen. Die Gegenüberstellung des auf Grundlage der MLPA bestimmten Tumorprofils und identifizierter genetischer Aberrationen könnte helfen, die Ätiologie eines BRCA1ness-Phänotyps bzw. die Ursache eines HRD auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Ein Verständnis des molekularen Pathomechanismus bildet die Grundlage um Patientinnen zu identifizieren, die von einer Therapie mit platinhaltiger Chemotherapie oder PARP-Inhibitoren profitieren würden.

## 5.2 Bestimmung der mRNA-Expressionswerte im Tumorgewebe

Spätestens seit dem Einzug der PARP-Inhibitoren in die klinische Routinediagnostik nimmt die personalisierte Tumorthherapie einen immer wichtiger werdenden Stellenwert bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms ein und die Identifizierung eines individuellen Tumorprofils ist zunehmend von klinischem Interesse. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Herunterregulation von ausgewählten Genen (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*), die an dem DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination beteiligt sind, mit einem besseren Überleben assoziiert sind. Hierzu wurden die Genexpressionen im Tumorgewebe bestimmt und anschließend in zwei Gruppen (niedrige bzw. hohe mRNA-Expression) dichotomisiert.

### 5.2.1 Überlebenszeitanalysen

**ATM** Zwischen den beiden Patientinnengruppen (niedrige bzw. hohe *ATM* mRNA-Expression im Tumor) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in Hinblick auf das Gesamt- sowie das progressionsfreie Überleben. In den univariaten Analysen wurde keine Assoziation mit dem Überleben nachgewiesen (Tabellen 24 und 25). In der Literatur liegen lediglich Daten zur prognostischen Wertigkeit der *ATM* mRNA-Expression bzw. der *ATM*-Proteinexpression bei anderen Tumorentitäten vor, wobei die Datenlage hierbei widersprüchlich ist. Beim Mammakarzinom wurden hohe *ATM* mRNA-Expressionswerte mit einem besseren Outcome assoziiert (Bueno et al. 2013; Ye et al. 2007). Beim Magenkarzinom konnte in einer randomisierten Phase-II-Studie, bei der die *ATM*-Proteinexpression in zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, bei Patienten, die einen Verlust der *ATM*-Proteinexpression im Tumor aufwiesen, ein verbessertes Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Bang et al. 2015). Dieses Ergebnis konnte jedoch in der anschließenden Phase-III-Studie nicht bestätigt werden (Bang et al. 2017). Zur weiterführenden Evaluierung eines prognostischen Stellenwertes der *ATM* mRNA-Expression speziell beim Ovarialkarzinom müsste die in dieser Arbeit betrachtete Patientinnenkohorte z.B. im Sinne einer Multicenterstudie wesentlich erweitert werden und neben der Untersuchung auf mRNA-Ebene ebenfalls auf Proteinebene untersucht werden.

Im Kontext des erblichen Brust- und Eierstockkrebs sind pathogene Keimbahnvarianten in *ATM* zwar mit einem 2-3fach erhöhten Brustkrebsrisiko, (bislang) jedoch nicht mit einem erhöhten Ovarialkarzinomrisiko assoziiert worden (Waha et al. 2018). Dies könnte in Zusammenschau mit

dem Ergebnis der Genexpressionsuntersuchungen gegebenenfalls ein Hinweis darauf sein, dass *ATM* bei der Genese des Ovarialkarzinoms keinen hohen Stellenwert hat.

**Assoziation einer niedrigen *BRCA1* mRNA-Expression mit einem besseren Gesamtüberleben** Zwischen den beiden Patientinnengruppen (niedrige bzw. hohe *BRCA1* mRNA-Expression im Tumor) zeigte sich beim Gesamtüberleben ein statistisch signifikanter Unterschied (Tabelle 24). In der univariaten Analyse wiesen Patientinnen mit einer niedrigen mRNA-Expression ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben auf (Tabelle 24). Beim progressionsfreien Überleben war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar und es zeigte sich in der univariaten Analyse keine Assoziation mit dem progressionsfreien Überleben (Tabelle 25). Die *BRCA1* mRNA-Expression wurde in die multivariable Cox-Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben miteingeschlossen, wobei die *BRCA1* mRNA-Expression sich nicht als unabhängiger prognostischer Marker zeigte (Tabelle 33). Obige Ergebnisse zur *BRCA1* mRNA-Expression sind sehr gut vereinbar mit den Daten vorangegangener Publikationen, insbesondere mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, die u.a. die *BRCA1* mRNA-Expression in 201 Ovarialkarzinomen evaluierte und in Hinblick auf eine mögliche Assoziation mit dem Gesamt- und progressionsfreien Überleben evaluierte (Tsibulak et al. 2018). Niedrige *BRCA1* mRNA-Werte waren mit einem statistisch signifikant besseren Gesamtüberleben, jedoch nicht mit einem statistisch signifikant besseren progressionsfreien Überleben verknüpft werden. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse in der Gesamtkohorte eine prognostische Wertigkeit der *BRCA1* mRNA-Expression dargestellt werden.

Es liegen einige weitere Studien zur Gen- (bzw. Protein-) expression von *BRCA1* im Ovarialkarzinom und zu seinem Stellenwert für das Überleben vor, die allesamt zu vergleichbaren Ergebnissen kamen und sich in Einklang mit den Daten dieser Arbeit präsentieren: Quinn et al. 2007 untersuchte bei 70 Patientinnen, die eine platinbasierte Chemotherapie erhielten, den Zusammenhang zwischen der *BRCA1* mRNA-Expression im Tumor und dem Überleben. Hierbei wiesen Patientinnen mit niedrigen bzw. intermediären *BRCA1*-mRNA-Werte im Tumor im Vergleich zu Patientinnen mit hohen *BRCA1*-mRNA-Werten ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben auf. In der Veröffentlichung konnte zudem bei Zellen mit einem Knockdown der *BRCA1* mRNA-Expression eine erhöhte Sensitivität gegenüber platinhaltiger Therapie nachgewiesen werden. In der retrospektiven Studie von Lesnock et al. 2013 wurde nachgewiesen, dass Patientinnen mit einer niedrigen *BRCA1*-Proteinexpression im Tumorgewebe (*BRCA1*-Immunfärbung in <10% der Tumorzellen) ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben bei einer intraperitonealen, platinbasierten Chemotherapie aufwiesen. In der Studie von Carser et al. 2011 wurde eine fehlende bzw. niedrige *BRCA1*-Proteinexpression (Immunhistochemie) im Tumorgewebe bei Patientinnen mit einer klassischen intravenösen platinhaltigen Chemotherapie mit einem statistisch signifikant besseren Gesamt- sowie progressionfreien Überleben assoziiert. Zudem wurde die *BRCA1* Immunfärbung als positiver prognostischer Marker in multivariablen Analysen nachgewiesen.

Als Erklärung für die Ergebnisse obiger Publikationen wird in den Veröffentlichungen diskutiert, dass niedrige bzw. fehlende *BRCA1* mRNA-Expressionswerte im Tumor eine beeinträchtigte HR zur Folge haben. Ausdruck der fehlerhaften HR wären eine hohe Sensitivität des Tumors gegenüber platinhaltiger Chemotherapie (Stichwort *synthetische Letalität*), die sich in einem verbesserten Outcome widerspiegelt. Gestützt wird diese Hypothese durch zahlreiche Veröffent-

lichungen, die bei Patientinnen mit einer *BRCA1*-Keimbahnmutation eine hohe Ansprechrate auf platinhaltige Chemotherapeutika und einem konsekutiv besseren Outcome gezeigt haben (Boyd et al. 2000; Cass et al. 2003; Chetrit et al. 2008; Harter et al. 2016; Tan et al. 2008; Vencken et al. 2011). Die dargestellten Ergebnisse gaben bzw. geben nach wie vor Anlass zu diskutieren, ob die *BRCA1* mRNA-Expression ein geeigneter prognostischer Marker zur Vorhersage des Ansprechens auf eine platinhaltige Chemotherapie darstellt. Da Platinsensitivität assoziiert ist mit einer Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren (Mirza et al. 2016), sollte die *BRCA1* mRNA-Expression als potentieller prognostischer Marker in Hinblick auf das Ansprechen auf PARP-Inhibitoren ebenfalls untersucht werden. Zusammenfassend reihen sich die Resultate der *BRCA1* mRNA-Expressionsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit in die Ergebnisse mehrerer Publikationen ein, wobei nur einige Studien explizit die *BRCA1* mRNA-Expression betrachten. Die *BRCA1* mRNA-Expression konnte zwar in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse als unabhängiger prognostischer Marker kandidat nicht bestätigt werden, allerdings könnte dies auch auf eine zu geringe Stichprobenzahl zurückzuführen sein.

***BRCA2*** Zwischen den beiden Patientinnengruppen (niedrige bzw. hohe *BRCA2* mRNA-Expression im Tumor) zeigte sich beim Gesamt- sowie progressionsfreien Überleben kein statistisch signifikanter Unterschied (Tabellen 24 und 25). Da sich in den univariaten Analysen keine statistische Signifikanz zeigte, wurde die *BRCA2* mRNA-Expression in die multivariablen Analysen nicht miteingeschlossen. Für die *BRCA2* Gen- bzw. Proteinexpression im Ovarialkarzinom liegen im Gegensatz zur *BRCA1* Gen- bzw. Proteinexpression in der Literatur nur sehr wenige Daten vor: In einer kürzlich veröffentlichten Studie mit 201 untersuchten Patientinnen (Behandlung mit platinhaltiger Chemotherapie) zeigten Patientinnen mit einer niedrigen *BRCA2* mRNA-Expression im Ovarialkarzinom ein statistisch signifikant besseres Gesamt- und progressionsfreies Überleben. Zudem konnte in der Subgruppe der Patientinnen mit einem high-grade serösen Ovarialkarzinom die *BRCA2* mRNA-Expression als unabhängiger prognostischer Parameter nachgewiesen werden (Tsibulak et al. 2018). In einer früheren Veröffentlichung zur *BRCA2* mRNA-Expression bei sporadischem Mammakarzinomen wurden niedrige *BRCA2* mRNA-Level mit einem statistisch signifikant besseren 5-Jahres-(krankheitsfreien)-Überleben assoziiert und die *BRCA2* mRNA-Level in der multivariablen Analysen als unabhängiger prognostischer Faktor nachgewiesen (Egawa et al. 2002). Die Resultate der beiden genannten Studien konnten in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, was gegebenenfalls auf die vergleichsweise geringe Stichprobenzahl von 49 untersuchten Tumorproben zurückzuführen ist. Vor dem Hintergrund der Studie von Tsibulak et al. 2018 scheint die *BRCA2* mRNA-Expression als prognostischer Marker zum gegenwärtigen Zeitpunkt vielversprechend und sollte in größer angelegten Studien weiter evaluiert werden.

***BRIP1* mRNA-Expression - prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom?** Zwischen den beiden Patientinnengruppen (niedrige bzw. hohe *BRIP1* mRNA-Expression im Tumor) zeigte sich beim Gesamt- sowie beim progressionsfreien Überleben jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied (Tabellen 24 und 25). Patientinnen mit einer niedrigen *BRIP1* mRNA-Expression im Tumor wiesen in den univariaten Analysen ein statistisch signifikant besseres Gesamt- sowie progressionsfreies Überleben auf (Tabellen 24 und 25). In den multivariablen Cox-Regressionsana-

lysen stellte sich die *BRIP1* mRNA-Expression als unabhängiger prognostischer Marker heraus (Tabellen 31 und 32).

Genannte Ergebnisse stehen in Einklang mit einer neueren Publikation, bei der u.a. die *BRIP1* mRNA-Expression in 99 Ovarialkarzinomen von Patientinnen, die im Anschluss mit platinhaltiger Chemotherapie (taxane-platinum oder platinum-cyclophosphamide) behandelt wurden, evaluiert wurde. In der Gruppe der Patientinnen, die eine Kombinationstherapie aus Taxanen/Carboplatin erhielten (n=22), waren erhöhte *BRIP1* mRNA-Level sowohl in der univariaten und als auch in der multivariablen Analyse mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Moes-Sosnowska et al. 2019). Auch in weiteren Tumorentitäten konnte ein Zusammenhang der *BRIP1* mRNA-Expression mit dem Outcome hergestellt werden: Beim luminalen Mammakarzinom wurden hohe *BRIP1* mRNA-Level mit einem statistisch signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Gupta et al. 2018). Bei mit 5-Fluoruracil (5-FU) behandelten Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom wurden erhöhte *BRIP1* mRNA-Level mit einem signifikant kürzeren krankheitsfreien Überleben verknüpft (Nakanishi et al. 2012).

Der beobachtete Zusammenhang aus hoher *BRIP1* mRNA- bzw. Proteinexpression und dem Tumorprogress lässt sich anhand der Funktion von BRIP1 nachvollziehen: BRIP1 nimmt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der DNA-Reparatur und des Zellzyklus ein (Peng et al. 2006). So konnte z.B. eine Stilllegung von *BRIP1* mit einer Inhibition von proapoptotischen Signalwegen und eine Überexpression von BRIP1 mit einer gesteigerten Zellproliferationsrate korreliert werden (Tu et al. 2011). Obige Ausführungen legen nahe, dass hohe *BRIP1* mRNA-Level im Tumorgewebe - vor allem bei Patienten mit platinhaltiger Chemotherapie - einen ungünstigen Faktor darstellen.

Interessanterweise wurde *BRIP1* erst neulich in familiären Fällen als Hochrisikogen für Eierstockkrebs, nicht aber für familiären Brustkrebs beschrieben (Weber-Lassalle et al. 2018): Loss-of-Function Keimbahnvarianten in *BRIP1* wurden mit einem deutlichen erhöhten Risiko (Odds Ratio=20,97), an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, assoziiert (Weber-Lassalle et al. 2018). Gegebenenfalls unterstreichen die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen die Rolle von *BRIP1* bei der Genese des Ovarialkarzinoms. Trotz genannten Stellenwertes von *BRIP1*-Keimbahnmutationen für das Ovarialkarzinom sind Veröffentlichungen zur *BRIP1* mRNA-Expression und ihrer Assoziation mit dem Überleben zum gegenwärtigen Zeitpunkt auf die Studie von Moes-Sosnowska et al. 2019 begrenzt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur *BRIP1* mRNA-Expression im Ovarialkarzinom leisten somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Rolle von *BRIP1* beim Ovarialkarzinom. Zudem verdeutlichen sie vor dem Hintergrund genannter Publikationen das Potential der *BRIP1* mRNA-Expression als prognostischen Marker.

**CHEK2** Zwischen den beiden Patientinnengruppen (niedrige bzw. hohe *CHEK2* mRNA-Expression im Tumor) zeigte sich beim Gesamt- sowie beim progressionsfreien Überleben kein statistisch signifikanter Unterschied (Tabellen 24 und 25). Da sich in den univariaten Analysen keine statistische Signifikanz zeigte, wurde die *CHEK2* mRNA-Expression in die multivariablen Analysen nicht miteingeschlossen. Eine mögliche Assoziation der *CHEK2* mRNA- bzw. Proteinexpression mit dem klinischen Outcome wurde beim Ovarialkarzinom bereits in mehreren Studien untersucht, wobei sich widersprüchliche Ergebnisse präsentierten. Hohe *CHEK2* mRNA-Level wurden in einer Studie mit 154 Tumoren sowohl in der univariablen als auch in

der multivariablen Analyse mit einem schlechteren rezidivfreien Überleben assoziiert. In einer anderen Veröffentlichung zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer hohen CHEK2-Proteinexpression und einem kürzeren Gesamtüberleben (Ehlén et al. 2011). In einer weiteren Studie mit 335 Patientinnen mit einem high-grade serösen Ovarialkarzinom wurde eine hohe CHEK2-Proteinexpression im Tumor mit einem schlechteren progressionsfreien- sowie Gesamtüberleben assoziiert (Davidson et al. 2018). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei in einer weiteren Veröffentlichung mit 125 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom kein statistisch signifikanter Zusammenhang der CHEK2-Proteinexpression mit dem Gesamt- bzw. progressionsfreien Überleben und eine hohe CHEK2-Proteinexpression war mit einem statistisch signifikant besseren Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie assoziiert (Alkema et al. 2014). Ein Zusammenhang zwischen einer erniedrigten CHEK2-Proteinexpression und einer Platinresistenz konnte in einer weiteren Veröffentlichung bei Ovarialkarzinomzelllinien aufgezeigt werden (Zhang et al. 2005). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass bislang noch keine einheitlichen Daten zur *CHEK2* mRNA-Expression und der Assoziation mit dem Ansprechen auf Chemotherapie/Überleben vorliegen. Die Resultate dieser Arbeit tragen nicht dazu bei, diese Widersprüche aufzulösen. Es kann nicht auszuschließen, dass die widersprüchlichen Ergebnisse auf unterschiedliche Methoden (mRNA-/Proteinexpression) und unterschiedliche Studienkollektive (z.B. Histologie, FIGO-Stadium) zurückzuführen sind.

In Zusammenhang mit erblichem Brust- und Eierstockkrebs ist *CHEK2* mit einem moderat erhöhten Brustkrebsrisiko, (bislang) jedoch nicht mit einem erhöhten Risiko für Eierstockkrebs assoziiert worden (Waha et al. 2018). Das Ergebnis der Genexpressionsuntersuchungen von *CHEK2* in dieser Studie könnte vor diesem Hintergrund ein weiterer Hinweis darauf sein, dass *CHEK2* bei der molekularen Genese des Ovarialkarzinoms ggf. keine relevante Rolle spielt.

***RAD51C* mRNA-Expression - prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom?** Zwischen den beiden Patientinnengruppen (niedrige bzw. hohe *RAD51C* mRNA-Expression im Tumor) zeigte sich beim Gesamtüberleben ein statistisch signifikanter Unterschied (Tabelle 24). In der univariaten Analyse wiesen Patientinnen mit einer niedrigen *RAD51C* mRNA-Expression ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben auf (Tabelle 24). In Hinblick auf das progressionsfreie Überleben zeigte sich zwischen den beiden Patientinnengruppen (niedrige bzw. hohe *RAD51C* mRNA-Expression im Tumor) hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied (Tabelle 25), sodass die *RAD51C* mRNA-Expression bei der multivariablen Analyse für das progressionsfreie Überleben nicht berücksichtigt wurde. Für das Ovarialkarzinom gibt es (bislang) keine Veröffentlichungen hinsichtlich einer Assoziation der *RAD51C* mRNA-Expression mit dem klinischen Outcome, sodass bei der Interpretation der Ergebnisse auf andere Tumorentitäten (nur Proteinexpression) zurückgegriffen werden muss. Insgesamt sind die oben dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit sehr gut vereinbar mit den Veröffentlichungen, bei denen die *RAD51C*-Proteinexpression in anderen Tumorerkrankungen untersucht wurde. Übereinstimmend ist eine reduzierte/fehlende *RAD51C* Proteinexpression mit einem besseren klinischen Outcome assoziiert worden: In einer Kohorte von Patienten-/innen mit der Diagnose eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und einer Behandlung mit platinhaltiger Chemotherapie war der Nachweis einer hohen *RAD51C*-Proteinexpression (in der Immunhistochemie) im Tumorgewebe mit dem Vorliegen einer Platinresistenz assoziiert. Des Weiteren war eine hohe *RAD51C*-Proteinexpression mit ei-

nem schlechteren Gesamt- sowie krankheitsfreien Überleben verknüpft und stellte in der multivariablen Analyse einen unabhängigen Prädiktor für das Überleben dar (Chen et al. 2016). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wiesen Mammakarzinompatientinnen, deren Tumor keine RAD51C-Proteinexpression (in der Immunhistochemie) aufwies, ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben auf. Zudem war die RAD51C-Proteinexpression in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben (Liao et al. 2018). Die beobachtete Assoziation zwischen einer hohen RAD51C-Expression und einem besseren Outcome unter Therapie mit platinhaltiger Chemotherapie lässt sich anhand der physiologischen Funktion von RAD51C gut herleiten: RAD51C spielt gemeinsam mit den anderen RAD51-Paralogen eine entscheidende Rolle bei der Initiation der HR (Formation des Nukleoproteinfilaments) (Sullivan und Bernstein 2018), sodass bei einer Dysfunktion bzw. einem Ausfall von RAD51C eine beeinträchtigte HR zu erwarten ist.

Die Ergebnisse der Überlebenszeitanalysen und der uni- bzw. multivariablen Analysen dieser Arbeit sind in Zusammenschau mit den oben genannten Veröffentlichungen vielversprechend und unterstützen die *RAD51C* mRNA-Expression als möglichen prognostischen Marker für das Ovarialkarzinom. In einem weiteren Schritt müssten nun die in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene nachgewiesenen Expressionsunterschiede auf Proteinebene (z.B. mittels Immunhistochemie) bestätigt werden. Zusätzlich müsste in Zellexperimenten nachgewiesen werden, dass Tumorzellen mit einer niedrigen RAD51C Expression eine erhöhte Sensitivität gegenüber platinhaltiger Chemotherapie und PARP-Inhibitoren aufweisen. Zur Untersuchung von RAD51C als potentieller prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom sind großangelegte Studien notwendig.

Im Kontext des erblichen Brust- und Eierstockkrebs ist für Trägerinnen einer pathogenen Keimbahnvariante in *RAD51C* ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms im Vergleich zur Normalbevölkerung (Odds Ratio von 5,2) beschrieben (Waha et al. 2018). Ein signifikant erhöhtes Risiko für Brustkrebs konnte bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden (Pelttari et al. 2011). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen dieser Studie könnte dies ein weiterer Hinweis darauf sein, dass *RAD51C* bei der Genese des Ovarialkarzinoms eine wichtige Rolle einnimmt.

**RAD51D** Zwischen den beiden Patientinnengruppen (niedrige bzw. hohe *RAD51D* mRNA-Expression im Tumor) zeigte sich beim Gesamt- sowie beim progressionsfreien Überleben kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildungen 20 und 27). Da sich in den univariaten Analysen keine statistische Signifikanz zeigte, wurde die *RAD51D* mRNA-Expression in die multivariablen Analysen nicht miteingeschlossen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ließen sich im Rahmen der Literaturrecherche keine Veröffentlichungen finden, die einen möglichen Zusammenhang zwischen der *RAD51D* mRNA-Expression im Ovarialkarzinom und dem Outcome untersucht haben. Auch bezüglich eines Zusammenhangs des Überlebens mit der *RAD51D* mRNA-Expression oder der RAD51D Proteinexpression in anderen Tumorgeweben fanden sich keine Studien. RAD51D ist eines von mehreren RAD51 Paralogen und hat gemeinsam mit diesen eine entscheidende Rolle bei der Initiation der HR (Formation des Nukleoproteinfilaments) (Sullivan und Bernstein 2018). Bei einer Dysfunktion von RAD51D wäre (analog wie bei RAD51C) eine beeinträchtigte HR mit einer hohen Sensitivität gegenüber platinhaltiger Chemotherapie und einem besseren Outcome

denkbar. Zur Bestätigung dieser Hypothese wären allerdings großangelegte Studien notwendig. Abschließend bleibt die Rolle der *RAD51D* mRNA-Expression im Kontext des Ovarialkarzinoms unklar.

### 5.2.2 Korrelation zwischen der *BRCA1* und *BRIP1* mRNA Expression

In der Korrelationsanalyse konnte zwischen der Höhe der mRNA-Expression von *BRCA1* und *BRIP1* ein starker positiver Zusammenhang nachgewiesen werden ( $r_s=0.817$ ,  $p < 0,05$ , Abbildung 29). Namensgebend interagiert BRIP1 (BRCA1-interacting protein 1) beim DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination mit BRCA1 (über BRCT Repeats) (Botuyan et al. 2004; Clapperton et al. 2004; Joo et al. 2002; Peng et al. 2006). Es ist gut denkbar, dass die auf mRNA-Ebene nachgewiesene starke Korrelation das Zusammenspiel auf Proteinebene widerspiegelt.

### 5.2.3 Limitationen der Studie und Ausblick

Die Berechnung der mRNA-Expressionsdaten erfolgte unter Verwendung der Methode der Relativen Quantifizierung (RQ), wobei ein Bezug zwischen der mRNA-Expression der einzelnen Proben und der Kalibratorprobe aufgestellt wurde (Livak und Schmittgen 2001). Die Kalibratorprobe war hierbei ein Borderlinetumor, da kein Normalgewebe als Bezugsgewebe vorhanden war. Zur Einordnung der Ergebnisse der mRNA-Expressionuntersuchungen aus Tumorgewebe wäre es hilfreich gewesen, diese zudem jeweils in Relation mit der mRNA-Expression im Normalgewebe zu betrachten und diese im Kontext der aktuellen Literatur zu bewerten: So zeigten sich bei einer Analyse der *BRCA1* und *BRCA2* mRNA-Expressionen im Ovarialkarzinom im Vergleich zum Normalgewebe statistisch signifikant höhere mRNA-Expressionslevel (Tsubulak et al. 2018). Als Ursache wurde diskutiert, dass aufgrund der hohen Proliferationsraten der Tumorzellen eine genomische Instabilität entsteht, die kompensatorisch zu einer Hochregulierung der DNA-Reparaturgene *BRCA1* und *BRCA2* führt (Gudas et al. 1995; Tsubulak et al. 2018). Dementsprechend könnte untersucht werden, ob eine hohe genomische Instabilität in Tumorzellen analog eine Hochregulierung anderer zentraler DNA-Reparaturgene verursacht.

Patientinnen mit niedrigen *BRIP1*, *BRCA1* bzw. *RAD51C* mRNA-Werten im Tumor wiesen ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben bzw. progressionsfreies Überleben (für *BRIP1*) auf. Es wurde unter Berücksichtigung vorangegangener Veröffentlichungen postuliert, dass die niedrigen mRNA-Level Ausdruck eines HRD sind, das sich in Platinsensitivität und einem konsekutiv besseren Überleben widerspiegelt. Eine Möglichkeit zur Überprüfung dieser Theorie wäre, die Platinsensitivität anhand klinischer Kategorien zu untersuchen und mit der mRNA-Expression zu vergleichen. Etablierte klinische Kategorien sind hierbei das platin-resistente (Rezidiv innerhalb der ersten sechs Monate nach Abschluss der initialen platinhaltigen Chemotherapie), platin-sensitive (Erkrankung spricht primär auf platinhaltige First-line-Chemotherapie an; Rezidiv frühestens sechs Monate nach Abschluss der platinhaltigen Chemotherapie) und platin-refraktäre (Erkrankung spricht nicht auf platinhaltige Chemotherapie an oder innerhalb von vier Wochen nach Ende der Therapie progredient) Ovarialkarzinome (Onkologie Leitlinienprogramm 2016). Für die Patientinnenkohorte dieser Arbeit lagen jedoch keine solchen klinischen Daten

vor, sodass zur Überprüfung der aufgestellten Hypothese ein anderer Ansatz gewählt werden müsste. Denkbar wäre z.B. die Untersuchung der Platinsensitivität durch in-vitro Versuche.

Mit der Zulassung des ersten PARP-Inhibitors Olaparib in Deutschland im Dezember 2014 und dem damit zunehmenden therapeutischen Stellenwert wäre es von großem klinischen Interesse gewesen, mit PARP-Inhibitoren behandelte Patientinnen in diese Arbeit zu integrieren und die Ergebnisse der Experimente (mRNA-Expressionsanalysen, MLPA BRCA1ness Test) auf eine Assoziation mit klinischen Daten (Überleben, Ansprechen auf PARP-Inhibitoren) dieser Patientinnen hin zu untersuchen. Da Olaparib etwa zeitgleich mit dem Beginn dieser Arbeit im Dezember 2014 in Deutschland zugelassen wurde, war ein solches Studiendesign leider nicht umsetzbar, könnte jedoch bei gegenwärtigen bzw. zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Grundsätzlich erfolgte in den letzten Jahren zur Identifizierung von potentiellen Biomarkern zunehmend die Abkehr von der Charakterisierung ausgewählter Einzelgenen hin zu komplexen Multiomics-Ansätzen, die Genom-, Transkriptom-, Metabolom- und Proteom-Daten im Rahmen von Big-Data-Analysen in Kombination miteinander bewerten (Nam 2017). Es ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit zur Bestimmung der mRNA-Label verwendete quantitative Echtzeit-PCR gegenüber Transkriptom-Analysen bzw. Multiomics-Ansätzen im Kontext der Biomarkerentdeckung nicht langfristig bestehen wird.

### 5.3 Klinisch-pathologische Parameter

Klinische Parameter wie das Patientinnenalter, die Größe des Tumorrests nach chirurgischem Debulking und die Histologie stellen etablierte klinische Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von klinisch-pathologischen Daten der Patientinnenkohorte erhoben. Daher sollte zusätzlich evaluiert werden, ob die prognostische Wertigkeit dieser Variablen in dieser spezifischen Patientinnenkohorte reproduziert werden können.

#### 5.3.1 Evaluierung von etablierten klinisch-pathologischen Prognoseparametern

**Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking** Die Größe des verbleibenden Tumorrests nach chirurgischem Debulking stellt einen etablierten Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom dar (Akahira et al. 2001; Chi et al. 2001). So weisen Patientinnen ohne einen makroskopischen Tumorrest nach tumorreduktiver Operation ein statistisch signifikant besseres Gesamt- und progressionsfreies Überleben auf (Winter et al. 2007). In dieser Arbeit konnten genannte Erkenntnisse obiger Publikationen nicht reproduziert werden: Bei der auf der Größe des makroskopischen Tumorrest basierenden Einteilung der Patientinnen in drei Gruppen ( $\leq 0\text{cm}$ ,  $>0$  und  $<1\text{cm}$ ,  $\geq 1\text{cm}$ ; angelehnt an die vorangegangenen Veröffentlichungen) zeigten zwar Patientinnen ohne einen makroskopischen Tumorrest ein besseres Gesamt- und progressionsfreies Überleben, allerdings waren die Unterschiede im Vergleich zu den Patientinnen mit einem makroskopischen Tumorrest statistisch nicht signifikant (Abbildungen 31 und 34). In den multivariablen Analysen konnte das Vorliegen eines makroskopischen Tumorrests anders als in obigen Veröffentlichungen nicht als Prognosefaktor bestehen (Tabellen 31 - 34). Wie anhand der Kaplan-Meier-Kurven zu entnehmen ist, war bei einer Stichprobenzahl von  $n=49$  sowohl beim Gesamt- als auch beim progressionsfreien Überleben eine Tendenz sichtbar. Es ist anzunehmen, dass die fehlende statistische

Signifikanz auf die geringe Stichprobenanzahl zurückzuführen ist.

**Alter** Das Alter bei Diagnosestellung gilt als etablierter prognostischer Faktor beim Ovarialkarzinom: Ein zunehmendes Alter wurde bereits in mehreren Studien mit einem erhöhten Sterberisiko sowie einem erhöhten Risiko für einen Krankheitsprogress assoziiert (Chi et al. 2001; Winter et al. 2007). In dieser Arbeit betrug das mittlere Patientinnenalter (zum Zeitpunkt der Operation) 59,7 Jahre. Aufgrund der geringen Patientinnenanzahl von  $n=49$  wurden die Patientinnen in zwei Gruppen ( $<60$  Jahre (36,7%) und  $\geq 60$  Jahre (63,3%)) eingeteilt und auf die Bildung von mehreren Gruppen (z.B.  $<40$  Jahre, 40-49 Jahre, 50-59 Jahre usw.) verzichtet. Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Operation jünger als 60 Jahre waren, zeigten zwar ein besseres Gesamt- sowie progressionsfreies Überleben (Tabellen 29 und 30), jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Die Dichotomisierung in lediglich zwei Gruppen ( $<60$  Jahre/ $\geq 60$  Jahre) wird der weiten Altersspanne von 26-77 Jahren ggf. nicht gerecht. Zur Bestätigung des Alters als prognostischer Parameter müsste die Kohorte dieser Arbeit wesentlich erweitert und in mehr als zwei Subgruppen unterteilt werden.

**Histologie** Die Histologie gilt als prognostischer Faktor beim Ovarialkarzinom: So zeigen Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom seröser Histologie im Vergleich zu Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom muzinöser oder klarzelliger Histologie ein statistisch signifikant besseres progressionsfreies sowie Gesamtüberleben. Im Vergleich zu Patientinnen mit einem endometrioiden Ovarialkarzinom haben Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom ein schlechteres progressionsfreies bzw. Gesamtüberleben (Winter et al. 2007). In dieser Arbeit konnten die genannten Unterschiede zwischen dem Überleben nur teilweise reproduziert werden: Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom (medianes Überleben: 36,9 Monate) zeigten sowohl gegenüber Patientinnen mit einem endometrioiden Ovarialkarzinom (medianes Gesamtüberleben: 26,8 Monate) als auch gegenüber Patientinnen mit einer anderen Tumorphistologie (klarzellig, muzinös, Karzinosarkom; medianes Gesamtüberleben: 17,3 Monate) ein besseres medianes Gesamtüberleben, wobei der Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 30). Beim progressionsfreien Überleben hatten Patientinnen mit einem endometrioiden Ovarialkarzinom - vereinbar mit genannter Veröffentlichung - das beste mediane Überleben (medianes Überleben: 18,2 Monate). Allerdings waren hier ebenfalls die Unterschiede statistisch nicht signifikant (Abbildung 33). Die Stichprobenzahl war in den einzelnen Gruppen mit  $n=38$ ,  $n=6$  und  $n=5$  sehr gering, sodass die fehlende statistische Signifikanz am ehesten auf die geringe Patientinnenanzahl zurückzuführen ist.

**Prognostische Bedeutung der Eigen- und Familienanamnese** 51% der Patientinnen dieser Arbeit wiesen eine positive Familienanamnese in Hinblick auf erblichen Brust- und Eierstockkrebs auf. Eine positive Familienanamnese war gegeben, wenn ein Mammakarzinom in der medizinischen Vorgeschichte und/oder mind. ein Verwandter mit einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom vorlag. Die Definition wurde in Übereinstimmung mit der Veröffentlichung von Harter et al. 2017 gewählt. In dieser Veröffentlichung war mit einer Häufigkeit von 43% die Anzahl der Patientinnen mit einer positiven Familienanamnese ähnlich hoch. Nach den aktuellen Empfehlungen des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs wären für

alle Patientinnen dieser Studie die Einschlusskriterien in eine sogenannte Hochrisikofamilie erfüllt („mindestens eine Frau mit Ovarialkarzinomerkrankung vor dem 80. Geburtstag“), sodass eine genetische Beratung bzw. ein Gentest auf das Vorliegen einer Keimbahnmutation in den Kerngenen indiziert wäre (Deutsches Konsortium: Familiärer Brust- und Eierstockkrebs 2020). Bei den Patientinnen dieser Studie lagen keine Informationen über eine mögliche Keimbahnmutation in den Kerngenen vor. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass die Behandlungen der Patientinnen im Klinikum rechts der Isar teilweise bis zum Jahr 2004 zurück reichen. Aufgrund der großen klinischen Relevanz sollte den noch lebenden Patientinnen bzw. den unmittelbaren Verwandten von verstorbenen Patientinnen auch zum jetzigen Zeitpunkt noch nachträglich eine genetische Beratung angeboten werden.

Die 13 Patientinnen (26,5%), die (vor der Diagnose des Ovarialkarzinoms) an einem Mammakarzinom erkrankt waren, hatten im Vergleich zu Patientinnen ohne ein Mammakarzinom in der medizinischen Vorgeschichte ein statistisch signifikant besseres Gesamt- und progressionsfreies Überleben (Abbildungen 32 und 36). Eine möglicher Erklärungsversuch ist, dass die Konstellation aus Mamma- und Ovarialkarzinom einen Hinweis auf das Vorliegen einer erblichen Prädisposition im Sinne einer pathogenen Keimbahnmutation in einem Gen der HR darstellt bzw. eine erbliche Prädisposition widerspiegelt. So ist hinreichend belegt, dass Patientinnen mit einer *BRCA1*-Keimbahnmutation eine hohe Ansprechrate auf platinhaltige Chemotherapeutika und ein konsekutiv besseres Überleben zeigen (Boyd et al. 2000; Cass et al. 2003; Chetrit et al. 2008; Harter et al. 2016; Tan et al. 2008; Vencken et al. 2011). Des Weiteren konnten Keimbahnmutationen in weiteren Genen der HR (u.a. *BRIP1*, *ATM*, *BRCA2*) ebenfalls mit Platinsensitivität und einem besseren Überleben assoziiert werden (Pennington et al. 2014). Allerdings bleibt ohne Kenntnis einer möglichen zugrunde liegenden Keimbahnmutation diese Annahme spekulativ.

### 5.3.2 Methodische Limitationen dieser Studie

**Bestimmung des Überlebens** Das Gesamtüberleben ist definiert als die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Versterben des Patienten (unabhängig der Todesursache) (Prentice 1989). Da bei den Patientinnen dieser Arbeit der Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht bekannt war, wurde alternativ der Zeitpunkt der Operation als Startpunkt des Gesamtüberlebens gewählt. Eine Diskrepanz zwischen diesen beiden Zeitpunkten ist nicht auszuschließen, sodass das in dieser Arbeit berechnete Gesamtüberleben das tatsächliche Gesamtüberleben in einigen Fällen gegebenenfalls nicht korrekt widerspiegelt.

Bei der Bestimmung des Tumorprogress als Endpunkt des progressionsfreien Überlebens bestehen grundsätzlich einige Herausforderungen (Korn und Crowley 2013). Eine einheitliche auf klinischen, sonographischen, histologischen, zytologischen oder radiologischen Befunden basierende Bestimmung des Tumorprogress ist hierbei Voraussetzung zur möglichst korrekten Berechnung des progressionsfreien Überlebens (Eisenhauer et al. 2009; Rustin et al. 2011). In dieser Arbeit fanden sich bei der Erhebung der klinisch-pathologischen Daten aus den Tumorregistern nur Angaben zum Zeitpunkt des Tumorprogress. Ob zur Bestimmung des Tumorprogress eine einheitliche Definition verwendet wurde, konnte retrospektiv nicht eruiert werden.

**Chemotherapeutika** Das in dieser Arbeit (Beginn Ende 2014) untersuchte Tumorgewebe entstammte Operationen aus einem Zeitraum von 2004 bis 2011. Bevacizumab und PARP-Inhibitoren wurden erst später als Bestandteil des Behandlungskonzepts zugelassen (Burger et al. 2011; J. Ledermann et al. 2012), sodass dementsprechend bei den Patientinnen dieser Arbeit allein Chemotherapeutika die medikamentöse Behandlung darstellten. Die Art der Chemotherapie war retrospektiv allerdings nicht bei allen Patientinnen vollständig zu rekonstruieren. Bei sieben Patientinnen (14,3%) lagen keinerlei Informationen über ein medikamentöses Behandlungskonzept vor, bei zwei Patientinnen (4,1%) war lediglich bekannt, dass ein anderes, nicht näher definiertes Chemotherapieschema als Paclitaxel/Carboplatin verwendet wurde (Tabelle 1). Die Ergebnisse dieser Arbeit (mRNA-Expressionsanalysen, MLPA BRCA1ness Test) wurden stellenweise auch im Kontext einer platinhaltigen Chemotherapie eingeordnet. Es ist zwar davon auszugehen, dass die platinbasierte Chemotherapie bei allen Patientinnen standardmäßig Bestandteil der Therapie war, Ausnahmen können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

## 6 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund des Einzuges von PARP-Inhibitoren in die Primärtherapie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom sowie der häufigen Platinresistenz im Therapieverlauf gewinnen diagnostische Tools zur Identifizierung eines „BRCAness“-Phänotyps bzw. eines HRD zunehmend an Bedeutung. Als erster Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob der für die Anwendung beim Mammakarzinom entwickelte MLPA BRCA1ness Test eine geeignete Methode zur Identifizierung eines „BRCAness“-Phänotyp beim Ovarialkarzinom darstellt. Die Verteilung der auf Grundlage der MLPA bestimmten Tumorprofile (*BRCA1*-ähnlich: 19 Proben (38,8%), nicht-*BRCA1*-ähnlich: 30 Proben (61,2%)) ist vereinbar mit den Häufigkeiten in der aktuellen Literatur, wonach 40-50% aller Ovarialkarzinome (unabhängig vom histologischen Subtyp) ein HRD aufweisen, das sich in einem „BRCAness“-Phänotyp widerspiegelt. Zwischen einer auffälligen Familienanamnese für Mamma- und Ovarialkarzinome und einem *BRCA1*-ähnlichen Tumorprofil konnte darüber hinaus ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Es wurde auf Grundlage von vorangegangenen Publikationen angenommen, dass niedrige mRNA-Expressionen der DNA-Reparaturgene mit einem *BRCA1*-ähnlichen Tumorprofil (sog. „BRCAness“-Phänotyp) verknüpft sein könnten. Die Ergebnisse der MLPA (*BRCA1*-ähnliches/nicht-*BRCA1*-ähnliches Tumorprofil) wurden daher auf eine mögliche Assoziation mit den mRNA-Expressionenwerten von sieben Kerngenen (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*) der homologen Rekombination evaluiert. Die Analysen konnten jedoch keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisen. Des Weiteren wurde angenommen, dass Patientinnen, deren Tumor ein „BRCAness“-Phänotyp (bzw. ein HRD) aufweist, ein besseres Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie und ein folglich besseres Outcome aufweisen. Diese Annahme konnte in der Kohorte der Patientinnen im FIGO Stadium III/IV beim Gesamtüberleben bestätigt werden. In der multivariablen Analyse beim Gesamtüberleben konnte das durch die MLPA bestimmte Tumorprofil als unabhängiger prognostischer Faktor bestehen. Zusammenfassend geben die dargestellten und größtenteils (trotz geringer Stichprobenzahl) vielversprechenden Ergebnisse Anlass, den MLPA BRCA1ness Test als mögliche Methode zum Nachweis eines BRCAness-Phänotyps beim Ovarialkarzinom mit einer zweiten Methode (z.B. array-CGH) zu bestätigen und in einer größeren

Kohorte zu evaluieren. In Anbetracht der seit kurzem zur Verfügung stehenden genomweiten diagnostischen Tools (Assays der genomischen Instabilität, Transkriptionsprofile) ist es jedoch unerlässlich, einen MLPA-basierten Ansatz auch kritisch zu diskutieren.

Nachdem - mit Ausnahme von etablierten klinischen Parametern (z.B. Tumorrest) - zuverlässige prognostische Faktoren beim Ovarialkarzinom fehlen und zudem spätestens seit dem Einzug der PARP-Inhibitoren in die Routinediagnostik die molekulare Tumorcharakterisierung von großem Interesse ist, sollte als zweiter Teil dieser Arbeit die mRNA-Expressionen von sieben relevanten Genen mit Beteiligung am DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination im Tumorgewebe evaluiert werden. Die mRNA-Expressionswerte wurden in niedrig bzw. hoch eingeteilt und anschließend hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben/Gesamtüberleben untersucht. Niedrige mRNA-Expressionswerte von *BRIP1*, *BRCA1* und *RAD51C* waren jeweils mit einem statistisch signifikant besseren Gesamtüberleben und niedrige mRNA-Expressionswerte von *BRIP1* zusätzlich mit einem statistisch signifikant besseren progressionsfreien Überleben assoziiert. Die *BRIP1* mRNA-Expression stellte darüber hinaus in der multivariablen Regressionsanalyse einen unabhängigen prognostischen Parameter dar. In Zusammenschau von vorangegangenen Publikationen, die beim Ovarialkarzinom sowie analog bei anderen Tumorentitäten eine niedrige *BRIP1* mRNA-Expression mit einem besseren Überleben assoziierten, unterstützen obige Ergebnisse das Potential der *BRIP1* mRNA-Expression als potentieller prognostischer Marker beim Ovarialkarzinom. Im Kontext des familiären Brust- und Eierstockkrebs wurden Keimbahnmutationen in *BRIP1* bzw. *RAD51C* interessanterweise mit einem signifikant erhöhten Risiko für das Auftreten von Eierstockkrebs, nicht jedoch mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko assoziiert, sodass diese beiden Gene gegenwärtig als „Ovarialkarzinomgene“ diskutiert werden. Gemeinsam mit den genannten Ergebnissen der mRNA-Genexpressionsuntersuchungen ist dies ein Hinweis, dass *BRIP1* und *RAD51C* eine wichtige Rolle bei der Genese des Ovarialkarzinoms spielen könnten. Die Resultate der mRNA-Expressionsanalysen von *BRIP1* und *RAD51C* sowie von *BRCA1* geben Anlass zur Evaluierung der Ergebnisse auf Proteinebene sowie in in größeren Kohorten.

## Literaturverzeichnis

- Akahira, J. I., H. Yoshikawa, Y. Shimizu, R. Tsunematsu, T. Hirakawa, H. Kuramoto, K. Shiromizu, K. Kuzuya, T. Kamura, Y. Kikuchi, S. Kodama, K. Yamamoto und S. Sato (2001). »Prognostic factors of stage IV epithelial ovarian cancer: a multicenter retrospective study«. In: *Gynecol. Oncol.* 81.3, S. 398–403.
- Alkema, N., T. Tomar, A. Van Der Zee, M. Everts, G. Meersma, H. Hollema, S. de Jong, M. van Vugt und G. Wisman (2014). »Checkpoint kinase 2 (Chk2) supports sensitivity to platinum-based treatment in high grade serous ovarian cancer«. In: *Gynecologic oncology* 133.3, S. 591–598.
- Audeh, M. W., J. Carmichael, R. T. Penson, M. Friedlander, B. Powell, K. M. Bell-McGuinn, C. Scott, J. N. Weitzel, A. Oaknin, N. Loman, K. Lu, R. K. Schmutzler, U. Matulonis, M. Wickens und A. Tutt (2010). »Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial«. In: *The Lancet* 376.9737, S. 245–251.
- Bang, Y. J., S. A. Im, K. W. Lee, J. Y. Cho, E. K. Song, K. H. Lee, Y. H. Kim, J. O. Park, H. G. Chun, D. Y. Zang, A. Fielding, J. Rowbottom, D. Hodgson, M. J. O'Connor, X. Yin und W. H. Kim (2015). »Randomized, double-blind phase II trial with prospective classification by ATM protein level to evaluate the efficacy and tolerability of olaparib plus paclitaxel in patients with recurrent or metastatic gastric cancer«. In: *Journal of clinical oncology* 33.33, S. 3858–3865.
- (2017). »Olaparib in combination with paclitaxel in patients with advanced gastric cancer who have progressed following first-line therapy (GOLD): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial«. In: *The lancet oncology* 18.12, S. 1637–1651.
- Bell, D., A. Berchuck, M. Birrer, J. Chien, D. Cramer, F. Dao, R. Dhir, P. DiSaia, H. Gabra, P. Glenn, A. Godwin, J. Gross, L. Hartmann, M. Huang, D. Huntsman, M. Iacocca, M. Imielinski, S. Kaloger, B. Karlan, D. Levine, G. Mills, C. Morrison, D. Mutch, N. Olvera, S. Orsulic, K. Park, N. Petrelli, B. Rabeno, J. Rader, B. Sikic, K. Smith-McCune, A. Sood, D. Bowtell, R. Penny, J. Testa, K. Chang, H. Dinh, J. Drummond, G. Fowler, P. Gunaratne, A. Hawes, C. Kovar, L. Lewis, M. Morgan, I. Newsham, J. Santibanez, J. Reid, L. Trevino, Y. Wu, M. Wang, D. Muzny, D. Wheeler, R. Gibbs, G. Getz, M. Lawrence, K. Cibulskis, A. Sivachenko, C. Sougnez, D. Voet, J. Wilkinson, T. Bloom, K. Ardlie, T. Fennell, J. Baldwin, S. Gabriel, E. Lander, L. L. Ding, R. Fulton, D. Koboldt, M. McLellan, T. Wylie, J. Walker, M. O'Laughlin, D. Dooling, L. Fulton, R. Abbott, N. Dees, Q. Zhang, C. Kandoth, M. Wendl, W. Schierding, D. Shen, C. Harris, H. Schmidt, J. Kalicki, K. Delehaunty, C. Fronick, R. Demeter, L. Cook, J. Wallis, L. Lin, V. Magrini, J. Hodges, J. Eldred, S. Smith, C. Pohl, F. Vandin, B. Raphael, G. Weinstock, E. Mardis, R. Wilson, M. Meyerson, W. Winckler, G. Getz, R. Verhaak, S. Carter, C. Mermel, G. Saksena, H. Nguyen, R. Onofrio, M. Lawrence, D. Hubbard, S. Gupta, A. Crenshaw, A. Ramos, K. Ardlie, L. Chin, A. Protopopov, J. Zhang, T. Kim, I. Perna, Y. Xiao, H. Zhang, G. Ren, N. Sathiamoorthy, R. Park, E. Lee, P. Park, R. Kucherlapati, M. Absher, L. Waite, G. Sherlock, J. Brooks, J. Li, J. Xu, R. Myers, P. W. Laird, L. Cope, J. Herman, H. Shen, D. Weisenberger, H. Noushmehr, F. Pan, T. Triche, B. Berman, D. Van Den Berg, J. Buckley, S. Baylin, P. Spellman, E. Purdom, P. Neuvial, H. Bengtsson, L. Jakkula, S. Durinck, J. Han, S. Dorton, H. Marr, Y. Choi, V. Wang, N. Wang, J. Ngai, J. Conboy, B. Parvin, H. Feiler, T. Speed, J. Gray, A. Levine, N. Socci, Y. Liang, B. Taylor, N. Schultz, L. Borsu, A. Lash, C. Brennan, A. Viale, C. Sander, M. Ladanyi, K. Hoadley, S. Meng, Y. Du, Y. Shi, L. Li, Y. Turman, D. Zang, E. Helms, S. Balu, X. Zhou, J. Wu, M. Topal, D. Hayes, C. Perou, G. Getz, D. Voet, G. Saksena, J. Zhang, H. Zhang, C. Wu, S. Shukla, K. Cibulskis, M. Lawrence, A. Sivachenko, R. Jing, R. Park, Y. Liu, P. Park, M. Noble, L. Chin, H. Carter, D. Kim, R. Karchin, P. Spellman, E. Purdom, P. Neuvial, H. Bengtsson, S. Durinck, J. Han, J. Korkola, L. Heiser, R. Cho, Z. Hu, B. Parvin, T. Speed, J. Gray, N. Schultz, E. Cerami, B. Taylor, A. Olshen, B. Reva, Y. Antipin, R. Shen, P. Mankoo, R. Sheridan, G. Ciriello, W. Chang, J. Bernanke, L. Borsu, D. Levine, M. Ladanyi, C. Sander, D. Haussler, C. Benz, J. Stuart, S. Benz, J. Sanborn, C. Vaske, J. Zhu, C. Szeto, G. Scott, C. Yau, K. Hoadley, Y. Du, S. Balu, D. Hayes, C. Perou, M. Wilkerson, N. Zhang, R. Akbani, K. Baggerly, W. Yung, G. Mills, J. Weinstein, R. Penny, T. Shelton, D. Grimm, M. Hatfield, S. Morris, P. Yena, P. Rhodes, M. Sherman, J. Paulauskis, S. Millis, A. Kahn, J. Greene, R. Sfeir, M. Jensen, J. Chen, J. Whitmore, S. Alonso, J. Jordan, A. Chu, J. Zhang, A. Barker, C. Compton, G. Eley, M. Ferguson, P. Fielding, D. Gerhard, R. Myles, C. Schaefer, K. Mills Shaw, J. Vaught, J. Vockley, P. Good, M. Guyer, B. Ozenberger, J. Peterson und E. Thomson (2011). »Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma«. In: *Nature* 474.7353, S. 609–615.

- Bois, A. du, J. P. Neijt und J. T. Thigpen (1999). »First line chemotherapy with carboplatin plus paclitaxel in advanced ovarian cancer a new standard of care?« In: *Annals of oncology* 10, S. 35–42.
- Bolton, K. L., G. Chenevix-Trench, C. Goh, S. Sadetzki, S. J. Ramus, B. Y. Karlan, D. Lambrechts, E. Despierre, D. Barrowdale, L. McGuffog, S. Healey, D. F. Easton, O. Sinilnikova, J. Benitez, M. J. Garcia, S. Neuhausen, M. H. Gail, P. Hartge, S. Peock, D. Frost, D. G. Evans, R. Eeles, A. K. Godwin, M. B. Daly, A. Kwong, E. S. Ma, C. Lazaro, I. Blanco, M. Montagna, E. D'Andrea, M. O. Nicoletto, S. E. Johnatty, S. K. Kjaer, A. Jensen, E. Hogdall, E. L. Goode, B. L. Fridley, J. T. Loud, M. H. Greene, P. L. Mai, A. Chetrit, F. Lubin, G. Hirsh-Yechezkel, G. Glendon, I. L. Andrulis, A. E. Toland, L. Senter, M. E. Gore, C. Gourley, C. O. Michie, H. Song, J. Tyrer, A. S. Whittemore, V. McGuire, W. Sieh, U. Kristoffersson, H. Olsson, ? Borg, D. A. Levine, L. Steele, M. S. Beattie, S. Chan, R. L. Nussbaum, K. B. Moysich, J. Gross, I. Cass, C. Walsh, A. J. Li, R. Leuchter, O. Gordon, M. Garcia-Closas, S. A. Gayther, S. J. Chanock, A. C. Antoniou, P. D. Pharoah, I. Campbell, M. Brown, G. Evans, J. Kirk, S. Lakhani, G. Lindeman, G. Mitchell, K. Phillips, M. Price, C. Saunders, M. Spurdle, G. Suthers und R. Milne (2012). »Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer«. In: *Jama* 307.4, S. 382–389.
- Botuyan, M. V. E., Y. Nominé, X. Yu, N. Juranic, S. Macura, J. Chen und G. Mer (2004). »Structural basis of BACH1 phosphopeptide recognition by BRCA1 tandem BRCT domains«. In: *Structure* 12.7, S. 1137–1146.
- Boulton, S., S. Kyle und B. W. Durkacz (1999). »Interactive effects of inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase on cellular responses to DNA damage«. In: *Carcinogenesis* 20.2, S. 199–203.
- Bowtell, D. D., S. Böhm, A. A. Ahmed, P. J. Aspuria, R. C. Bast, V. Beral, J. S. Berek, M. J. Birrer, S. Blagden, M. A. Bookman, J. D. Brenton, K. B. Chiappinelli, F. C. Martins, G. Coukos, R. Drapkin, R. Edmondson, C. Fotopoulou, H. Gabra, J. Galon, C. Gourley, V. Heong, D. G. Huntsman, M. Iwanicki, B. Y. Karlan, A. Kaye, E. Lengyel, D. A. Levine, K. H. Lu, I. A. McNeish, U. Menon, S. A. Narod, B. H. Nelson, K. P. Nephew, P. Pharoah, D. J. Powell, P. Ramos, I. L. Romero, C. L. Scott, A. K. Sood, E. A. Stronach und F. R. Balkwill (2015). »Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer«. In: *Nature Reviews Cancer* 15.11, S. 668–679.
- Boyd, J., Y. Sonoda, M. G. Federici, F. Bogomolny, E. Rhei, D. L. Maresco, P. E. Saigo, L. A. Almadrones, R. R. Barakat, C. L. Brown, D. S. Chi, J. P. Curtin, E. A. Poynor und W. J. Hoskins (2000). »Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer«. In: *Jama* 283.17, S. 2260–2265.
- Bryant, H. E., N. Schultz, H. D. Thomas, K. M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N. J. Curtin und T. Helleday (2005). »Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase«. In: *Nature* 434.7035, S. 913–917.
- Bueno, R., R. Canevari, R. Villacis, M. A. C. Domingues, J. Caldeira, R. Rocha, S. Drigo und S. R. Rogatto (2013). »ATM down-regulation is associated with poor prognosis in sporadic breast carcinomas«. In: *Annals of oncology* 25.1, S. 69–75.
- Burger, R. A., M. F. Brady, M. A. Bookman, G. F. Fleming, B. J. Monk, H. Huang, R. S. Mannel, H. D. Homesley, J. Fowler, B. E. Greer, M. Boente, M. J. Birrer und S. X. Liang (2011). »Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer«. In: *New England Journal of Medicine* 365.26, S. 2473–2483.
- Carsen, J. E., J. E. Quinn, C. O. Michie, E. J. O'Brien, W. G. McCluggage, P. Maxwell, E. Lamers, T. F. Lioe, A. R. Williams, R. D. Kennedy, C. Gourley und D. P. Harkin (2011). »BRCA1 is both a prognostic and predictive biomarker of response to chemotherapy in sporadic epithelial ovarian cancer«. In: *Gynecologic oncology* 123.3, S. 492–498.
- Cass, I., R. L. Baldwin, T. Varkey, R. Moslehi, S. A. Narod und B. Y. Karlan (2003). »Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma«. In: *Cancer* 97.9, S. 2187–2195.
- Chalasani, P. und R. Livingston (2013). »Differential chemotherapeutic sensitivity for breast tumors with “BRCAness”: a review«. In: *The oncologist* 18.8, S. 909–916.
- Chambon, P., J. Weill und P. Mandel (1963). »Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme«. In: *Biochemical and biophysical research communications* 11.1, S. 39–43.
- Chen, X., D. Qian, J. Cheng, Y. Guan, B. Zhang, X. Ding, J. Zeng, X. Chen, P. Er, F. Zhang, N. Zhao, X. Chen, L. Zhao, Z. Yuan, Q. Pang und P. Wang (2016). »High expression of Rad51c predicts poor prognostic outcome

- and induces cell resistance to cisplatin and radiation in non-small cell lung cancer«. In: *Tumor Biology* 37.10, S. 13489–13498.
- Chetrit, A., G. Hirsh-Yechezkel, Y. Ben-David, F. Lubin, E. Friedman und S. Sadetzki (2008). »Effect of BRCA1/2 mutations on long-term survival of patients with invasive ovarian cancer: the national Israeli study of ovarian cancer«. In: *Journal of Clinical Oncology* 26.1, S. 20–25.
- Chi, D. S., J. B. Liao, L. F. Leon, E. S. Venkatraman, M. L. Hensley, D. Bhaskaran und W. J. Hoskins (2001). »Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma«. In: *Gynecologic oncology* 82.3, S. 532–537.
- Chiang, J. W., B. Y. Karlan, L. Cass und R. L. Baldwin (2006). »BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis«. In: *Gynecologic oncology* 101.3, S. 403–410.
- Clapperton, J. A., I. A. Manke, D. M. Lowery, T. Ho, L. F. Haire, M. B. Yaffe und S. J. Smerdon (2004). »Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer«. In: *Nature structural & molecular biology* 11.6, S. 512.
- Coleman, R. L., M. W. Sill, K. Bell-McGuinn, C. Aghajanian, H. J. Gray, K. S. Tewari, S. C. Rubin, T. J. Rutherford, J. K. Chan, A. Chen und E. M. Swisher (2015). »A phase II evaluation of the potent, highly selective PARP inhibitor veliparib in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer in patients who carry a germline BRCA1 or BRCA2 mutation—an NRG oncology/gynecologic oncology group study«. In: *Gynecologic oncology* 137.3, S. 386–391.
- Costa, A. A. da, C. V. Valadares, G. Baiocchi, H. Mantoan, A. Saito, S. Sanches, A. P. Guimarães und M. I. W. Achatz (2015). »Neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery and the risk of platinum resistance in epithelial ovarian cancer«. In: *Annals of surgical oncology* 22.3, S. 971–978.
- Couch, F. J., H. Shimelis, C. Hu, S. N. Hart, E. C. Polley, J. Na, E. Hallberg, R. Moore, A. Thomas, J. Lilyquist, B. Feng, R. McFarland, T. Pesaran, R. Huether, H. LaDuca, E. C. Chao, D. E. Goldgar und J. S. Dolinsky (2017). »Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer«. In: *JAMA oncology* 3.9, S. 1190–1196.
- Cox, D. R. (1972). »The statistical analysis of dependencies in point processes«. In: *Stochastic point processes* 55, S. 66.
- Cunha Colombo Bonadio, R. R. da, R. N. Fogace, V. C. Miranda und M. d. P. E. Diz (2018). »Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: a review of its epidemiology and management«. In: *Clinics* 73.
- Davidson, B., M. Bjørnerem, A. Holth, E. Hellesylt, T. E. H. Falkenthal und V. A. Flørenes (2018). »Expression, activation and clinical relevance of CHK1 and CHK2 in metastatic high-grade serous carcinoma«. In: *Gynecologic oncology* 150.1, S. 136–142.
- Deutsches Konsortium: Familiärer Brust- und Eierstockkrebs (2020). *Erkennung von Genveränderungen durch einen Gentest*. URL: <https://www.konsortium-familiaerer-brustkrebs.de/informationen/gentest-einschlusskriterien> (aufgerufen am 19.01.2020).
- Du Bois, A., A. Reuss, E. Pujade-Lauraine, P. Harter, I. Ray-Coquard und J. Pfisterer (2009). »Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO)«. In: *Cancer* 115.6, S. 1234–1244.
- Easton, D. F., F. Lesueur, B. Decker, K. Michailidou, J. Li, J. Allen, C. Luccarini, K. A. Pooley, M. Shah, M. K. Bolla, Q. Wang, J. Dennis, J. Ahmad, E. R. Thompson, F. Damiola, M. Pertesi, C. Voegelé, N. Mebirouk, N. Robinot, G. Durand, N. Forey, R. N. Luben, S. Ahmed, K. Aittomäki, H. Anton-Culver, V. Arndt, C. Baynes, M. W. Beckman, J. Benitez, D. Van Den Berg, W. J. Blot, N. V. Bogdanova, S. E. Bojesen, H. Brenner, J. Chang-Claude, K. S. Chia, J. Y. Choi, D. M. Conroy, A. Cox, S. S. Cross, K. Czene, H. Darabi, P. Devilee, M. Eriksson, P. A. Fasching, J. Figueroa, H. Flyger, F. Fostira, M. Garcia-Closas, G. G. Giles, G. Glendon, A. Gonzalez-Neira, P. Guenel, C. A. Haiman, P. Hall, S. N. Hart, M. Hartman, M. J. Hooning, C. N. Hsiung, H. Ito, A. Jakubowska, P. A. James, E. M. John, N. Johnson, M. Jones, M. Kabisch, D. Kang, V. M. Kosma, V. Kristensen, D. Lambrechts, N. Li, A. Lindblom, J. Long, A. Lophatananon, J. Lubinski, A. Mannermaa, S. Manoukian, S. Margolin, K. Matsuo, A. Meindl, G. Mitchell, K. Muir, I. Nevelsteen, A. van den Ouweland, P. Peterlongo, S. Y. Phuah, K. Pykäs, S. M. Rowley, S. Sangrajrang, R. K. Schmutzler, C. Y. Shen, X. O. Shu, M. C. Southey, H. Surowy, A. Swerdlow, S. H. Teo, R. A. Tollenaar, I. Tomlinson, D. Torres, T. Truong,

- C. Vachon, S. Verhoef, M. Wong-Brown, W. Zheng, Y. Zheng, H. Nevanlinna, R. J. Scott, I. L. Andrulis, A. H. Wu, J. L. Hopper, F. J. Couch, R. Winqvist, B. Burwinkel, E. J. Sawyer, M. K. Schmidt, A. Rudolph, T. Dörk, H. Brauch, U. Hamann, S. L. Neuhausen, R. L. Milne, O. Fletcher, P. D. Pharoah, I. G. Campbell, A. M. Dunning, F. Le Calvez-Kelm, D. E. Goldgar, S. V. Tavtigian und G. Chenevix-Trench (2016). »No evidence that protein truncating variants in BRIP1 are associated with breast cancer risk: implications for gene panel testing«. In: *Journal of medical genetics* 53.5, S. 298–309.
- Egawa, C., Y. Miyoshi, T. Taguchi, Y. Tamaki und S. Noguchi (2002). »High BRCA2 mRNA expression predicts poor prognosis in breast cancer patients«. In: *International journal of cancer* 98.6, S. 879–882.
- Ehlén, Ö., B. Nodin, E. Rexhepaj, J. Brändstedt, M. Uhlén, M. Alvarado-Kristensson, F. Pontén, D. J. Brennan und K. Jirstrom (2011). »RBM3-regulated genes promote DNA integrity and affect clinical outcome in epithelial ovarian cancer«. In: *Translational oncology* 4.4, IN1.
- Eisenhauer, E. A., P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe und J. Verweij (2009). »New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)«. In: *European journal of cancer* 45.2, S. 228–247.
- Elvin, J. A., Y. He, J. Sun, K. Odunsi, J. B. Szender, K. N. Moore, L. M. Gay, G. M. Frampton, J.-A. Vergilio, J. Suh, S. Ramkissoon, E. A. Severson, S. Daniel, K. K. Lin, J. Y. Hou, C. C. Gunderson, L. L. Holman, P. Stephens, M. Raponi und J. S. Ross (2017). *Comprehensive genomic profiling (CGP) with loss of heterozygosity (LOH) to identify therapeutically relevant subsets of ovarian cancer (OC)*.
- European Medicines Agency (2020a). *Lynparza (olaparib) An overview of Lynparza and why it is authorised in the EU*. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/lynparza-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/lynparza-epar-medicine-overview_en.pdf) (aufgerufen am 19.01.2020).
- (2020b). *Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit, Zejula niraparib*. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zejula-epar-summary-public\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zejula-epar-summary-public_de.pdf) (aufgerufen am 19.01.2020).
- Farmer, H., N. McCabe, C. J. Lord, A. N. Tutt, D. A. Johnson, T. B. Richardson, M. Santarosa, K. J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N. M. Martin, S. P. Jackson, G. C. Smith und A. Ashworth (2005). »Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy«. In: *Nature* 434.7035, S. 917–921.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman und F. Bray (2015). »Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012«. In: *International journal of cancer* 136.5, E359–E386.
- Fisher, R. A. (1922). »On the interpretation of  $\chi^2$  from contingency tables, and the calculation of P«. In: *Journal of the Royal Statistical Society* 85.1, S. 87–94.
- Fong, P. C., D. S. Boss, T. A. Yap, A. Tutt, P. Wu, M. Mergui-Roelvink, P. Mortimer, H. Swaisland, A. Lau, M. J. O’Connor, A. Ashworth, J. Carmichael, S. B. Kaye, J. H. Schellens und J. S. de Bono (2009). »Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers«. In: *New England Journal of Medicine* 361.2, S. 123–134.
- Fong, P. C., T. A. Yap, D. S. Boss, C. P. Carden, M. Mergui-Roelvink, C. Gourley, J. De Greve, J. Lubinski, S. Shanley, C. Messiou, R. A’Hern, A. Tutt, A. Ashworth, J. Stone, J. Carmichael, J. H. Schellens, J. S. de Bono und S. B. Kaye (2010). »Poly (ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval«. In: *Journal of clinical oncology* 28.15, S. 2512–2519.
- Ford, D., D. F. Easton, M. Stratton, S. Narod, D. Goldgar, P. Devilee, D. T. Bishop, B. Weber, G. Lenoir, J. Chang-Claude, H. Sobol, M. D. Teare, J. Struwing, A. Arason, S. Scherneck, J. Peto, T. R. Rebbeck, P. Tonin, S. Neuhausen, R. Barkardottir, J. Eyfjord, H. Lynch, B. A. Ponder, S. A. Gayther und M. Zelada-Hedman (1998). »Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families«. In: *The American Journal of Human Genetics* 62.3, S. 676–689.
- Förster, T. (1948). »Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz«. In: *Annalen der Physik* 437.1-2, S. 55–75.
- Foulkes, W. D. (2006). »BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis«. In: *Familial cancer* 5.2, S. 135–142.
- Geisler, J. P., M. A. Hatterman-Zogg, J. A. Rathe und R. E. Buller (2002). »Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer«. In: *Journal of the National Cancer Institute* 94.1, S. 61–67.

- Gelmon, K. A., M. Tischkowitz, H. Mackay, K. Swenerton, A. Robidoux, K. Tonkin, H. Hirte, D. Huntsman, M. Clemons, B. Gilks, R. Yerushalmi, E. Macpherson, J. Carmichael und A. Oza (2011). »Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study«. In: *The lancet oncology* 12.9, S. 852–861.
- Giulietti, A., L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon und C. Mathieu (2001). »An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression«. In: *Methods* 25.4, S. 386–401.
- Gudas, J. M., H. Nguyen, T. Li und K. H. Cowan (1995). »Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells«. In: *Cancer research* 55.20, S. 4561–4565.
- Gupta, I., A. Ouhitit, A. Al-Ajmi, S. G. A. Rizvi, H. Al-Riyami, M. Al-Riyami und Y. Tamimi (2018). »BRIP1 overexpression is correlated with clinical features and survival outcome of luminal breast cancer subtypes«. In: *Endocrine connections* 7.1, S. 65–77.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2011). »Hallmarks of cancer: the next generation«. In: *cell* 144.5, S. 646–674.
- Harrell, F. E., K. L. Lee, R. M. Califf, D. B. Pryor und R. A. Rosati (1984). »Regression modelling strategies for improved prognostic prediction«. In: *Statistics in medicine* 3.2, S. 143–152.
- Harter, P., J. Hauke, F. Heitz, A. Reuss, S. Kommos, F. Marmé, A. Heimbach, K. Prieske, L. Richters, A. Burges, G. Neidhardt, N. de Gregorio, A. El-Balat, F. Hilpert, W. Meier, R. Kimmig, K. Kast, J. Sehoul, K. Baumann, C. Jackisch, T. W. Park-Simon, L. Hanker, S. Kröber, J. Pfisterer, H. Gevensleben, A. Schnelzer, D. Dietrich, T. Neunhöffer, M. Krockenberger, S. Y. Brucker, P. Nürnberg, H. Thiele, J. Altmüller, J. Lamla, G. Elser, A. du Bois, E. Hahnen und R. Schmutzler (2017). »Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1)«. In: *PloS one* 12.10, e0186043.
- Harter, P., T. Johnson, D. Berton-Rigaud, S. Y. Park, M. Friedlander, J. M. Del Campo, M. Shimada, F. Forget, M. R. Mirza, N. Colombo, C. Zamagni, J. K. Chan, M. Imhof, T. J. Herzog, D. O’Donnell, F. Heitz, K. King, S. Stinnett, C. Barrett, M. Jobanputra, C. F. Xu und A. du Bois (2016). »BRCA1/2 mutations associated with progression-free survival in ovarian cancer patients in the AGO-OVAR 16 study«. In: *Gynecologic oncology* 140.3, S. 443–449.
- Hennessy, B. T., R. L. Coleman und M. Markman (2009). »Ovarian cancer«. In: *The Lancet* 374.9698, S. 1371–1382.
- Hoppe, M. M., R. Sundar, D. S. Tan und A. D. Jeyasekharan (2018). »Biomarkers for homologous recombination deficiency in cancer«. In: *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 110.7, S. 704–713.
- Hothorn, T. und B. Lausen (2002). »Maximally selected rank statistics in R«. In: *R News* 2.1, S. 3–5.
- (2003). »On the exact distribution of maximally selected rank statistics«. In: *Computational Statistics & Data Analysis* 43.2, S. 121–137.
- Huelsenbeck, J. P. und K. A. Crandall (1997). »Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood«. In: *Annual Review of Ecology and systematics* 28.1, S. 437–466.
- Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (2020). *Olaparib (Lynparza) bei Eierstockkrebs*. URL: [https://www.gesundheitsinformation.de/olaparib-lynparza-bei-eierstockkrebs.3273.de.pdf?all\\_backgrounds=0&all\\_details=0&all\\_lexicons=0&all\\_reports=0&overview=1&print=1&theme=0](https://www.gesundheitsinformation.de/olaparib-lynparza-bei-eierstockkrebs.3273.de.pdf?all_backgrounds=0&all_details=0&all_lexicons=0&all_reports=0&overview=1&print=1&theme=0) (aufgerufen am 19.01.2020).
- Joo, W. S., P. D. Jeffrey, S. B. Cantor, M. S. Finnin, D. M. Livingston und N. P. Pavletich (2002). »Structure of the 53BP1 BRCT region bound to p53 and its comparison to the Brcal BRCT structure«. In: *Genes & development* 16.5, S. 583–593.
- Joosse, S. A., E. H. van Beers, I. H. Tielen, H. Horlings, J. L. Peterse, N. Hoogerbrugge, M. J. Ligtenberg, L. F. Wessels, P. Axwijk, S. Verhoef, F. B. Hogervorst und P. M. Nederlof (2009). »Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH«. In: *Breast cancer research and treatment* 116.3, S. 479–489.
- Kaatsch, P., C. Spix, A. Katalinic, S. Hentschel, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, M. Christ, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann und S. Klein (2015). »Krebs in Deutschland 2011/2012«. In:
- Kaelin Jr, W. G. (2005). »The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy«. In: *Nature reviews cancer* 5.9, S. 689.
- Kaplan, E. L. und P. Meier (1958). »Nonparametric estimation from incomplete observations«. In: *Journal of the American statistical association* 53.282, S. 457–481.

- Kaufman, B., R. Shapira-Frommer, R. K. Schmutzler, M. W. Audeh, M. Friedlander, J. Balmaña, G. Mitchell, G. Fried, S. M. Stemmer, A. Hubert, O. Rosengarten, M. Steiner, N. Loman, K. Bowen, A. Fielding und S. M. Domchek (2015). »Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation«. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33.3, S. 244.
- Konstantinopoulos, P. A., D. Spentzos, B. Y. Karlan, T. Taniguchi, E. Fountzilas, N. Francoeur, D. A. Levine und S. A. Cannistra (2010). »Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer«. In: *Journal of Clinical Oncology* 28.22, S. 3555–3561.
- Korn, R. L. und J. J. Crowley (2013). *Overview: progression-free survival as an endpoint in clinical trials with solid tumors*.
- Kristeleit, R. S., R. Shapira-Frommer, A. Oaknin, J. Balmaña, I. Ray-Coquard, S. Domchek, A. V. Tinker, C. Castro, S. Welch, A. Poveda, K. Bell-McGuinn, G. Konecny, H. Giordano, L. Maloney, S. Goble, L. Rolfe und A. Oza (2016). »Clinical activity of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor rucaparib in patients (pts) with high-grade ovarian carcinoma (HGOc) and a BRCA mutation (BRCAmut): Analysis of pooled data from Study 10 (parts 1, 2a, and 3) and ARIEL2 (parts 1 and 2)«. In: *Annals of Oncology* 27.suppl\_6.
- Kurian, A. W., E. Hughes, E. A. Handorf, A. Gutin, B. Allen, A.-R. Hartman und M. J. Hall (2017). »Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women«. In: *JCO Precision Oncology* 1, S. 1–12.
- Kutyavin, I. V., I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer und J. Hedgpeth (2000). »3-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures«. In: *Nucleic acids research* 28.2, S. 655–661.
- Ledermann, J. A., P. Harter, C. Gourley, M. Friedlander, I. Vergote, G. Rustin, C. Scott, W. Meier, R. Shapira-Frommer, T. Safra, D. Matei, A. Fielding, S. Spencer, P. Rowe, E. Lowe, D. Hodgson, M. A. Sovak und U. Matulonis (2016). »Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial«. In: *The lancet oncology* 17.11, S. 1579–1589.
- Ledermann, J., P. Harter, C. Gourley, M. Friedlander, I. Vergote, G. Rustin, C. L. Scott, W. Meier, R. Shapira-Frommer, T. Safra, D. Matei, A. Fielding, S. Spencer, B. Dougherty, M. Orr, D. Hodgson, J. C. Barrett und U. Matulonis (2014). »Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial«. In: *The lancet oncology* 15.8, S. 852–861.
- Ledermann, J., P. Harter, C. Gourley, M. Friedlander, I. Vergote, G. Rustin, C. Scott, W. Meier, R. Shapira-Frommer, T. Safra, D. Matei, E. Macpherson, C. Watkins, J. Carmichael und U. Matulonis (2012). »Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer«. In: *New England Journal of Medicine* 366.15, S. 1382–1392.
- Lesnock, J., K. Darcy, C. Tian, J. Deloia, M. Thrall, C. Zahn, D. Armstrong, M. Birrer und T. Krivak (2013). »BRCA1 expression and improved survival in ovarian cancer patients treated with intraperitoneal cisplatin and paclitaxel: a Gynecologic Oncology Group Study«. In: *British journal of cancer* 108.6, S. 1231.
- Liao, S.-G., L. Liu und Y.-J. Wang (2018). »Effect of RAD51C expression on the chemosensitivity of Eμ-Myc p19Arf/-cells and its clinical significance in breast cancer«. In: *Oncology letters* 15.5, S. 6107–6114.
- Lips, E., L. Mulder, A. Oonk, L. Van Der Kolk, F. Hogervorst, A. Imholz, J. Wesseling, S. Rodenhuis und P. Nederlof (2013). »Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers«. In: *British journal of cancer* 108.10, S. 2172–2177.
- Lips, E. H., N. Laddach, S. P. Savola, M. A. Vollebergh, A. M. Oonk, A. L. Imholz, L. F. Wessels, J. Wesseling, P. M. Nederlof und S. Rodenhuis (2011). »Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness«. In: *chemotherapy* 1, S. 1–9.
- Livak, K. J., S. Flood, J. Marmaro, W. Giusti und K. Deetz (1995). »Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.« In: *Genome Research* 4.6, S. 357–362.

- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). »Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method«. In: *methods* 25.4, S. 402–408.
- Lord, C. J. und A. Ashworth (2016). »BRCAness revisited«. In: *Nature Reviews Cancer* 16.2, S. 110.
- Loveday, C., C. Turnbull, E. Ramsay, D. Hughes, E. Ruark, J. R. Frankum, G. Bowden, B. Kalmyrzaev, M. Warren-Perry, K. Snape, J. W. Adlard, J. Barwell, J. Berg, A. F. Brady, C. Brewer, G. Brice, C. Chapman, J. Cook, R. Davidson, A. Donaldson, F. Douglas, L. Greenhalgh, A. Henderson, L. Izatt, A. Kumar, F. Lalloo, Z. Miedzybrodzka, P. J. Morrison, J. Paterson, M. Porteous, M. T. Rogers, S. Shanley, L. Walker, D. Eccles, D. G. Evans, A. Renwick, S. Seal, C. J. Lord, A. Ashworth, J. S. Reis-Filho, A. C. Antoniou, N. Rahman, A. Ardern-Jones, J. Adlard, G. Attard, K. Bailey, E. Bancroft, C. Bardsley, D. Barton, J. Barwell, L. Baxter, R. Belk, J. Berg, T. Bishop, L. Boyes, N. Bradshaw, A. Brady, S. Brant, C. Brewer, G. Brice, G. Bromilow, C. Brooks, A. Bruce, B. Bulman, L. Burgess, J. Campbell, B. Castle, R. Cetnarskyj, C. Chapman, O. Claber, N. Coates, T. Cole, A. Collins, J. Cook, S. Coulson, G. Crawford, D. Cruger, C. Cummings, L. D’Mello, R. Davidson, L. Day, L. de Silva, B. Dell, C. Dolling, A. Donaldson, A. Donaldson, H. Dorkins, F. Douglas, S. Downing, S. Drummond, J. Dunlop, S. Durrell, D. Eccles, C. Eddy, M. Edwards, E. Edwards, J. Edwardson, R. Eeles, I. Ellis, F. Elmslie, G. Evans, B. Gibbens, C. Gardiner, C. Giblin, S. Gibson, S. Goff, S. Goodman, D. Goudie, L. Greenhalgh, J. Greer, H. Gregory, D. Halliday, R. Hardy, C. Hartigan, T. Heaton, A. Henderson, C. Higgins, S. Hodgson, T. Holt, T. Homfray, D. Horrigan, C. Houghton, R. S. Houlston, L. Hughes, V. Hunt, L. Irvine, L. Izatt, L. Jackson, C. Jacobs, S. James, M. James, L. Jeffers, I. Jobson, W. Jones, M. J. Kennedy, S. Kenwick, C. Kightley, C. Kirk, L. Kirk, E. Kivuva, A. Kumar, F. Lalloo, N. Lambord, C. Langman, P. Leonard, S. Levene, S. Locker, P. Logan, M. Longmuir, A. Lucassen, V. Lyus, A. Magee, A. Male, S. Mansour, D. McBride, E. McCann, V. McConnell, M. McEntagart, K. McDermot, C. McKeown, L. McLeish, D. McLeod, L. Mercer, C. Mercer, Z. Miedzybrodzka, J. Miller, A. Mitra, P. Morrison, V. Murday, A. Murray, J. Myring, J. Paterson, P. Pearson, G. Pichert, K. Platt, M. Porteous, C. Pottinger, S. Price, L. Protheroe, S. Pugh, O. Quarrell, C. Riddick, L. Robertson, A. Robinson, V. Roffey-Johnson, M. Rogers, S. Rose, S. Rowe, A. Schofield, N. Rahman, G. Scott, J. Scott, A. Searle, S. Shanley, S. Sharif, J. Shaw, J. Shea-Simonds, L. Side, J. Sillibourne, K. Simon, S. Simpson, S. Slater, K. Smith, L. Snadden, J. Soloway, Y. Stait, B. Stayner, M. Steel, C. Steel, H. Stewart, D. Stirling, M. Thomas, S. Thomas, S. Tomkins, H. Turner, E. Tyler, E. Wakeling, F. Waldrup, L. Walker, C. Watt, S. Watts, A. Webber, C. Whyte, J. Wiggins, E. Williams und L. Winchester (2011). »Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer«. In: *Nature genetics* 43.9, S. 879.
- Loveday, C., C. Turnbull, E. Ruark, R. M. Xicola, E. Ramsay, D. Hughes, M. Warren-Perry, K. Snape, D. Eccles, D. G. Evans, M. Gore, A. Renwick, S. Seal, A. C. Antoniou und N. Rahman (2012). »Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer«. In: *Nature genetics* 44.5, S. 475.
- Mann, H. B. und D. R. Whitney (1947). »On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other«. In: *The annals of mathematical statistics*, S. 50–60.
- Mantel, N. (1966). »Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration«. In: *Cancer Chemother. Rep.* 50, S. 163–170.
- Mateo, J., S. Carreira, S. Sandhu, S. Miranda, H. Mossop, R. Perez-Lopez, D. Nava Rodrigues, D. Robinson, A. Omlin, N. Tunariu, G. Boysen, N. Porta, P. Flohr, A. Gillman, I. Figueiredo, C. Paulding, G. Seed, S. Jain, C. Ralph, A. Protheroe, S. Hussain, R. Jones, T. Elliott, U. McGovern, D. Bianchini, J. Goodall, Z. Zafeiriou, C. T. Williamson, R. Ferraldeschi, R. Riisnaes, B. Ebbs, G. Fowler, D. Roda, W. Yuan, Y. M. Wu, X. Cao, R. Brough, H. Pemberton, R. A’Hern, A. Swain, L. P. Kunju, R. Eeles, G. Attard, C. J. Lord, A. Ashworth, M. A. Rubin, K. E. Knudsen, F. Y. Feng, A. M. Chinnaiyan, E. Hall und J. S. de Bono (2015). »DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer«. In: *New England Journal of Medicine* 373.18, S. 1697–1708.
- Matulonis, U. A., R. T. Penson, S. M. Domchek, B. Kaufman, R. Shapira-Frommer, M. W. Audeh, S. Kaye, L. R. Molife, K. A. Gelmon, J. D. Robertson, H. Mann, T. W. Ho und R. L. Coleman (2016). »Olaparib monotherapy in patients with advanced relapsed ovarian cancer and a germline BRCA1/2 mutation: a multistudy analysis of response rates and safety«. In: *Annals of Oncology* 27.6, S. 1013–1019.
- Mazón, G., E. P. Mimitou und L. S. Symington (2010). »SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair«. In: *Cell* 142.4, 648–e1.
- McCabe, N., N. C. Turner, C. J. Lord, K. Kluzek, A. Bialkowska, S. Swift, S. Giavara, M. J. O’Connor, A. N. Tutt, M. Z. Zdzienicka, G. C. Smith und A. Ashworth (2006). »Deficiency in the repair of DNA damage by

- homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition«. In: *Cancer research* 66.16, S. 8109–8115.
- Meindl, A., H. Hellebrand, C. Wiek, V. Erven, B. Wappenschmidt, D. Niederacher, M. Freund, P. Lichtner, L. Hartmann, H. Schaal, J. Ramser, E. Honisch, C. Kubisch, H. E. Wichmann, K. Kast, H. Deissler, C. Engel, B. Müller-Myhsok, K. Neveling, M. Kiechle, C. G. Mathew, D. Schindler, R. K. Schmutzler und H. Hanenberg (2010). »Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene«. In: *Nature genetics* 42.5, S. 410.
- Mirza, M. R., B. J. Monk, J. Herrstedt, A. M. Oza, S. Mahner, A. Redondo, M. Fabbro, J. A. Ledermann, D. Lorusso, I. Vergote, N. E. Ben-Baruch, C. Marth, R. M?dry, R. D. Christensen, J. S. Berek, A. Dorum, A. V. Tinker, A. du Bois, A. Gonzalez-Martin, P. Follana, B. Benigno, P. Rosenberg, L. Gilbert, B. J. Rimel, J. Buscema, J. P. Balsler, S. Agarwal, U. A. Matulonis, B. Lund, S. Malander, K. Woie, K. Hellman, T. J. Notttrup, H. Havsteen, J. Shouli, P. Harter, U. Canzler, H. J. Lück, L. Wölber, F. Marme, W. Meier, M. Heubner, F. Hilpert, G. Emons, A. Burges, I. M. Bover Barcelo, M. Gil Martin, I. Palacio Vazquez, A. Casado Herraiez, J. S. Maria del Campo, A. Lesoin, D. Berton-Rigaud, T. N’Guyen, A. C. Hardy-Bessard, S. Banerjee, R. Lord, J. Waters, A. Montes, S. Chan, S. J. Williams, C. Barlow, A. Mullard, N. Colombo, G. Scambia, G. Tognon, P. Scollo, F. R. Kridelka, C. Leroy, P. Debruyne, M. Huizing, O. Rosengarten, T. Levy, R. S. Frommer, A. Fishman, D. Edelman, T. Safra, A. Amit, J. Pikiel, J. Suzin, B. Mackowiak-Matejczyk, A. Reinthaller, E. Petru, T. Csoszi, P. Bessette, D. Provencher, S. Lau, S. Ellard, P. Ghatage, K. Moore, R. Wenham, M. Pineda, M. Azodi, G. Mantia-Smaldone, N. Cloven, C. Bailey, C. Lee, A. Secord, M. Patel, M. Method, M. Callahan, J. Veena, J. Chan, C. Zarwan, P. DiSilvestro, M. Teneriello, D. Gupta, M. Geller, H. Burris, B. Slomovitz, A. W. Hendrickson, C. McCormick, P. Hanjani, S. Blank, P. Haluska, D. Matei, S. Vasilev, J. Neidhart, M. Boente, N. Tchabo und D. Miller (2016). »Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer«. In: *New England Journal of Medicine* 375.22, S. 2154–2164.
- Moes-Sosnowska, J., I. K. Rzepecka, J. Chodzynska, A. Dansonka-Mieszkowska, L. M. Szafron, A. Balabas, R. Lotocka, P. Sobiczewski und J. Kupryjanczyk (2019). »Clinical importance of FANCD2, BRIP1, BRCA1, BRCA2 and FANCF expression in ovarian carcinomas«. In: *Cancer biology & therapy* 20.6, S. 843–854.
- Mori, H., M. Kubo, R. Nishimura, T. Osako, N. Arima, Y. Okumura, M. Okido, M. Yamada, M. Kai, J. Kishimoto, T. Miyazaki, Y. Oda, T. Otsuka und M. Nakamura (2016). »BRCAness as a biomarker for predicting prognosis and response to anthracycline-based adjuvant chemotherapy for patients with triple-negative breast cancer«. In: *PloS one* 11.12, e0167016.
- Moschetta, M., A. George, S. Kaye und S. Banerjee (2016). »BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer«. In: *Annals of Oncology* 27.8, S. 1449–1455.
- MRC Holand (Sep. 2014). *MLPA DNA Protocol version MDP-v005*.
- Muggia, F. und T. Safra (2014). »‘BRCAness’ and its implications for platinum action in gynecologic cancer«. In: *Anticancer research* 34.2, S. 551–556.
- Nakanishi, R., H. Kitao, Y. Fujinaka, N. Yamashita, M. Iimori, E. Tokunaga, N. Yamashita, M. Morita, Y. Kakeji und Y. Maehara (2012). »FANCF expression predicts the response to 5-fluorouracil-based chemotherapy in MLH1-proficient colorectal cancer«. In: *Annals of surgical oncology* 19.11, S. 3627–3635.
- Nam, S. (2017). »Cancer transcriptome dataset analysis: comparing methods of pathway and gene regulatory network-based cluster identification«. In: *Omics: a journal of integrative biology* 21.4, S. 217–224.
- O’Donovan, P. J. und D. M. Livingston (2010). »BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair«. In: *Carcinogenesis* 31.6, S. 961–967.
- Onkologie Leitlinienprogramm (2016). »S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 2.0«. In: *AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL*.
- Peduzzi, P., J. Concato, E. Kemper, T. R. Holford und A. R. Feinstein (1996). »A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis«. In: *Journal of clinical epidemiology* 49.12, S. 1373–1379.
- Pelttari, L. M., T. Heikkinen, D. Thompson, A. Kallioniemi, J. Schleutker, K. Holli, C. Blomqvist, K. Aittomäki, R. Bützow und H. Nevanlinna (2011). »RAD51C is a susceptibility gene for ovarian cancer«. In: *Human molecular genetics* 20.16, S. 3278–3288.
- Peng, M., R. Litman, Z. Jin, G. Fong und S. B. Cantor (2006). »BACH1 is a DNA repair protein supporting BRCA1 damage response«. In: *Oncogene* 25.15, S. 2245.

- Pennington, K. P., T. Walsh, M. I. Harrell, M. K. Lee, C. C. Pennil, M. H. Rendi, A. Thornton, B. M. Norquist, S. Casadei, A. S. Nord, K. J. Agnew, C. C. Pritchard, S. Scroggins, R. L. Garcia, M.-C. King und E. M. Swisher (Feb. 2014). »Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas.« In: *Clin. Cancer Res.* 20.3, S. 764–75.
- Prentice, R. L. (1989). »Surrogate endpoints in clinical trials: definition and operational criteria.« In: *Statistics in medicine* 8.4, S. 431–440.
- Pujade-Lauraine, E., J. A. Ledermann, F. Selle, V. GebSKI, R. T. Penson, A. M. Oza, J. Korach, T. Huzarski, A. Poveda, S. Pignata, M. Friedlander, N. Colombo, P. Harter, K. Fujiwara, I. Ray-Coquard, S. Banerjee, J. Liu, E. S. Lowe, R. Bloomfield, P. Pautier, J. Korach, T. Huzarski, T. Byrski, P. Pautier, M. Friedlander, P. Harter, N. Colombo, S. Pignata, G. Scambia, M. Nicoletto, F. Nussey, A. Clamp, R. Penson, A. Oza, A. Poveda Velasco, M. Rodrigues, J. P. Lotz, F. Selle, I. Ray-Coquard, D. Provencher, A. Prat Aparicio, L. Vidal Boixader, C. Scott, K. Tamura, M. Yunokawa, A. Lisyanskaya, J. Medioni, N. Pecuchet, C. Dubot, T. de la Motte Rouge, M. C. Kaminsky, B. Weber, A. Lortholary, C. Parkinson, J. Ledermann, S. Williams, S. Banerjee, J. Cosin, J. Hoffman, R. Penson, M. Plante, A. Covens, G. Sonke, F. Joly, A. Floquet, S. Banerjee, H. Hirte, A. Amit, T. W. Park-Simon, K. Matsumoto, S. Tjulandin, J. H. Kim, L. Gladieff, R. Sabbatini, D. O'Malley, P. Timmins, D. Kredentser, N. Lainez Milagro, M. P. Barretina Ginesta, A. Tibau Martorell, A. Gomez de Liano Lista, B. Ojeda Gonzalez, L. Mileskin, M. Mandai, I. Boere, P. Ottevanger, J. H. Nam, E. Filho, S. Hamizi, F. Cognetti, D. Warshal, E. Dickson-Michelson, S. Kamelle, N. McKenzie, G. Rodriguez, D. Armstrong, E. Chalas, P. Celano, K. Behbakht, S. Davidson, S. Welch, L. Helpman, A. Fishman, I. Bruchim, M. Sikorska, A. Slowinska, W. Rogowski, M. Bidzinski, B. Spiewankiewicz, A. Casado Herraes, C. Mendiola Fernandez, M. Gropp-Meier, T. Saito, K. Takehara, T. Enomoto, H. Watari, C. H. Choi, B. G. Kim, J. W. Kim, R. Hegg und I. Vergote (2017). »Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial.« In: *The Lancet Oncology* 18.9, S. 1274–1284.
- QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (Juni 2012). 3. Version.
- Quinn, J. E., C. R. James, G. E. Stewart, J. M. Mulligan, P. White, G. K. Chang, P. B. Mullan, P. G. Johnston, R. H. Wilson und D. P. Harkin (2007). »BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy.« In: *Clinical Cancer Research* 13.24, S. 7413–7420.
- Rigakos, G. und E. Razis (2012). »BRCAness: finding the Achilles heel in ovarian cancer.« In: *The oncologist* 17.7, S. 956–962.
- RNeasy® Lipid Tissue Handbook (Feb. 2009). Qiagen®.
- Robson, M., S. A. Im, E. Senkus, B. Xu, S. M. Domchek, N. Masuda, S. Delaloge, W. Li, N. Tung, A. Armstrong, W. Wu, C. Goessl, S. Runswick und P. Conte (2017). »Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation.« In: *New England Journal of Medicine* 377.6, S. 523–533.
- Rochon, J. und A. Du Bois (2011). »Clinical research in epithelial ovarian cancer and patients' outcome.« In: *Annals of oncology* 22.Suppl\_7, S. vii16–vii19.
- Rosen, B., S. Laframboise, S. Ferguson, J. Dodge, M. Bernardini, J. Murphy, Y. Segev, P. Sun und S. A. Narod (2014). »The impacts of neoadjuvant chemotherapy and of debulking surgery on survival from advanced ovarian cancer.« In: *Gynecologic oncology* 134.3, S. 462–467.
- Rustin, G. J., I. Vergote, E. Eisenhauer, E. Pujade-Lauraine, M. Quinn, T. Thigpen, A. du Bois, G. Kristensen, A. Jakobsen, S. Sagae, K. Greven, M. Parmar, M. Friedlander, A. Cervantes und J. Vermorken (2011). »Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIg)«. In: *International journal of gynecological cancer* 21.2, S. 419–423.
- Saad, E. und A. Katz (2008). »Progression-free survival and time to progression as primary end points in advanced breast cancer: often used, sometimes loosely defined.« In: *Annals of oncology* 20.3, S. 460–464.
- Schouten, J. P., C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens und G. Pals (2002). »Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.« In: *Nucleic acids research* 30.12, e57–e57.
- Severson, T. M., D. M. Wolf, C. Yau, J. Peeters, D. Wehkam, P. C. Schouten, S. F. Chin, I. J. Majewski, M. Michaut, A. Bosma, B. Pereira, T. Bismeyer, L. Wessels, C. Caldas, R. Bernards, I. M. Simon, A. M. Glas, S. Linn und L. van 't Veer (2017). »The BRCA1 ness signature is associated significantly with response to

- PARP inhibitor treatment versus control in the I-SPY 2 randomized neoadjuvant setting«. In: *Breast Cancer Research* 19.1, S. 99.
- Siegel, R. L., K. D. Miller und A. Jemal (2016). »Cancer statistics, 2016«. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 66.1, S. 7–30.
- Skytte, A.-B., M. Waldstrøm, A. A. Rasmussen, D. Crüger, E. R. Woodward und S. Kølvråa (2011). »Identification of BRCA1-deficient ovarian cancers«. In: *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 90.6, S. 593–599.
- Spearman, C. (1904). »The proof and measurement of association between two things«. In: *The American journal of psychology* 15.1, S. 72–101.
- Stoppa-Lyonnet, D. (2016). »The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: where do we go from here?«. In: *European Journal of Human Genetics* 24, S3–S9.
- Stuppia, L., I. Antonucci, G. Palka und V. Gatta (2012). »Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases«. In: *International journal of molecular sciences* 13.3, S. 3245–3276.
- Sullivan, M. R. und K. A. Bernstein (2018). »RAD-ical New Insights into RAD51 Regulation«. In: *Genes* 9.12, S. 629.
- Sun, C., N. Li, D. Ding, D. Weng, L. Meng, G. Chen und D. Ma (2014). »The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis«. In: *PLoS one* 9.5, e95285.
- Swisher, E. M., K. K. Lin, A. M. Oza, C. L. Scott, H. Giordano, J. Sun, G. E. Konecny, R. L. Coleman, A. V. Tinker, D. M. O'Malley, R. S. Kristeleit, L. Ma, K. M. Bell-McGuinn, J. D. Brenton, J. M. Cragun, A. Oaknin, I. Ray-Coquard, M. I. Harrell, E. Mann, S. H. Kaufmann, A. Floquet, A. Leary, T. C. Harding, S. Goble, L. Maloney, J. Isaacson, A. R. Allen, L. Rolfe, R. Yelensky, M. Raponi und I. A. McNeish (2017). »Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial«. In: *The Lancet Oncology* 18.1, S. 75–87.
- Tan, D. S., C. Rothermundt, K. Thomas, E. Bancroft, R. Eeles, S. Shanley, A. Ardern-Jones, A. Norman, S. B. Kaye und M. E. Gore (2008). »"BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations«. In: *Journal of Clinical Oncology* 26.34, S. 5530–5536.
- Taylor, S., M. Wakem, G. Dijkman, M. Alsarraj und M. Nguyen (2010). »A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines«. In: *Methods* 50.4, S1–S5.
- Thermo Fisher Scientific (2020). *Assessing RNA Quality*. URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html> (aufgerufen am 19.01.2020).
- Tian, T., L. Shan, W. Yang, X. Zhou und R. Shui (2019). »Evaluation of the BRCAness phenotype and its correlations with clinicopathological features in triple-negative breast cancers«. In: *Human pathology* 84, S. 231–238.
- Tibshirani, R., T. Hastie, B. Narasimhan und G. Chu (2002). »Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.10, S. 6567–6572.
- Toss, A., C. Tomasello, E. Razzaboni, G. Contu, G. Grandi, A. Cagnacci, R. J. Schilder und L. Cortesi (2015). »Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes«. In: *BioMed research international* 2015.
- Tsibulak, I., V. Wieser, C. Degasper, G. Shivalingaiah, S. Wenzel, S. Sprung, S. F. Lax, C. Marth, H. Fiegl und A. G. Zeimet (2018). »BRCA1 and BRCA2 mRNA-expression prove to be of clinical impact in ovarian cancer«. In: *British journal of cancer*, S. 1.
- Tu, Z., K. M. Aird, B. G. Bitler, J. P. Nicodemus, N. Beeharry, B. Xia, T. J. Yen und R. Zhang (2011). »Oncogenic RAS regulates BRIP1 expression to induce dissociation of BRCA1 from chromatin, inhibit DNA repair, and promote senescence«. In: *Developmental cell* 21.6, S. 1077–1091.
- Turner, N., A. Tutt und A. Ashworth (2004). »Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers«. In: *Nature Reviews Cancer* 4.10, S. 814–819.
- Tutt, A., M. Robson, J. E. Garber, S. M. Domchek, M. W. Audeh, J. N. Weitzel, M. Friedlander, B. Arun, N. Loman, R. K. Schmutzler, A. Wardley, G. Mitchell, H. Earl, M. Wickens und J. Carmichael (2010). »Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial«. In: *The Lancet* 376.9737, S. 235–244.

- Underhill, C., M. Toulmonde und H. Bonnefoi (2011). »A review of PARP inhibitors: from bench to bedside«. In: *Annals of Oncology* 22.2, S. 268–279.
- Vencken, P. M., M. Kriege, D. Hoogwerf, S. Beugelink, M. E. van der Burg, M. J. Hooning, E. M. Berns, A. Jager, M. Coll?e, C. W. Burger und C. Seynaeve (2011). »Chemosensitivity and outcome of BRCA1-and BRCA2-associated ovarian cancer patients after first-line chemotherapy compared with sporadic ovarian cancer patients«. In: *Annals of oncology* 22.6, S. 1346–1352.
- Vollebergh, M. A., E. H. Lips, P. M. Nederlof, L. F. A. Wessels, M. K. Schmidt, E. H. van Beers, S. Cornelissen, M. Holtkamp, F. E. Froklage, E. G. E. de Vries, J. G. Schrama, J. Wesseling, M. J. van de Vijver, H. van Tinteren, M. de Bruin, M. Hauptmann, S. Rodenhuis und S. C. Linn (2010). »An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients«. In: *Annals of Oncology* 22.7, S. 1561–1570.
- Waha, A., B. Versmold, K. Kast, M. Kiechle, N. Ditsch, A. Meindl, D. Niederacher, E. Hahnen, N. Arnold, C. Mundhenke, J. Horvath, B. Auber, N. Dikow, J. Hauke, B. Wappenschmidt, O. Riess, S. Schott, D. Speiser, U. Faust, C. Sutter, K. Rhiem und R. K. Schmutzler (2018). »Konsensusempfehlung des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust-und Eierstockkrebs zum Umgang mit Ergebnissen der Multigenanalyse«. In: *TumorDiagnostik & Therapie* 39.03, S. 187–193.
- Weber-Lassalle, N., J. Hauke, J. Ramser, L. Richters, E. Gro?, B. Bl?mcke, A. Gehrig, A. K. Kahlert, C. R. M?ller, K. Hackmann, E. Honisch, K. Weber-Lassalle, D. Niederacher, J. Borde, H. Thiele, C. Ernst, J. Altmüller, G. Neidhardt, P. Nürnberg, K. Klaschik, C. Schroeder, K. Platzer, A. E. Volk, S. Wang-Gohrke, W. Just, B. Auber, C. Kubisch, G. Schmidt, J. Horvath, B. Wappenschmidt, C. Engel, N. Arnold, B. Dworniczak, K. Rhiem, A. Meindl, R. K. Schmutzler und E. Hahnen (2018). »BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer«. In: *Breast Cancer Research* 20.1, S. 7.
- Wei, L.-J., D. Y. Lin und L. Weissfeld (1989). »Regression analysis of multivariate incomplete failure time data by modeling marginal distributions«. In: *Journal of the American statistical association* 84.408, S. 1065–1073.
- Wessels, L. F., T. Van Welsem, A. A. Hart, L. J. Van't Veer, M. J. Reinders und P. M. Nederlof (2002). »Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors«. In: *Cancer research* 62.23, S. 7110–7117.
- Wilcoxon, F. (1945). »Individual comparisons by ranking methods«. In: *Biometrics bulletin* 1.6, S. 80–83.
- Winter, W. E., G. L. Maxwell, C. Tian, J. W. Carlson, R. F. Ozols, P. G. Rose, M. Markman, D. K. Armstrong, F. Muggia und W. P. McGuire (2007). »Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study«. In: *Journal of Clinical Oncology* 25.24, S. 3621–3627.
- Ye, C., Q. Cai, Q. Dai, X.-o. Shu, A. Shin, Y.-T. Gao und W. Zheng (2007). »Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival«. In: *Cancer* 109.9, S. 1729–1735.
- Zhang, P., W. Gao, H. Li, E. Reed und F. Chen (2005). »Inducible degradation of checkpoint kinase 2 links to cisplatin-induced resistance in ovarian cancer cells«. In: *Biochemical and biophysical research communications* 328.2, S. 567–572.
- Zhu, J., F. He, S. Hu und J. Yu (2008). »On the nature of human housekeeping genes«. In: *Trends in genetics* 24.10, S. 481–484.

## Abbildungsverzeichnis

1	Somatische Mutationen beim Ovarialkarzinom (modifiziert nach Pennington et al. 2014) . . . . .	10
2	Aufbau eines MLPA Sondenpaares (modifiziert nach Schouten et al. 2002) . . . . .	23
3	Hybridisierung der Target-spezifischen Sonden an die Zielsequenz (modifiziert nach Schouten et al. 2002) . . . . .	23
4	Ligation des Sondenpaares (modifiziert nach Schouten et al. 2002) . . . . .	24
5	entstandene PCR Produkte (modifiziert nach Schouten et al. 2002) . . . . .	24
6	Darstellung der rRNA als 18S und 28S Banden in der Gelelektrophorese . . . . .	27
7	Amplifikationsplot <i>RAD51C</i> . . . . .	29
8	Anlagerung der Taqman® Sonde, Beginn der Extensionsphase (modifiziert nach Livak et al. 1995) . . . . .	30
9	Verdrängung der Taqman® Sonde (modifiziert nach Livak et al. 1995) . . . . .	30
10	5'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq® Polymerase und Zunahme der Fluoreszenz (modifiziert nach Livak et al. 1995) . . . . .	30
11	Abschluss der Polymerisation (modifiziert nach Livak et al. 1995) . . . . .	31
12	Ergebnis des MLPA BRCA1ness Tests, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Patientinnen im FIGO-Stadium III oder IV (n=43), p=0,036, HR=0,46 (95%-KI=[0,22; 0,97]) . . . . .	35
13	Darstellung der linearen Regressionsgerade, TaqMan® Gene Expression Single-tube Assay BRCA2 Hs00609073-m1, $m=-3,18$ . . . . .	38
14	mRNA-Expression <i>ATM</i> , Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,504, HR=0,79 (95%-KI=[0,40; 1,58]) . . . . .	40
15	mRNA-Expression <i>BRCA1</i> , Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,034, HR=2,20 (95%-KI=[1,04; 4,64]) . . . . .	41
16	mRNA-Expression <i>BRCA2</i> , Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,218, HR=1,93 (95%-KI=[0,67; 5,58]) . . . . .	41
17	mRNA-Expression <i>BRIP1</i> , Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,011, HR=3,40 (95%-KI=[1,27; 9,15]) . . . . .	42
18	mRNA-Expression <i>CHEK2</i> , Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,186, HR=1,82 (95%-KI=[0,74; 4,48]) . . . . .	43
19	mRNA-Expression <i>RAD51C</i> , Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,036, HR=2,16 (95%-KI=[1,04; 4,50]) . . . . .	43
20	mRNA-Expression <i>RAD51D</i> , Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,180, HR=1,83 (95%-KI=[0,75; 4,46]) . . . . .	44
21	mRNA-Expression <i>ATM</i> , progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,230, HR=0,66 (95%-KI=[0,34; 1,30]) . . . . .	46
22	Genexprssion <i>BRCA1</i> , progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,127, HR=1,92 (95%-KI=[0,82; 4,51]) . . . . .	47
23	mRNA-Expression <i>BRCA2</i> , progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,228, HR=1,89 (95%-KI=[0,66; 5,37]) . . . . .	47

24	mRNA-Expression <i>BRIP1</i> , progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,019, HR=2,81 (95%-KI=[1,15; 6,89]) . . . . .	48
25	mRNA-Expression <i>CHEK2</i> , progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,127, HR=0,58 (95%-KI=[0,28; 1,18]) . . . . .	49
26	mRNA-Expression <i>RAD51C</i> , progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,193, HR=0,62 (95%-KI=[0,30; 1,28]) . . . . .	49
27	mRNA-Expression <i>RAD51D</i> , progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Gesamtkohorte (n=48), p=0,211, HR=0,52 (95%-KI=[0,18; 1,47]) . . . . .	50
28	Mann-Whitney-U-Test, n=48, x-Achse: Ergebnis des MLPA BRCA1ness Test (BRCA1-ähnlich und nicht-BRCA1-ähnlich), y-Achse: RQ-Werte . . . . .	53
29	Streudiagramm der mRNA-Expressionswerte, x-Achse: RQ-Werte von <i>BRCA1</i> , y-Achse: RQ-Werte von <i>BRIP1</i> , $r_s=0.817$ , $p < 0,05$ . . . . .	54
30	Tumorhistologie, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, n=49 . . . . .	56
31	Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, n=48 . . . . .	57
32	Zustand nach Mammakarzinom, Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, n=40, p=0,005, HR=0,26 . . . . .	57
33	Tumorhistologie, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, n=49 . . . . .	59
34	Makroskopischer Tumorrest nach chirurgischem Debulking, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, n=48 . . . . .	60
35	Familienanamnese, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, n=41, p=0,032, HR=0,46 . . . . .	60
36	Zustand nach Mammakarzinom, progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, n=40, p=0,001, HR=0,26 . . . . .	61
A.37	Aufbereitung der Daten in einer Exceltabelle, (a) und (b) „Intrasample Normalisation“, (c) „Intersample Normalisation“ . . . . .	95
A.38	Sortierung mithilfe der „PAM Orders“ . . . . .	96
A.39	Darstellung der linearen Regressionsgerade, <i>ALAS1</i> (Haushaltsgen), $m = -3,25$ . . . . .	99
A.40	Darstellung der linearen Regressionsgerade, <i>BRCA1</i> , $m = -3,20$ . . . . .	99
A.41	Darstellung der linearen Regressionsgerade, <i>BRIP1</i> , $m = -3,91$ . . . . .	99
A.42	Darstellung der linearen Regressionsgerade, <i>CHEK2</i> , $m = -3,42$ . . . . .	100
A.43	Darstellung der linearen Regressionsgerade, <i>RAD51C</i> , $m = -3,29$ . . . . .	100
A.44	Darstellung der linearen Regressionsgerade, <i>RAD51D</i> , $m = -3,17$ . . . . .	100
A.45	Histogramme der RQ-Werte von <i>ATM</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRIP1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>RAD51C</i> und <i>RAD51D</i> . . . . .	101
A.46	Streudiagramme der mRNA-Expressionswerte von <i>ATM</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRIP1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>RAD51C</i> und <i>RAD51D</i> . . . . .	102

## Tabellenverzeichnis

1	Patientinnenkollektiv Ovarialkarzinom, n=49 . . . . .	18
2	Kontrollproben . . . . .	19
3	Kits und Assays . . . . .	19
4	Chemikalien . . . . .	20
5	Lösungen und Puffer . . . . .	20
6	Verbrauchsmaterial . . . . .	21
7	Geräte . . . . .	21
8	Software . . . . .	22
9	Thermozykler Programm MLPA . . . . .	25
10	Hybridisierung Mastermischung . . . . .	25
11	Ligase-65 Mastermischung . . . . .	25
12	Polymerase Mastermischung . . . . .	26
13	Mischung Elektrophorese . . . . .	26
14	Einstellungen ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0 . . . . .	26
15	Einstellungen GeneMapper v4.0 . . . . .	26
16	Volumina der Komponenten in der ersten-Strang Reaktion . . . . .	28
17	Reaktionsmischung TaqMan® . . . . .	31
18	Einstellungen ABI PRISM® 7000 SDS 1.2.3 . . . . .	32
19	Ergebnis des MLPA BRCA1ness Test . . . . .	33
20	Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier, Ergebnis des MLPA BRCA1ness Tests . . . . .	35
21	Progressionsfreies Überleben nach Kaplan-Meier, Ergebnis des MLPA BRCA1ness Tests . . . . .	36
22	Assoziation des MLPA BRCA1ness-Profiles mit klinischen Daten, exakter Test nach Fisher, Gesamtkohorte (n=49) . . . . .	37
23	Ergebnisse des cDNA Verdünnungsreihe . . . . .	38
24	Gesamtüberleben in Abhängigkeit der mRNA-Expression in der Gesamtkohorte (n=48) . . . . .	45
25	Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit der mRNA-Expression in der Gesamtkohorte (n=48) . . . . .	51
26	Assoziation des MLPA BRCA1ness Tests mit mRNA-Expressionswerten, exakter Test nach Fisher, Gesamtkohorte (n=48) . . . . .	52
27	Vergleich des MLPA BRCA1ness Tests mit mRNA-Expressionswerten, Mann-Whitney-U-Test, Gesamtkohorte (n=48) . . . . .	52
28	Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten der mRNA-Expressionsdaten . . . . .	54
29	Gesamtüberleben, klinisch-pathologische Parameter . . . . .	55
30	Progressionsfreies Überleben, klinisch-pathologische Parameter . . . . .	58
31	Multivariable Cox-Regressionsanalyse, Gesamtüberleben, Gesamtkohorte (n=48), Variablen: <i>BRIP1</i> mRNA-Expression, Ergebnis des MLPA BRCA1ness Test, makroskopischer Tumorrest . . . . .	62

32	Multivariable Cox-Regressionsanalyse, Gesamtüberleben, Gesamtkohorte (n=48), Variablen: <i>BRIP1</i> mRNA-Expression, <i>RAD51C</i> mRNA-Expression, makroskopischer Tumorrest . . . . .	62
33	Multivariable Cox-Regressionsanalyse, Gesamtüberleben, Gesamtkohorte (n=48), Variablen: <i>BRIP1</i> mRNA-Expression, <i>BRCA1</i> mRNA-Expression, makroskopischer Tumorrest . . . . .	62
34	Multivariable Cox-Regressionsanalyse, progressionsfreies Überleben, Gesamtkohorte (n=48), Variablen: <i>BRIP1</i> mRNA-Expression, <i>RAD51C</i> mRNA-Expression, makroskopischer Tumorrest . . . . .	63
A.35	SALSA MLPA P376-B3 BRCA1ness Probemischung . . . . .	103

# Anhang

## Abbildungen

(a)			(b)							(c)				
Länge (nt)	Peakfläche Probe 1	Peakfläche/Summe Peakflächen Probe	Länge (nt)	Peakfläche Kontrolle 1	Peakfläche/Summe Peakflächen Kontrolle 1	Peakfläche Kontrolle 2	Peakfläche/Summe Peakflächen Kontrolle 2	Peakfläche Kontrolle 3	Peakfläche/Summe Peakflächen Kontrolle 3	Mittelwert	Länge (nt)	Peakfläche/Summe Peakflächen Probe	Mittelwert	Ratio
124	8278	0.0188459	124	7775	0.0176893	7957	0.0178662	8416	0.0188402	0.0181319	124	0.01884593	0.0181319	1.0393801
130	7497	0.0170679	130	7928	0.0180374	7068	0.0158701	7706	0.0172508	0.0170528	130	0.01706788	0.0170528	1.0008874
136	8187	0.0186388	136	8823	0.0200736	8272	0.0185735	8308	0.0185984	0.0190819	136	0.01863876	0.0190819	0.9767793
140	7758	0.0176621	140	8260	0.0187927	8303	0.0186431	8235	0.0184350	0.0186236	140	0.01766208	0.0186236	0.9483705
148	7984	0.0181766	148	8739	0.0198825	8276	0.0185825	8501	0.0190305	0.0191652	148	0.0181766	0.0191652	0.9484191
155	9361	0.0213115	155	9036	0.0205582	8336	0.0187172	8609	0.0192722	0.0195159	155	0.02131152	0.0195159	1.0920083
160	10713	0.0243895	160	7937	0.0180578	7661	0.0172016	7737	0.0173202	0.0175265	160	0.02438952	0.0175265	1.3915766
167	6570	0.0149574	167	8911	0.0202738	8367	0.0187868	8600	0.0192521	0.0194376	167	0.01495745	0.0194376	0.7695118
172	10709	0.0243804	172	8234	0.0187336	8415	0.0188946	8650	0.0193640	0.0189974	172	0.02438042	0.0189974	1.2833557
178	10101	0.0229962	178	10176	0.0231519	9357	0.0210097	9450	0.0211549	0.0217722	178	0.02299623	0.0217722	1.0562207
184	8832	0.0201072	184	8916	0.0202852	8327	0.0186970	8420	0.0188491	0.0192771	184	0.02010718	0.0192771	1.0430594
193	9834	0.0223884	193	10000	0.0227515	9854	0.0221257	9828	0.0220011	0.0222927	193	0.02238837	0.0222927	1.0042892
202	9836	0.0223929	202	8392	0.0190930	8558	0.0192157	8623	0.0193036	0.0192041	202	0.02239292	0.0192041	1.1660488
208	10144	0.0230941	208	10281	0.0233908	9908	0.0222469	10103	0.0226167	0.0227515	208	0.02309412	0.0227515	1.0150604
214	7333	0.0166945	214	8742	0.0198893	8517	0.0191236	8431	0.0188738	0.0192956	214	0.01669452	0.0192956	0.8651992
220	7971	0.0181470	220	9766	0.0222191	9313	0.0209109	9457	0.0211706	0.0214335	220	0.01814701	0.0214335	0.8466643
226	11087	0.0252410	226	10563	0.0240324	9954	0.0223502	10217	0.0228719	0.0230848	226	0.02524098	0.0230848	1.0994010
233	10521	0.0239524	233	10703	0.0243509	10038	0.0225388	10173	0.0227734	0.0232210	233	0.02395241	0.0232210	1.0314957
241	10793	0.0245717	241	10414	0.0236934	10590	0.0237782	11233	0.0251463	0.0242060	241	0.02457165	0.0242060	1.0151061
247	9258	0.0210770	247	9459	0.0215206	9290	0.0208593	9293	0.0208034	0.0210611	247	0.02107703	0.0210611	1.0007554
253	12659	0.0287743	253	11037	0.0251108	11012	0.0247258	11228	0.0251352	0.0249906	253	0.02877431	0.0249906	1.1514062
265	8010	0.0182358	265	10288	0.0234067	9563	0.0214723	10100	0.0226100	0.0224963	265	0.01823579	0.0224963	0.8106120
274	8886	0.0202301	274	9993	0.0227355	10530	0.0236435	10652	0.0238457	0.0234083	274	0.02023012	0.0234083	0.8642299
283	10943	0.0249131	283	10159	0.0231132	10907	0.0244900	11036	0.0247053	0.0241029	283	0.02491315	0.0241029	1.0336177
291	10775	0.0245307	291	10078	0.0229289	10248	0.0230103	10524	0.0235592	0.0231661	291	0.02453067	0.0231661	1.0589017
301	9810	0.0223337	301	9271	0.0210929	9943	0.0223255	9647	0.0215959	0.0216714	301	0.02233373	0.0216714	1.0305606
310	8596	0.0195699	310	7678	0.0174686	7774	0.0174553	7876	0.0176513	0.0175184	310	0.0195699	0.0175184	1.1171044
319	10221	0.0232694	319	10828	0.0246353	11177	0.0250963	10946	0.0245039	0.0247451	319	0.02326942	0.0247451	0.9403631
328	9049	0.0206012	328	9479	0.0215661	10263	0.0230440	9978	0.0223369	0.0223157	328	0.02060121	0.0223157	0.9231722
337	10465	0.0238249	337	9683	0.0220303	10296	0.0231181	11151	0.0249628	0.0233704	337	0.02382492	0.0233704	1.0194492
346	10193	0.0232057	346	9178	0.0208813	9622	0.0216048	9900	0.0221623	0.0215494	346	0.02320568	0.0215494	1.0768573
355	9735	0.0221630	355	9026	0.0205355	9693	0.0217642	9382	0.0210027	0.0211008	355	0.02216298	0.0211008	1.0503396
364	8695	0.0197953	364	8568	0.0194935	9500	0.0213308	9295	0.0208079	0.0205441	364	0.01979529	0.0205441	0.9635525
373	10445	0.0237794	373	9753	0.0221895	10122	0.0227274	10307	0.0230734	0.0226634	373	0.02377939	0.0226634	1.0492398
382	11928	0.0271556	382	10986	0.0249948	10564	0.0237199	10891	0.0243807	0.0243651	382	0.02715563	0.0243651	1.1145284
390	5336	0.0121481	390	7503	0.0170704	7546	0.0169434	7099	0.0158919	0.0166353	390	0.01214809	0.0166353	0.7302619
400	7560	0.0172113	400	6107	0.0138943	6137	0.0137797	6026	0.0134899	0.0137213	400	0.01721131	0.0137213	1.2543494
409	8742	0.0199023	409	10422	0.0237116	10362	0.0232663	10969	0.0245554	0.0238444	409	0.01990229	0.0238444	0.8346729
418	6391	0.0145499	418	7287	0.0165790	8015	0.0179965	7576	0.0169597	0.0171784	418	0.01454993	0.0171784	0.8468998
427	8012	0.0182403	427	8228	0.0187199	8755	0.0196580	8405	0.0188155	0.0190645	427	0.01824035	0.0190645	0.9567704
436	10321	0.0234971	436	10589	0.0240915	12135	0.0272473	11101	0.0248509	0.0253966	436	0.02349708	0.0253966	0.9252071
445	9409	0.0214208	445	11326	0.0257683	11220	0.0251928	10575	0.0236733	0.0248782	445	0.0214208	0.0248782	0.8610283
454	12371	0.0281642	454	10800	0.0245716	12306	0.0276313	12012	0.0268902	0.0263644	454	0.02816417	0.0263644	1.0682668
463	8841	0.0201277	463	10542	0.0239846	10113	0.0227072	9760	0.0218489	0.0228469	463	0.02012767	0.0228469	0.8809806
474	9725	0.0221402	474	9026	0.0205355	10453	0.0234706	10131	0.0226794	0.0222285	474	0.02214021	0.0222285	0.9960280
483	6435	0.0146501	483	6081	0.0138352	7058	0.0158477	6851	0.0153367	0.0150065	483	0.0146501	0.0150065	0.9762487
492	8070	0.0183724	492	7417	0.0168748	8199	0.0184096	7552	0.0169060	0.0173968	492	0.01837239	0.0173968	1.0560789
500	4876	0.0111008	500	5144	0.0117034	5491	0.0123292	5745	0.0128608	0.0122978	500	0.01110084	0.0122978	0.9026687
Summe Peakflächen	439246		Summe Peakflächen	439532		445365		446705						

Abbildung A.37: Aufbereitung der Daten in einer Exceltabelle, (a) und (b) „Intrasample Normalisation“, (c) „Intersample Normalisation“

Länge (nt)	SALSA MLPA Sonden	MV Lokation	chromosomale Position	PAM Order	Probe 1
140	SEMA3B-3	03-050282676	3p21	1	0.9483705
328	RASSF1 - 1	03-050353347	3p21	2	0.9231722
241	DEPDC1B - 1	05-060018734	5q12	3	1.0151061
409	MCCC2 - 16	05-070984253	5q13	4	0.8346729
184	GPR98 - 90	05-090495354	5q14	5	1.0430594
226	APC - 1	05-112071337	5q22	6	1.0934010
214	LMNB1 - 7	05-126184598	5q23	7	0.8651992
233	PTEN - 1	10-089814103	10q23	8	1.0314957
463	PTEN - 9	10-089714978	10q23	9	0.8809806
400	CEP290 - 26	12-087019051	12q21	10	1.2543494
155	BTGL AREA -	12-090905485	12q21	11	1.0920083
202	PAH - 3	12-101812649	12q23	12	1.1660488
454	BMP4 - 4	14-053488631	14q22	13	1.0682668
283	GCH1 - 6b	14-054380537	14q22	14	1.0336177
319	RDH12 - 7	14-067263397	14q22	15	0.9403631
346	THBS1 - 1	15-037660490	15q14	16	1.0768573
148	CAPN3 - 16	15-040479002	15q15	17	0.9484191
172	FBN1 - 4	15-046679657	15q21	18	1.2833557
483	CASR - 7	03-123485226	3q21	19	0.9762487
373	ATR - 47	03-143651064	3q23	20	1.0492398
193	HTLF - 1	03-150286916	3q24	21	1.0042892
382	PDCD10 - 5	03-168905298	3q26	22	1.1145284
427	PIK3CA - 2	03-180399608	3q26	23	0.9567704
265	TPMT - 5	06-018247829	6p22	24	0.8106120
301	HFE - 2	06-026198995	6p22	25	1.0305606
274	FANCE - 7	06-035535433	6p21	26	0.8642299
136	GATA3 - 1	10-008136773	10p14	27	0.9767793
364	CUGBP2 - 6	10-011017023	10p14	28	0.9635525
436	FGF23 - 1	12-004358933	12p13	29	0.9252071
474	ETV6 - 5	12-011913651	12p13	30	0.9960280
247	ABCC4 - 23	13-094525703	13q32	31	1.0007554
418	PCCA - 6	13-099607548	13q32	32	0.8469898
291	PCCA - 11	13-099718959	13q32	33	1.0589017
492	FGF14 - 2	13-101366785	13q33	34	1.0560789
124			7q11		1.0393801
130			13q13		1.0008874
160			7q31		1.3915766
167			17q21		0.7695118
178			10q11		1.0562207
208			14q11		1.0150604
220			10q22		0.8466643
255			21q11		1.1514062
310			2p25		1.1171044
337			13q13		1.0194492
355			2p13		1.0503396
390			17q21		0.7302619
445			2p11		0.8610283
500			11p15		0.9026687

Abbildung A.38: Sortierung mithilfe der „PAM Orders“

Listing 1: Skript Programm R: Paket pamr

```

1 source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
2 biocLite("pamr")
3
4 library (pamr)
5 pamrBlExcel<-pamr.from.excel('C:/PAM data/all_normalisationNKI_nb_110131_Lennart.
   txt', 86, sample.labels=TRUE, batch.labels= FALSE)
6 #86 is the number of column in the input file
7 #be aware of the right input file path name
8
9 #trainen
10 pamr_b1_vs_spor.train <- pamr.train(pamrBlExcel)
11
12 #predict
13 pamrBlExceltest<-pamr.from.excel('C:/PAM data/2016-06-08 Auswertung MLPA Run 10_
   bearbeitet.txt', 3, sample.labels=TRUE, batch.labels= FALSE)
14 #20 is the number of columns in the input file
15
16 test_predict<-pamr.predict(pamr_b1_vs_spor.train, pamrBlExceltest$x, threshold=0)
17 table( pamrBlExceltest$y,test_predict)
18
19 #variations in prediction
20 test_predict<-pamr.predict(pamr_b1_vs_spor.train, pamrBlExceltest$x, threshold=0,
   type= "posterior")
21 test_predict
22
23 data.frame(SampleID=pamrBlExceltest$samplelabels, test_predict)
24
25 write.table(data.frame(sample=pamrBlExceltest$samplelabels, test_predict), sep="\t"
   , row.names=F, file='C:/PAM data/PAMR_RESULTS_20120301.txt')

```

Listing 2: Skript Programm R: Befehl maxstat (am Beispiel der *ATM* mRNA-Genexpression beim Gesamtüberleben in der Gesamtkohorte)

```

1 test <- maxstat_test(Surv(monatebiszensus, event=Tod) ~ RQ_ATM, data = dat)
2 cutpoint <- as.numeric(unlist(test@estimates)[1])
3 cutpoint
4 dat$groesser.cutoff.ATM <- as.numeric(dat$RQ_ATM > cutpoint)
5
6 atmpplot <- survfit(Surv(monatebiszensus, event=Tod) ~ I(RQ_ATM > as.numeric(
   test@estimates$estimate[[1]])), data = dat, conf.int=0.95, type="kaplan-meier")
7 plot(atmpplot, conf.int=FALSE, col=c('green','blue'), lty = 1:2, , xlab = "Überleben
   in Monaten", ylab = "kum. Überleben", las=1)
8 legend(60,0.95,c("Genexpression < 0,363","Genexpression 0,363"), col=c('green',
   'blue'), lty = 1:2, cex=0.8)
9 mtext(text="p= 0,504", side=3, adj=1, font=4, cex=0.7)
10 survdiff(Surv(monatebiszensus, event=Tod) ~ I(RQ_ATM > as.numeric(test@estimates$
   estimate[[1]])), data = dat)
11 atmpplot
12 cphb_atm = coxph(Surv(monatebiszensus, event=Tod) ~ I(RQ_ATM > as.numeric(
   test@estimates$estimate[[1]])), data = dat)
13 cphb_atm
14 summary(cphb_atm)

```

Listing 3: Skript Programm R: Befehl maxstat (am Beispiel der *ATM* mRNA-Genexpression beim progressionsfreien Überleben in der Gesamtkohorte)

```

1 test <- maxstat_test(Surv(monatebiszensus_pfs, event=Rezidiv) ~ RQ_ATM, data = dat)
2 cutpoint <- as.numeric(unlist(test@estimates)[1])

```

```

3 | cutpoint
4 | dat$groesser.cutoff.ATM <- dat$RQ_ATM > cutpoint
5 |
6 | atmplot <- survfit(Surv(monatebiszensus_pfs, event=Rezidiv) ~ I(RQ_ATM > as.numeric
   |   (test@estimates$estimate[[1]])), data = dat, conf.int=0.95, type="kaplan-meier"
   |   )
7 | plot(atmplot, conf.int=FALSE, col=c('green','blue'), lty = 1:2, , xlab = "
   |   Progressionsfreies Überleben in Monaten", ylab = "
   |   Progressionswahrscheinlichkeit", las=1)
8 | legend(50,0.95,c("Genexpression < 0,396","Genexpression      0,396"), col=c('green',
   |   'blue'), lty = 1:2, cex=0.8)
9 | mtext(text="p= 0,230", side=3, adj=1, font=4, cex=0.7)
10 | survdiff(Surv(monatebiszensus_pfs, event=Rezidiv) ~ I(RQ_ATM > as.numeric(
   |   test@estimates$estimate[[1]])), data = dat)
11 | atmplot
12 | cphb_atm = coxph(Surv(monatebiszensus_pfs, event=Rezidiv) ~ I(RQ_ATM > as.numeric(
   |   test@estimates$estimate[[1]])), data = dat)
13 | cphb_atm
14 | summary(cphb_atm)

```

Listing 4: Skript Programm R: Befehl coxph (Cox Proportional-Hazard model, am Beispiel von drei ausgewählten Variablen beim Gesamtüberleben)

```

1 | multi.cox <- coxph(Surv(monatebiszensus, event=Tod) ~ dat$groesser.cutoff.BRIP1 +
   |   dat$m1pa + dat$tumorrest, data=dat)
2 | summary(multi.cox)

```

Listing 5: Skript Programm R: Befehl coxph (Cox Proportional-Hazard model, am Beispiel von drei ausgewählten Variablen beim progressionsfreien Überleben)

```

1 | multi.cox <- coxph(Surv(monatebiszensus_pfs, event=Rezidiv) ~ dat$groesser.cutoff.
   |   BRIP1 + dat$groesser.cutoff.RAD51C + dat$tumorrest, data=dat)
2 | summary(multi.cox)

```

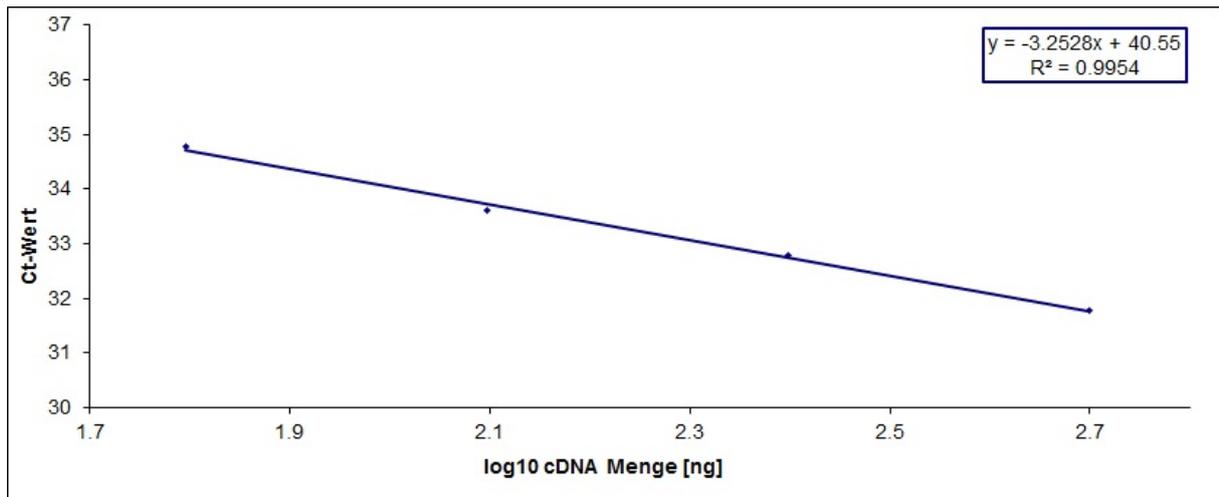


Abbildung A.39: Darstellung der linearen Regressionsgerade, *ALAS1* (Haushaltsgen),  $m = -3,25$

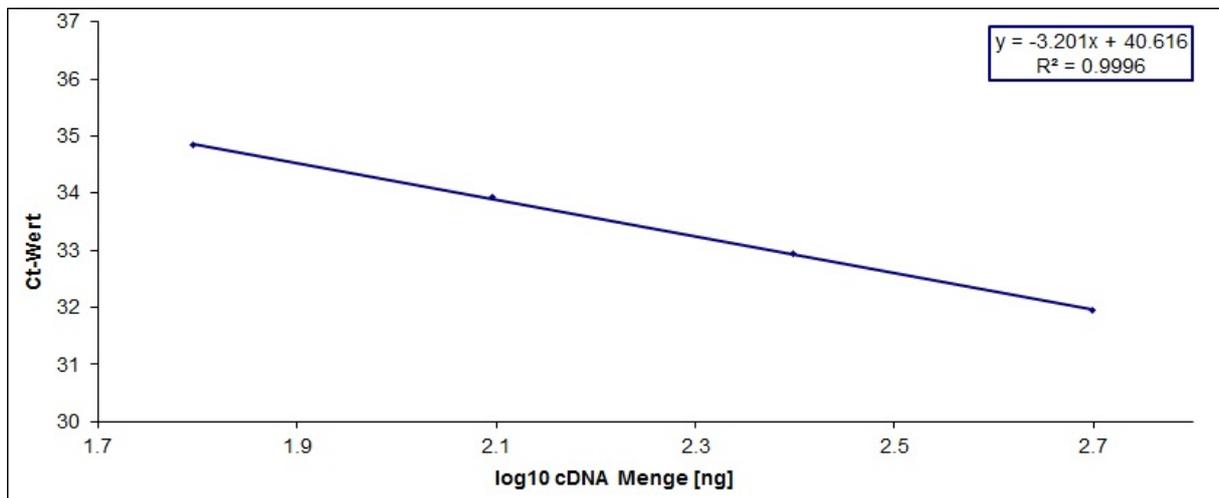


Abbildung A.40: Darstellung der linearen Regressionsgerade, *BRCA1*,  $m = -3,20$

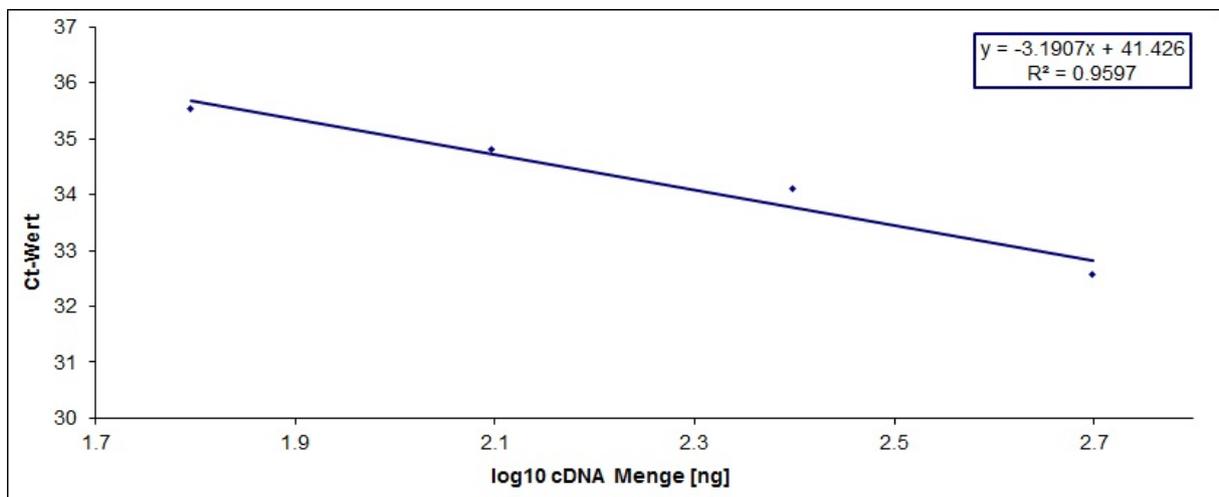
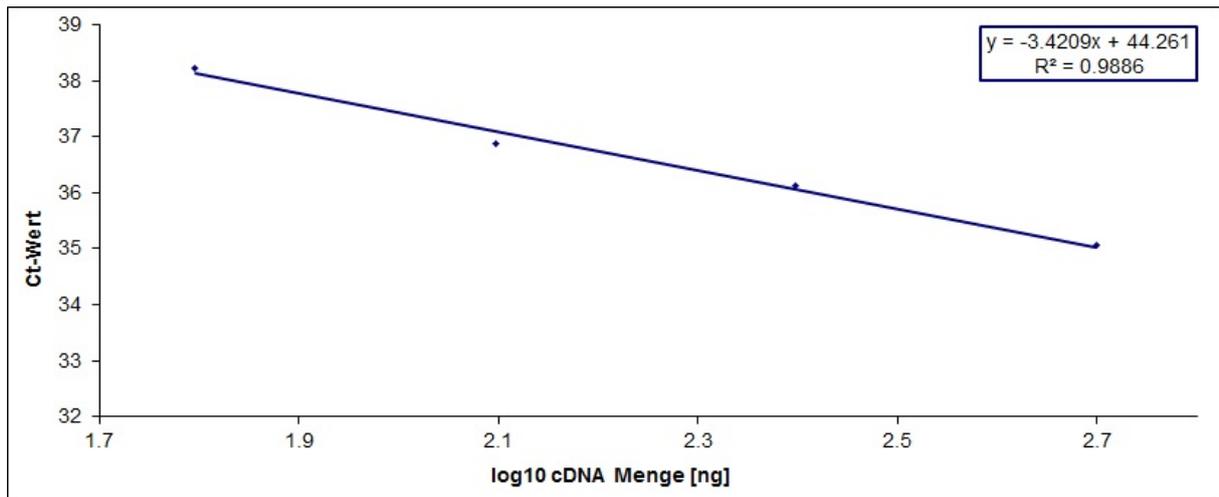
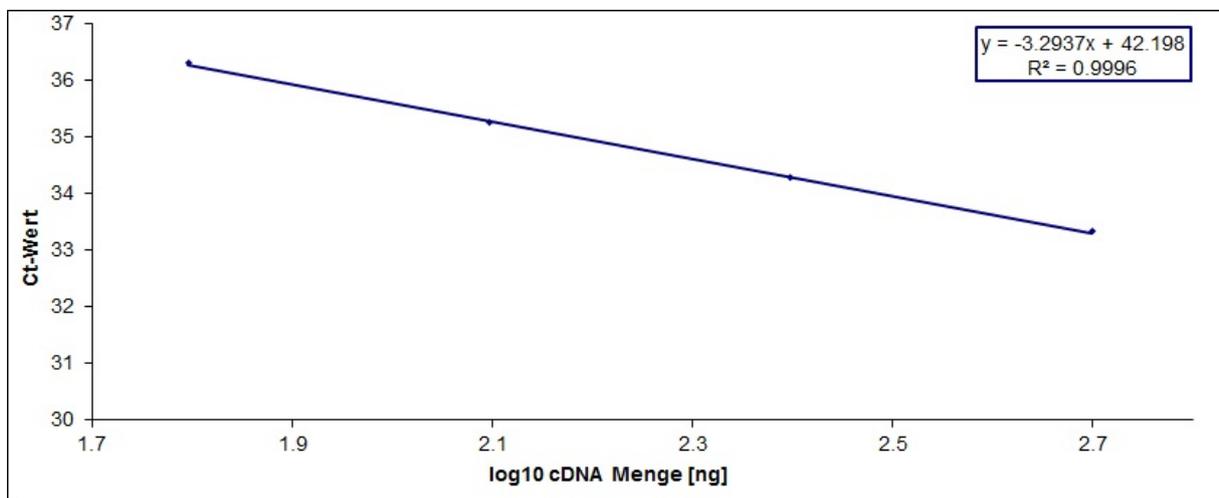
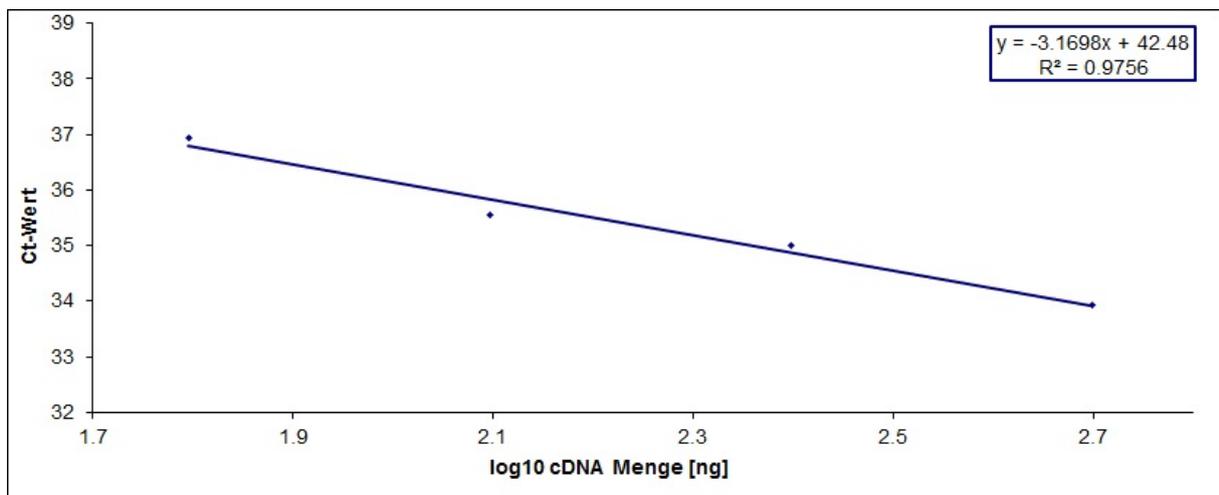


Abbildung A.41: Darstellung der linearen Regressionsgerade, *BRIP1*,  $m = -3,91$

Abbildung A.42: Darstellung der linearen Regressionsgerade, *CHEK2*,  $m = -3,42$ Abbildung A.43: Darstellung der linearen Regressionsgerade, *RAD51C*,  $m = -3,29$ Abbildung A.44: Darstellung der linearen Regressionsgerade, *RAD51D*,  $m = -3,17$

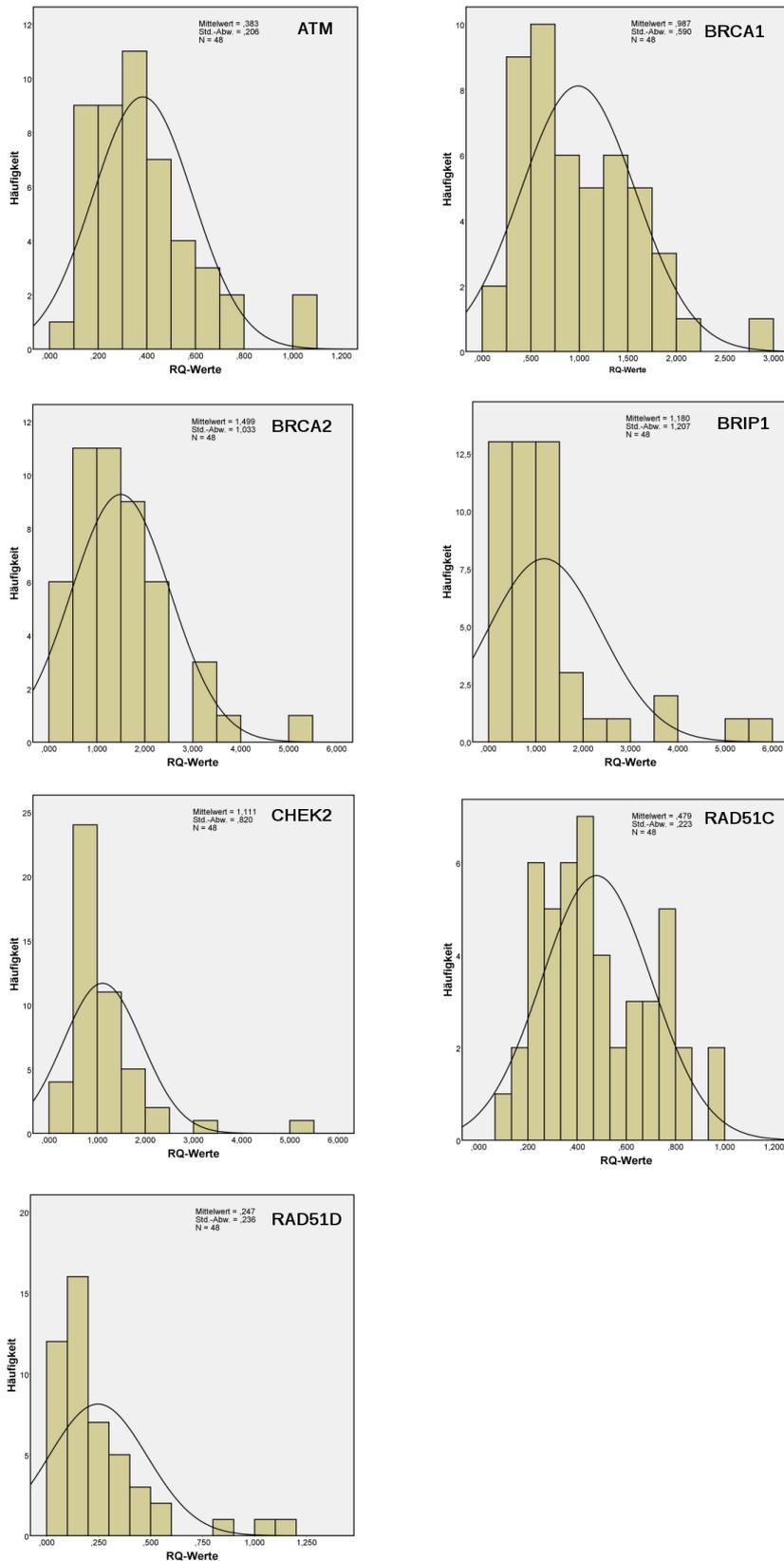


Abbildung A.45: Histogramme der RQ-Werte von *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *RAD51C* und *RAD51D*

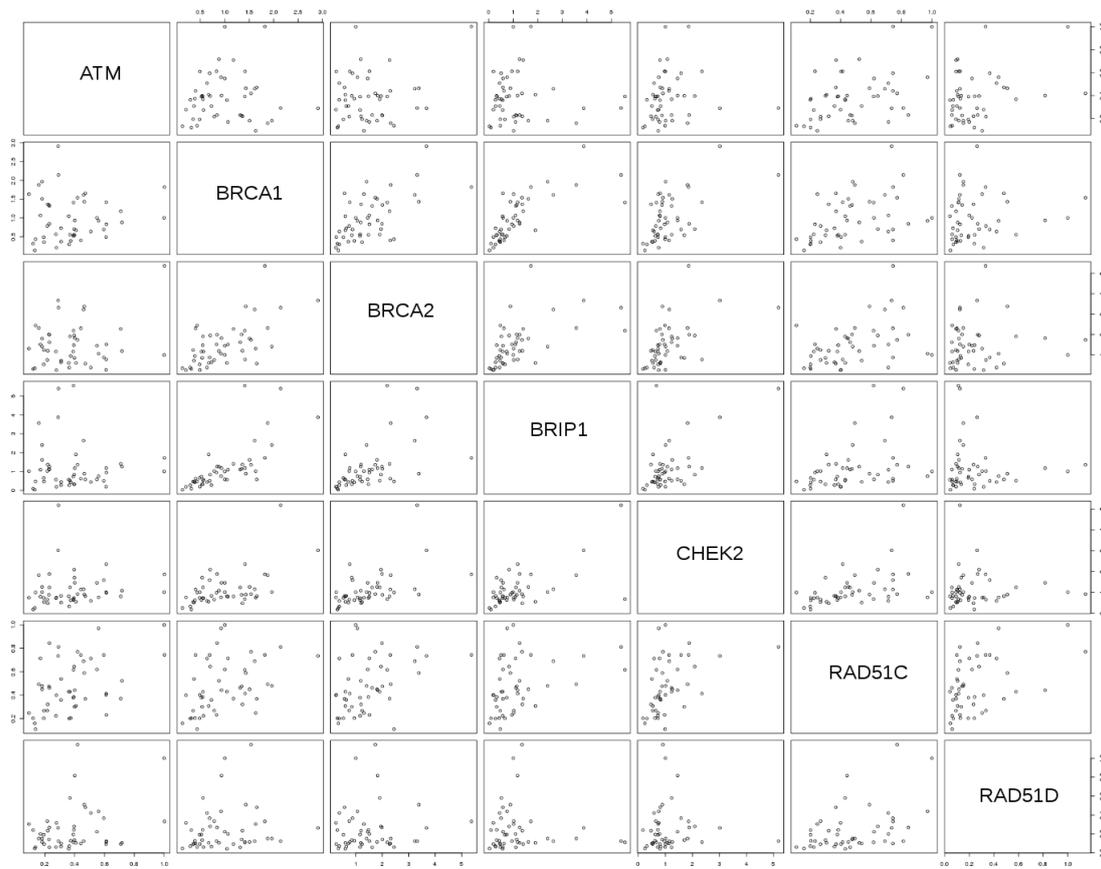


Abbildung A.46: Streudiagramme der mRNA-Expressionswerte von *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *RAD51C* und *RAD51D*

## Tabellen

Tabelle A.35: SALSA MLPA P376-B3 BRCA1ness Probemischung

Länge(nt)	SALSA MLPA Sonden	chromosomale Position				
		Referenz	BRCA1	BRCA2	Lost im BRCA1-like <sup>aCGH</sup> Profil	Gained im BRCA1-like <sup>aCGH</sup> Profil
64-70-76-82	Q-Fragmente					
88-92-96	D-Fragmente					
100	X-Fragmente					
105	Y-Fragmente					
124	Referenzsonde	7q11				
130	BRCA2 Sonde		13q13			
134	GATA3 Sonde					10p14
140	SEMA3B Sonde				3p21	
148	CAPN3 Sonde				15q15	
155	BTG1 AREA Sonde				12q21	
160	Referenzsonde	7q31				
167	BRCA1 Sonde		17q21			
172	FBN1 Sonde				15q21	
178	Referenzsonde	10q11				
184	GPR98 Sonde				5q14	
193	HLTF Sonde					3q24
202	PAH Sonde				12q23	
208	Referenz Sonde	14q11				
214	LMNB1 Sonde				5q23	
220	Referenzsonde	10q22				
226	APC Sonde				5q22	
233	PTEN Sonde				10q23	
241	DEPDC1B Sonde				5q12	
247	ABCC4 Sonde					13q32
255	Referenzsonde	21q11				
265	TPMT Sonde					6p22
274	FANCE Sonde					6p21
283	GCH1 Sonde				14q24	
291	PCCA Sonde					13q32
301	HFE Sonde					6p22
310	Referenzsonde	2p25				
319	RDH12 Sonde				14q22	
328	RASSF1 Sonde				3p21	
337	BRCA2 Sonde		13q13			
346	THBS1 Sonde				15q14	
355	Referenzsonde	2p13				
364	LOC254312 Sonde					10p14
373	ATR Sonde					3q23
382	PDCD10 Sonde					3q26
390	BRCA1 Sonde		17q21			
400	CEP290 Sonde				12q21	
409	MCCC2 Sonde				5q13	
418	PCCA Sonde					13q32
427	PIK3CA Sonde					3q26
436	FGF23 Sonde					12p13
445	Referenzsonde	2p11				
454	BMP4 Sonde				14q22	
463	PTEN Sonde				10q23	
474	ETV6 Sonde					12p13
483	CASR Sonde					3q21
492	FGF14 Sonde					13q33
500	Referenzsonde	11p15				

## Veröffentlichungen

**T. Brunet**, S. Konrad, M. Kiechle, A. Meindl, J. Ramser, E. Gross (2018). »Identification of therapy-relevant „BRCAness“-associated candidate genes in ovarian cancer«. Posterbeitrag, European Society of Human Genetics (ESHG) Conference 2018

E. Gross, **T. Brunet**, R. Napieralski<sup>1</sup>, T. Singer, M. Aubele, M. Schmitt, A. Meindl, E. Lips, M. Kiechle (2016). »Validation of a BRCAness test to select for targeted therapies in triple-negative breast cancer«. Posterbeitrag (ID 0383), 32. Deutscher Krebskongress 2016

## Danksagung

- Zuallererst geht mein großer Dank an Frau Prof. Marion Kiechle für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung der Experimente und die fachliche Betreuung.
- Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Frau Dr. Eva Gross für die exzellente Betreuung und herausragende Unterstützung während allen Phasen der Doktorarbeit bedanken.
- Ich möchte zudem dem gesamten Team der gynäkologischen Tumorgenetik danken, das mich auf meinem Weg begleitet hat und mir immer helfend zur Seite stand: Ich bedanke mich von Herzen bei Frau Dr. Juliane Ramser, Frau Heide Hellebrand, Frau Stefanie Engert, Frau Kathrin Holz, Herrn Marko Bertone und Herrn André Kis sowie Herrn Prof. Meindl und Frau PD Dr. Anne Quante.
- Mein besonderer Dank geht an Frau Sarah Konrad, die nicht nur in fachlicher Hinsicht immer für mich da war.
- Ich bedanke mich außerdem bei Frau Dr. Maria Kaffe, die mein Interesse für Genetik geweckt hat und mich als Mentorin begleitet hat.
- Ich danke dem ganzen Team des Statistik-Kolloquiums sowie Herrn Dr. Philipp Sckopke für die Unterstützung bei allen statistischen Fragen.
- Zum Schluss geht mein Dank an meine Eltern, Antonia, meine Freunde und Jan für ihre unbeirrbar Zuversicht und unermüdliche Unterstützung.
- Zuallerletzt möchte ich allen Patientinnen danken, die an dieser Studie teilgenommen haben und dadurch diese Doktorarbeit erst möglich gemacht haben.