

Aus der Klinik für Gynäkologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekulargenetische Charakterisierung der Gene  
Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC  
in Normalgewebe des Ovars, benigne und maligne  
transformierten Ovarien

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Leib

aus Berlin

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. J. Sehouli  
                          2. Prof. Dr. med. J. Blohmer  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. H. Oettle

Datum der Promotion: 07.09.2012

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Das Ovarialkarzinom</b>	<b>6</b>
2.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und molekulare Grundlagen von Ovarialtumoren	7
2.1.2	Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms	8
2.1.3	Histopathologische Klassifikation benigner und maligner Ovarialtumoren	9
2.1.4	Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms	10
2.1.4	Zelluläre Heterogenität des Ovarialgewebes	12
2.1.6	Identifizierung von Kandidatengenomen der Tumorgenese durch in-silico-Analyse	13
<b>2.2</b>	<b>Thymosin <math>\beta</math>-10</b>	<b>14</b>
2.2.1	Chromosomale Lokalisation, genetische Architektur und molekularer Aufbau	14
2.2.2	Regulation, Funktion und Interaktion	14
2.2.3	Thymosin $\beta$ -10-Expression im Ovar	15
2.2.4	Thymosin $\beta$ -10-Expression in Karzinomen	15
<b>2.3</b>	<b>SPARC</b>	<b>16</b>
2.3.1	Chromosomale Lokalisation, genetische Architektur und molekularer Aufbau	16
2.3.2	Regulation, Funktion und Interaktion	16
2.3.3	SPARC-Expression im Ovar	17
2.3.4	SPARC-Expression in Karzinomen	18
<b>2.4</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Patientinnen, Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientinnenkollektiv</b>	<b>21</b>
3.1.1	Probenmaterial für die RNA-in-situ-Hybridisierung	22
3.1.2	Probenmaterial des Multi Tissue Northern-Blots	23
3.1.3	Probenmaterial des Dot-Blots	23
3.1.4	Probenmaterial des Cancer Profiling Arrays	23
<b>3.2</b>	<b>Material</b>	<b>25</b>
3.2.1	Chemikalien und Enzyme	25
3.2.2	Radiochemikalien	25
3.2.3	Bakterienstämme und Herkunft der cDNA-Klone	25

3.2.4	Sonden und Primer für die Sequenzierung	26
3.2.5	Kits	26
3.2.6	Restriktionsenzyme	27
<b>3.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
3.3.1	Elektronischer Northern zur Identifizierung von Kandidatengen durch in silico-Analyse	28
3.3.2	DNA-Minipräparation mit dem BioRobot 9600	29
3.3.2.1	Agarosegel-Elektrophorese	29
3.3.2.2	Spektroskopische Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit	29
3.3.3	Sequenzierung	30
3.3.4	DNA-Maxipräparation	31
<b>3.3.5</b>	<b>Northern Hybridisierung</b>	<b>32</b>
3.3.5.1	Sondenherstellung für die Hybridisierungsverfahren	33
3.3.5.2	Herstellung von Kontroll-Dot-Blot-Membranen	34
3.3.5.3	Hybridisierung des Multi-Tissue-Northern-Blots	34
3.3.5.4	Hybridisierung des Dot-Blots	35
3.3.5.5	Hybridisierung des Cancer Profiling Arrays	35
<b>3.3.6</b>	<b>RNA-in-situ-Hybridisierung</b>	<b>36</b>
3.3.6.1	Herstellung der spezifischen RNA-Sonden	36
3.3.6.2	Vorbereitung und Hybridisierung der Schnitte	37
3.3.6.3	Histochemische Anfärbung	38
3.3.6.4	Beurteilung der hybridisierten Schnitte	39
<b>3.3.7</b>	<b>Statistik</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakteristika des Patientinnenkollektivs</b>	<b>41</b>
4.1.1	Altersverteilung	42
4.1.2	Histologische Tumorklassifikation	42
4.1.3	Differenzierungsgrad	43
4.1.4	Postoperativer Tumorrest	43
4.1.5	Tumor-Stadieneinteilung nach FIGO	44
4.1.6	Tumorklassifikation nach TNM	45
4.1.7	präoperativer CA125-Wert	45
4.1.8	Aszites	46

<b>4.2</b>	<b>Identifizierung der Überexpression von Thymosin <math>\beta</math>-10 und SPARC in Ovarialkarzinomen mittels elektronischem Northern</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Validierung der Thymosin <math>\beta</math>-10- und SPARC-Expression in kommerziellen Northern-Blot-Arrays</b>	<b>48</b>
4.3.1	Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Multi Tissue Northern-Blot	48
4.3.2	Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Dot-Blot	50
4.3.3	Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Cancer Profiling Array	52
<b>4.4</b>	<b>RNA-in-situ-Hybridisierung</b>	<b>55</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Deskriptive Charakterisierung der Thymosin <math>\beta</math>-10-mRNA-Expression in Ovargewebe unterschiedlicher Dignität</b>	<b>55</b>
4.4.1.1	Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in Normalgeweben des Ovars	55
4.4.1.2	Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in benignen Ovarialtumoren	56
4.4.1.3	Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in primären Ovarialkarzinomen	57
4.4.1.4	Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in rezidierten Ovarialkarzinomen	58
<b>4.4.2</b>	<b>Statistische Analyse der zellulären Thymosin <math>\beta</math>-10-mRNA-Expression</b>	<b>59</b>
4.4.2.1	Vergleich der Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression im Epithel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität	59
4.4.2.2	Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression im Epithel mit klinisch-histopathologischen Parametern	60
4.4.2.3	Vergleich der Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression im Stroma von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität	61
4.4.2.4	Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression im Stroma mit klinisch-histopathologischen Parametern	62
4.4.2.5	Vergleich der Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression im Endothel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität	63
4.4.2.6	Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression im Endothel mit klinisch-histopathologischen Parametern	64
<b>4.4.3</b>	<b>Deskriptive Charakterisierung der SPARC-mRNA-Expression in Ovargewebe unterschiedlicher Dignität</b>	<b>66</b>
4.4.3.1	SPARC-mRNA-Expression in Normalgeweben des Ovars	66
4.4.3.2	SPARC-mRNA-Expression in benignen Ovarialtumoren	67
4.4.3.3	SPARC-mRNA-Expression in primären Ovarialkarzinomen	68

4.4.3.4	SPARC-mRNA-Expression in rezidierten Ovarialkarzinomen	69
<b>4.4.4</b>	<b>Statistische Analyse der zellulären SPARC-mRNA-Expression</b>	<b>70</b>
4.4.4.1	Vergleich der SPARC-mRNA-Expression im Epithel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität	70
4.4.4.2	Korrelation der SPARC-mRNA-Expression im Epithel mit klinisch-histopathologischen Parametern	71
4.4.4.3	Vergleich der SPARC-mRNA-Expression im Stroma von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität	72
4.4.4.4	Korrelation der SPARC-mRNA-Expression im Stroma mit klinisch-histopathologischen Parametern	73
4.4.4.5	Vergleich der SPARC-mRNA-Expression im Endothel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität	74
4.4.4.6	Korrelation der SPARC-mRNA-Expression im Endothel mit klinisch-histopathologischen Parametern	75
<b>4.5</b>	<b>Statistische Auswertung von Nachbeobachtungszeit und Überleben</b>	<b>77</b>
4.5.1	Univariate Analyse zum Einfluss von Prognosefaktoren auf das postoperative Überleben	78
4.5.2	Multivariate Analyse zum Einfluss von Prognosefaktoren auf das postoperative Überleben	85
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
<b>5.1</b>	<b>Epidemiologische Daten</b>	<b>91</b>
5.2	Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im elektronischen Northern	94
5.2.1	Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im MTN-Blot	95
5.2.2	Thymosin $\beta$ -10-Expression im Dot-Blot und Cancer Profiling Array	95
5.2.3	SPARC-Expression im Dot-Blot und Cancer Profiling Array	96
<b>5.3</b>	<b>Expressionsanalyse der Gene Thymosin <math>\beta</math>-10 und SPARC mittels RNA-in-situ-Hybridisierung</b>	<b>97</b>
5.3.1	Thymosin $\beta$ -10-Expression im Epithel	98
5.3.1.1	Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Epithel mit klinisch-histopathologischen Faktoren	99
5.3.1.2	Prognostische Bedeutung der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Epithel	99
5.3.2	Thymosin $\beta$ -10-Expression im Stroma	100

5.3.2.1	Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Stroma mit klinisch-histopathologischen Faktoren	100
5.3.2.2	Prognostische Bedeutung der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Stroma	100
5.3.3	Thymosin $\beta$ -10-Expression im Endothel	100
5.3.3.1	Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Endothel mit klinisch-histopathologischen Faktoren	101
5.3.3.2	Prognostische Bedeutung der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Endothel	101
5.3.4	SPARC-Expression im Epithel	102
5.3.4.1	Korrelation der SPARC-Expression im Epithel mit klinisch-histopathologischen Faktoren	103
5.3.4.2	Prognostische Bedeutung der SPARC-Expression im Epithel	104
5.3.5	SPARC-Expression im Stroma	104
5.3.5.1	Korrelation der SPARC-Expression im Stroma mit klinisch-histopathologischen Faktoren	106
5.3.5.2	Prognostische Bedeutung der SPARC-Expression im Stroma	106
5.3.6	SPARC-Expression im Endothel	107
5.3.6.1	Korrelation der SPARC-Expression im Endothel mit klinisch-histopathologischen Faktoren	108
5.3.6.2	Prognostische Bedeutung der SPARC-Expression im Endothel	109
<b>5.4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>129</b>
9.1	Puffer, Lösungen und Medien	129
9.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	130
9.3	Danksagung	133
9.4	Lebenslauf	134
9.5	Erklärung	135

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist in Gesamtdeutschland mit einer für das Jahr 2010 projizierten Inzidenz von 9960 Erkrankungsfällen nach dem Endometriumkarzinom der zweithäufigste maligne Genitaltumor [RKI, 2010]. Die Krankheit beginnt meist asymptomatisch und ist durch eine frühe Ausbreitung im Peritonealraum gekennzeichnet. Mehr als 75 % der Frauen werden im fortgeschrittenen FIGO-Stadium III oder IV diagnostiziert. Die Standardtherapie umfasst eine auf maximale Tumorreduktion bedachte multiviszzerale Operation, gefolgt von einer Kombinationschemotherapie aus Carboplatin und Paclitaxel. Obwohl das Ovarialkarzinom eine hohe Chemosensitivität aufweist, rezidivieren über 50 % der Patientinnen in den ersten drei Jahren nach Primärtherapie und versterben schließlich an dieser Erkrankung [Sehouli, 2004]. Trotz einer wesentlichen Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit in den letzten Jahren durch die primäroperative und medikamentöse Therapie, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Stadien zwischen 35 - 49 % [RKI, 2010]. Ein möglicher Grund für die schlechte Prognose ist das Fehlen relevanter Marker für die Früherkennung des Ovarialkarzinoms. Auch sind unsere Kenntnisse über die zugrundeliegenden molekularen Veränderungen, die zur Entstehung eines Ovarialkarzinoms führen, weiterhin lückenhaft. Zytogenetische Analysen haben eine hohe Inzidenz sowohl struktureller als auch numerischer Chromosomenaberrationen offenbart, deren vermehrtes Auftreten scheinbar mit weiterer Tumorprogression einhergeht [Arnold, 1996; Iwabuchi, 1995; Saretzki 1997].

Ovarialkarzinome sind eine histopathologisch und genetisch heterogene Gruppe von Tumoren. Die morphologische Beurteilung könnte in Zukunft durch ein für jedes Ovarialkarzinom spezifisches Genexpressionsprofil ergänzt werden, mit dem begleitende Aussagen zum Krankheitsverlauf und die Zuordnung zu einer Therapie im Rahmen des genetisch festgelegten Fensters ermöglicht werden. Ein aktueller Fokus in der tumorbiologischen Erforschung des Ovarialkarzinoms ist die Validierung von Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC in Normalgewebe des Ovars, benigne und maligne transformierten Ovarien.



### **2.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und molekulare Grundlagen von Ovarialtumoren**

Zwischen dem 20.-65. Lebensjahr treten 80 - 90 % aller Ovarialtumoren auf. 75 - 80 % sind davon benigne und 55 - 65 % dieser benignen Ovarialtumoren treten bei Frauen unter 40 Jahren auf. Dagegen sind 80 - 90 % der Ovarialtumoren bei Frauen über 40 Jahren maligne oder entsprechen Borderline Tumoren. Grundsätzlich nimmt die Häufigkeit von malignen epithelialen Ovarialtumoren vom 20. bis zum 80. Lebensjahr stetig zu, um danach wieder abzusinken. Das mittlere Erkrankungsalter der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom liegt bei 68 Jahren [RKI, 2010; Schmidt, 2007].

Histologisch sind im Ovar mehrere Zellarten vertreten. Neben dem Oberflächenepithel und den Stromafibroblasten kommen auch Endothel-, Keim- und Immunzellen vor. Jeder Zelltyp besitzt potenziell die Fähigkeit zur malignen Entartung. Das Ovarialkarzinom entsteht definitionsgemäß aus dem Oberflächenepithel. Mehr als 90 % der Ovarialkarzinome entstehen als sporadische Erkrankung des Oberflächenepithels. 5 - 10 % aller Ovarialkarzinome sind auf angeborene Mutationen zurückzuführen. Der zugrunde liegende Erbgang ist autosomal-dominant. Familiäre Ovarialkarzinome treten im Mittel zehn Jahre früher als sporadische Ovarialkarzinome auf [Kiechle, 2002; Runnebaum, 2001].

Die Ursachen für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms sind noch nicht endgültig geklärt. Es wurden die Ovulations-, die Gonadotropin- und die Kontaminationshypothese formuliert. Wiederholte Rupturen des Oberflächenepithels bei der Ovulation und damit einhergehende Reparaturprozesse ermöglichen die Entstehung spontaner Mutationen und erhöhen damit das Risiko der Karzinomentstehung [Levanon, 2008]. Multiparität, Stillen und die Einnahme oraler Kontrazeptiva senken demgemäss das Risiko für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms [Friedrich, 2005]. Die Gonadotropinhypothese hält erhöhte Serumspiegel von FSH und LH bzw. Androstendion und Dehydroepiandrosteron für ursächlich und begründet sie mit dem protektiven Effekt einer Schwangerschaft bzw. der Einnahme oraler Kontrazeptiva [Levanon, 2008]. Die Kontaminationshypothese geht von einer aufsteigenden Infektion des kleinen Beckens z. B. durch Umwelttoxine aus [Holschneider, 2000; Cramer, 1999]. In neueren Untersuchungen wird vermutet, dass endometroide Karzinome aus Endometrioseherden und somit aus dem versprengten Müllergangsepithel entstehen können [Kobayashi, 2009]. Aktuelle Studien diskutieren das Epithel der Tubenschleimhaut, insbesondere der Fimbrienenden, als Ausgangspunkt von Ovarialkarzinomen. Grund für diese Theorie sind die bei der histologischen Aufarbeitung von Adnexen auffallend häufig aufgefundenen In-situ-Karzinome des Tubenepithels bei Trägerinnen von BRCA-1/-2-Mutationen [Carlson, 2008].

### **2.1.2 Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms**

Es gibt aktuell keine Screeningmaßnahme zur primären Prävention des Ovarialkarzinoms und auch die Screeningverfahren zur sekundären Prävention, d. h. zur Diagnose eines Ovarialkarzinoms im Frühstadium sind limitiert. Sowohl die durch Dopplersonografie ergänzte vaginale Sonografie, als auch der laborchemisch im Blutserum bestimmte Tumormarker CA 125 weisen noch keine ausreichende Sensitivität und Spezifität auf. Die Ausschaltung von Risikofaktoren und die in einem „High Risk“-Kollektiv in kurzen Intervallen durchgeführten o.g. Untersuchungen bzw. die prophylaktische beidseitige Adnektomie bei Patientinnen mit hereditären Mutationen und abgeschlossener Familienplanung stellen die einzige Möglichkeit zur Senkung des Erkrankungsrisikos und der Mortalität dar. Als Risikofaktoren gelten:

#### **Alter**

Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz des Ovarialkarzinoms [RKI, 2010].

#### **“Life Time“-Ovulationen**

Eine lange reproduktive Phase mit früher Menarche und später Menopause, sowie Nulliparität und Infertilität erhöhen das Risiko für ein Ovarialkarzinom. Multiple Graviditäten, Laktationsphasen und Ovulationshemmer senken das Ovarialkarzinomrisiko [Friedrich, 2005; Levanon, 2008; Narod, 1998]. In aktuellen Untersuchungen gibt es Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für Frauen mit postmenopausaler Hormonersatztherapie [Morch, 2009].

#### **Umweltfaktoren**

In den industrialisierten Ländern ist die Erkrankungsrate erhöht. Ein hoher Anteil an tierischen Fetten in der Ernährung und Rauchen scheint die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms zu begünstigen [La Vecchia, 1995; Levanon 2008; Purdie, 1995].

#### **familiäre Häufung**

In bis zu 10 % der Fälle handelt es sich um eine familiäre Disposition. Bei einer Mutation des BRCA-1-Gens besteht ein Risiko von 80 % für die Entstehung eines Mammakarzinoms und von 36 - 46 % für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms. Bei einer Mutation des BRCA-2-Gens besteht ein Risiko von 84 % für die Entstehung eines Mammakarzinoms und von 10 - 27 % für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms [Holschneider, 2000; Rebbeck, 2009]. Das hereditäre nichtpolypöse Kolorektalkarzinom-Syndrom ist mit einem Risiko von 5 - 10 % für ein Ovarialkarzinoms assoziiert [Holschneider, 2000; Runnebaum, 2001].

### 2.1.3 Histopathologische Klassifikation benigner und maligner Ovarialtumoren

Den größten Anteil benigner und maligner Ovarialtumoren bilden die epithelialen Tumoren mit ca. 65 - 75 %. Tumoren des gonadalen Stromas, sog. Keimstrang-Stroma-Tumoren beschränken sich auf ca. 10 % und Keimzelltumoren auf ca. 15 %. Die übrigen 3 % verteilen sich auf Lipidzelltumoren, Gonadoblastome und unspezifische Bindegewebstumoren [Scully, 1998]. Die epithelialen Ovarialtumoren sind eine heterogene Gruppe von Tumoren verschiedener Zelltypen. Die folgende Tabelle gibt die histologische Klassifikation epithelialer Ovarialtumoren nach WHO 1999 [Scully, 1999], mit den in Klammern stehenden prozentualen Anteilen an (Tab. 1).

Tab. 1: Histologische Klassifikation epithelialer Ovarialtumoren

Histologie epithelialer Ovarialtumoren	
serös	46 %
muzinös	36 %
endometroid	8 %
mesonephroid (klarzellig)	3 %
mixed (gemischt)	3 %
transitiv (übergangs) –zellig	2 %
undifferenziert	1 %
unklassifiziert	1 %

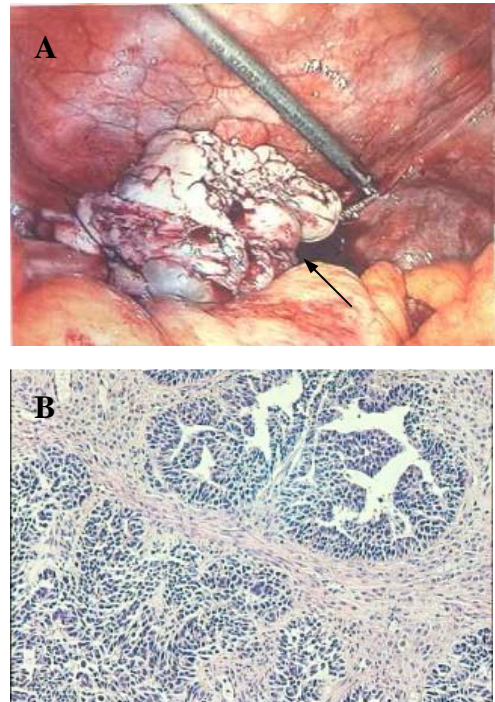


Abb. 1: Operationssitus einer Patientin mit serös-papillärem Ovarialkarzinom (Pfeil), Charité Berlin 2001 (A) und histologischer Schnitt, HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung (B).

### **2.1.4 Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms**

Wesentliche unabhängige prognostische Bedeutung weisen der postoperative Tumorrest, das FIGO-Stadium, der Differenzierungsgrad, die Histologie, das Alter bei Erstdiagnose und der klinische Allgemeinzustand auf. Der Aszitesnachweis scheint beim Ovarialkarzinom ebenfalls von prognostischer Bedeutung zu sein. Im Folgenden werden die genannten Prognosefaktoren erläutert:

#### **Postoperativer Tumorrest**

Mehrere Studien und Metaanalysen identifizieren den postoperativen Tumorrest als stärksten unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der Patientinnen mit Ovarialkarzinom [Bristow, 2002; Schmalfeldt, 2007]. Bei mikroskopischer Tumorfreiheit wird eine 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 63,5 %, bei makroskopisch negativem Tumorrest von 62,1 %, bei Tumorrest < 2cm von 32,9 % und bei einem Tumorrest von  $\geq 2$ cm von 24,8 % erreicht [Heintz, 2006]. Die Studiengruppe Ovar der AGO [AGO, 2007] zeigt, dass zwar Patientinnen mit Tumorrest  $\leq 1$ cm einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen mit Tumorrest > 1cm haben, der deutlichste Vorteil aber für die makroskopisch tumorfrei operierten Patientinnen erreicht wird. Es wird daher eine Einteilung des postoperativen Tumorrestes in makroskopisch tumorfrei, Tumorrest  $\leq 1$ cm und Tumorrest > 1cm empfohlen [Kommission Ovar der AG gynäkologische Onkologie, 2010].

#### **FIGO-Stadium**

Das Tumorstadium hat eine unabhängige prognostische Bedeutung für das 5-JÜR. Das FIGO-Stadium I zeigt eine 5-JÜR von 86,4 %, das FIGO-Stadium II von 69 %, das FIGO-Stadium III von 40,2 % und das FIGO-Stadium IV von 18,6 % [Heintz, 2006; Lichtenegger, 1998; Schildkraut, 2000; Schmalfeldt, 2007].

#### **Alter bei Erstdiagnose**

Ältere Patientinnen haben im Vergleich zu jüngeren eine deutlich ungünstigere Prognose beim Auftreten eines Ovarialkarzinoms. Im Alter von 40 - 49 Jahren liegt die 5-JÜR bei 62,1 %, im Alter von 50 - 59 Jahren bei 53,2 %, im Alter von 60 - 69 Jahren bei 44 %, bei Frauen zwischen 70 - 79 Jahren bei 33,3 % und bei den über 80-jährigen Frauen bei 23 % [Pfisterer, 2002; Schmalfeldt, 2007].

### **Differenzierungsgrad**

Der Differenzierungsgrad wird beim Ovarialkarzinom nicht einheitlich als unabhängiger Prognosefaktor diskutiert. Einige Studien zeigen nur in den frühen FIGO-Stadien I bzw. II einen Einfluss des Differenzierungsgrads auf das Überleben, andere zeigen unabhängig vom Tumorstadium eine prognostische Relevanz des Differenzierungsgrads [Ferlay, 2007; Heintz, 2006; Mayr, 2000]. Ursächlich für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte der fehlende internationale Standard zur Festlegung des Differenzierungsgrads sein, oder aber die Überdeckung der prognostischen Relevanz des Differenzierungsgrads durch den Einfluß des postoperativen Tumorrests und des FIGO-Stadiums [Kreienberg, 2009].

### **Histologie**

Seröse und endometroide Ovarialkarzinome weisen im Vergleich zu muzinösen oder klarzelligen Ovarialkarzinomen eine bessere Prognose auf, da sie besser auf eine konventionelle platinhaltige Chemotherapie ansprechen [Fujita, 2003]. Das muzinöse Ovarialkarzinom wird häufiger im Frühstadium erkannt und hat dann eine bessere Prognose, wird es erst spät erkannt hat es eine schlechtere Prognose als die anderen Subtypen [Kreienberg, 2009]. Die 5-JÜR beträgt für seröse Ovarialkarzinome im FIGO-Stadium I/II bzw. III/IV 83,9 % bzw. 31,9 %, für muzinöse Ovarialkarzinome 90 % bzw. 31 %, für endometroide Ovarialkarzinome 86,5 % bzw. 37 % und für klarzellige Karzinome 81 % bzw. 23,9 % [Brun, 2000; Ferlay, 2007; Heintz, 2006; Lichtenegger, 1998].

### **Klinischer Allgemeinzustand**

Der körperliche Allgemeinzustand ist ein weiterer prognostischer Faktor. Patientinnen mit einem Karnofsky-Index von < 70 % zeigen eine kürzere Überlebenszeit und eine Sterbewahrscheinlichkeit von > 70 % [Omura, 1991].

### **Aszites**

Der Aszitesnachweis scheint beim Ovarialkarzinom von prognostischer Bedeutung. Die 5-JÜR beträgt bei Patientinnen im FIGO-Stadium I ohne Aszites 80 % und mit Aszites 25 % und im FIGO-Stadium III und IV ohne Aszites 45 % und mit Aszites 5 % [Chi, 2001; Harter, 2006; Makar, 1995; Sehouli, 2003].

### **2.1.5 Zelluläre Heterogenität des Ovarialgewebes**

Sowohl die Ovarien als auch benigne und maligne transformiertes Ovargewebe bestehen aus verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen biologischen, biochemischen und immunologischen Eigenschaften. Epitheliale Zellen grenzen an Fibroblasten, Endothelzellen und extrazelluläre Matrix und bilden ein dynamisches Gleichgewicht. Diese Gewebshomöostase unterscheidet sich nicht nur bei Patientinnen mit histopathologisch unterschiedlichen Tumoren, sondern auch bei morphologisch sehr ähnlichen Karzinomen. Jeder Zelltyp kann potenziell maligne entarten. Gegenwärtig nimmt man an, dass etwa 90 % aller malignen Ovarialtumore vom Oberflächenepithel abstammen, das Ovarialstroma wird bisher als der weitgehend inaktive Teil betrachtet. Aktuelle Studien weisen auf die besondere Bedeutung der Stromatogenese, d. h. der Bildung eines spezifischen Stromas an Stellen der Tumorzellinvasion hin [Giatromanolaki, 2007]. Es gibt allerdings nur wenige Daten zur Bedeutung des Stromas beim Ovarialkarzinom. Nachgewiesen wurde, dass auch die Stromazellen innerhalb eines Ovarialkarzinoms genetische Veränderungen, teilweise identisch mit denen der Tumorzellen, aufweisen, da externe Einflüsse, wie ionisierende Strahlung, Tumorzellen und Stroma gleichermaßen schädigen [Tuhkanen, 2004]. Eine permissive Umgebung, in der die Tumorzellen überleben und proliferieren können wird benötigt und möglicherweise durch die Tumorzellen selbst induziert [Krtolica, 2002]. Die Regulation des Aktinfilamentsystems hat einen bedeutenden Einfluss auf Stabilität, Bewegung und Transportprozesse von Zellen. So sind Aktinfilamente, als große Gruppe der Strukturproteine, in Tumorzellen in anderer Menge und Zusammensetzung vorhanden als in gesundem Gewebe. Aktinfilamente sorgen für einen festen Zusammenhalt der Zellen. Daher erscheint es plausibel, dass es bei einer Verminderung bzw. Deregulation dieser Zellbestandteile zu einer Reduktion der Stabilität zugunsten der Mobilität bis hin zur Apoptose kommen kann [Lee, 2001; Wang, 2010]. Tumorzellen sind durch einen gegenüber Normalgewebe verminderten Aktinesamtgehalt und Gehalt an filamentösem (F-) Aktin charakterisiert und besitzen bis zu 1,8-fach erhöhte Mengen an globulärem (G-) Aktin [Stournaras, 1996]. In Untersuchungen von Zachary et al. an verschiedenen Karzinomen wurde gezeigt, dass eine quantitative Reduktion der Aktinfilamente mit einer erhöhten Invasivität von Zellen einhergeht [Zachary, 1986]. Gene, wie in der vorliegenden Arbeit Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC, die an der Regulation des Aktinfilamentsystems beteiligt sind, haben einen wesentlichen Einfluss auf Zellmotilität und Proliferation und damit vermutlich auf Tumorsuppression, Tumorentstehung und Tumorprogression.

### **2.1.6 Identifizierung von Kandidatengenenen der Tumorgenese durch in-silico-Analyse**

Ein Ziel der modernen Molekularbiologie ist die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die an der malignen Transformation von Zellen beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit werden die Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC mittels elektronischem Northern als in normalen Ovarien und Ovarialkarzinomen differenziell exprimiert identifiziert. Aber auch die Gruppe der Ovarialkarzinome ist histopathologisch und genetisch sehr heterogen. Sie nicht nur morphologisch zu beurteilen, sondern anhand eines spezifischen Genexpressionsprofils zu klassifizieren, könnte in Zukunft die gezielte Zuordnung zu bestimmten Subgruppen, mit unterschiedlichen Ansprechraten und begleitenden Aussagen zum Krankheitsverlauf, ermöglichen. Eine aktuelle Studie an Zervixkarzinomen gibt anhand eines Genexpressionsprofils (11 Gene) jedes Tumors, darunter Thymosin  $\beta$ -10, mit hoher Sensitivität, Spezifität und prädiktivem Wert die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen an [Huang, 2011]. Die Daten zur zellulären Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression in Ovarialgeweben unterschiedlicher Dignität sind allerdings limitiert und teilweise widersprüchlich [Brown, 1999; Lee SH, 2001; Mok, 1996; Santelli, 1999]. Die Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC werden von vielen normalen humanen Geweben synthetisiert. Seit ihrer Entdeckung werden sie zunehmend in der normalen Physiologie als Wachstumsregulator diskutiert, aber auch in verschiedenen Tumoren wurden sie nachgewiesen. In der Mehrzahl von Tumoren wird eine erhöhte mRNA-Expression beobachtet [Hall, 1991 A; Ledda, 1997; Porte, 1998; Porter, 1995; Santelli, 1999; Weterman, 1993]. Einige Autoren diskutieren Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC auch als Prognosefaktor und als Tumorsuppressor [Ledda, 1997; Maurer, 1992; Porte, 1998; Skobe, 1998; Verghese-Nikolakaki, 1996; Weterman, 1993].

## 2.2 Thymosin $\beta$ -10

Thymosine sind eine Familie von Proteinen, die basierend auf ihrem isoelektrischen Punkt, in drei Klassen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) unterteilt werden. Die  $\beta$ -Klasse beinhaltet strukturell verwandte, hochkonservierte saure Polypeptide. Innerhalb einer Spezies weist Thymosin  $\beta$ -10 die gleiche Transkriptgröße auf [Santelli, 1999], zwischen den verschiedenen Spezies existieren hochkonservierte homologe Bereiche. In humanen Geweben wird Thymosin  $\beta$ -10 ubiquitär exprimiert, es ist im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert [Salhab, 2010; Yu, 1994].

### 2.2.1 Chromosomale Lokalisation, genetische Architektur und molekularer Aufbau

Das humane Thymosin  $\beta$ -10-Gen ist auf dem Chromosom 2p<sup>11.2</sup> lokalisiert [Sribenja, 2009]. Es besteht aus drei Exons (45 bp, 115 bp, 281 bp), zwei Introns (284 bp, 271 bp) und untranslatierter Region. Das gesamte Gen (DNA) wird mit einer Gesamtlänge von 1262 bp, das Transkript (Thymosin  $\beta$ -10-mRNA) mit 482 bp angegeben [NCBI, Nucleotide, TMSB 10, Homo sapiens]. Das Gen kodiert ein Peptid von 44 Aminosäuren [NCBI, Protein, TMSB 10, Homo sapiens] mit einer berechneten molekularen Masse von ca. 4,9 kDa.

### 2.2.2 Regulation, Funktion und Interaktion

Thymosin  $\beta$ -10 wird während der Neuroembryogenese vermutlich durch c-AMP abhängige und durch Retinoide induzierbare Mechanismen reguliert [Hall, 1992; Hall, 1996]. Retinoide führen *in vitro* zu einer Differenzierung von embryonalen Zelllinien in Neurone bzw. Gliazellen, einhergehend mit einem Anstieg von Thymosin  $\beta$ -10 [Carpintero, 1996; Hall, 1996]. Ein Anstieg der Thymosin  $\beta$ -10-Expression über Gonadotropine konnte im Tiermodell nachgewiesen werden [Hall, 1991]. In der Schilddrüse stimulieren Wachstumsfaktoren wie TSH vermutlich die Thymosin  $\beta$ -10-Expression [Viglietto, 1999]. Die Thymosin  $\beta$ -10-Expression geht mit dem Wachstum und der Differenzierung vieler Zelltypen einher [Carpintero, 1996; Hall, 1996]. Es bindet Aktinmonomere (G-Aktin) in einem 1:1-Komplex und induziert damit die Depolymerisation von intrazellulärem filamentösem Aktin, einhergehend mit der Abnahme fokaler Adhäsionen [Sribenja, 2009; Yu, 1993; Yu, 1994]. Möglicherweise blockiert es die Aktinpolymerisation sterisch, indem es eine Stelle besetzt, an der sonst die Monomere aneinander binden. Alternativ wird diskutiert, dass Thymosin  $\beta$ -10 den ADP/ATP-Austausch verhindert, indem es das ADP am Aktin festhält, so dass die Aktinpolymerisation unterdrückt



wird [Califano, 1998; Carpintero, 1996; Lodish, 1996]. Weiterhin erhöht Thymosin  $\beta$ -10 durch Blockade der Aktinpolymerisation die Anfälligkeit für Apoptose. Ein durch Thymosin  $\beta$ -10-Antisense-mRNA hergestellter Knock-out ähnlicher Zustand führt zu einem verstärkten F-Aktinzusammenbau und zur Hemmung der Apoptose [Hall, 1995]. Weiterhin ist bekannt, dass Thymosin  $\beta$ -10 über die Hemmung der VEGF-Expression auf Transkriptionsebene und über die Hemmung der VEGF-induzierten Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) die Angiogenese beeinflusst [Lee, 2005; Mu, 2006; Zhang, 2009].

### **2.2.3 Thymosin $\beta$ -10-Expression im Ovar**

Thymosin  $\beta$ -10-mRNA wird im Ovar konstitutiv vor allem in den Granulosazellen exprimiert, aber auch die Oozyten und die umgebenden Cumuluszellen exprimieren Thymosin  $\beta$ -10. Unter Gonadotropinstimulation kommt es zu einem Anstieg der Thymosin  $\beta$ -10-Expression, während ein luteinisierender Stimulus mit einer verminderten Expression assoziiert ist [Hall, 1991 B; Salhab, 2010]. Blutgefäße im Ovar zeigen hohe Thymosin  $\beta$ -10-Protein-Level [Santelli, 1999].

### **2.2.4 Thymosin $\beta$ -10-Expression in Karzinomen**

Thymosin  $\beta$ -10 wird in malignen Melanomen [Weterman, 1993], Karzinomen der Nieren [Hall, 1991 A], der Hoden, der Ovarien, der Brust, des Uterus, des Pankreas, des Gastrointestinaltraktes und in deren Zelllinien im Vergleich zu deren Normalgewebe verstärkt exprimiert. Eine Zunahme der Thymosin  $\beta$ -10-Expression in Karzinomen der Lunge korreliert mit einem fortgeschrittenen Stadium, einem geringen Differenzierungsgrad, dem Auftreten von Fern- und Lymphknotenmetastasen und einer kürzeren Überlebenszeit [Alldinger, 2005; Califano, 1998; Gu, 2009; Li, 2009; Liu, 2004; Maelan, 2006; Santelli, 1999; Takano, 2002; Verghese-Nikolakaki, 1996]. Dagegen weisen Lee et al. in Ovarialkarzinomen mittels Northern-Blot-Analysen eine in Ovarialkarzinomen verminderte Expression von Thymosin  $\beta$ -10 nach [Lee SH, 2001]. Die Studie zeigt weiterhin, dass ein Thymosin  $\beta$ -10-Vektor in Ovarialkarzinomzelllinien zu einer Depolymerisierung von F-Aktin und zu einer gesteigerten Apoptoserate führt.

## 2.3 SPARC

SPARC (secreted protein, acidic, rich in cystein) ist ein Glykoprotein, das vor allem in der extrazellulären Matrix, aber während der Zellteilung auch intranukleär und intrazytoplasmatisch vorkommt [Gooden, 1999]. Die unterschiedlichen Alias-Namen von SPARC reflektieren die Proteingröße (43 K), gewebliche Herkunft [BM (basement membrane protein) - 40], und die Affinität zur Knochenmatrix [Osteonectin (nectere, lat. = lieben)]. Im SPARC-Gen existieren zwischen den verschiedenen Spezies hochkonservierte Bereiche. Mensch und Maus zeigen auf DNA-Ebene 85 % Sequenzidentität und in der Aminosäuresequenz sogar 93 %.

### 2.3.1 Chromosomale Lokalisation, genetische Architektur und molekularer Aufbau

Das humane SPARC-Gen liegt auf Chromosom 5q<sup>31.3</sup>-q<sup>33</sup> [Warrington, 1994]. Es besteht aus zehn Exons (224 bp, 70 bp, 63 bp, 88 bp, 122 bp, 121 bp, 134 bp, 149 bp, 149 bp, 1463 bp bzw. 1170 bp) und neun Introns, die ungefähr 17,6 kb überspannen. Es existieren zwei Spleißvarianten mit einer Gesamtlänge von ca. 2,2 kb bzw. 3,0 kb, die sich durch die Länge des letzten Exons (1170 bp versus 1463 bp) und der untranslatierten Region unterscheiden, ohne einen Einfluss auf die Größe des Genprodukts (Protein) zu haben [Lane, 1994 A]. Die für das Protein kodierende Sequenz beginnt im Exon 1 und endet im Exon 8 und kodiert ein Protein von 303 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 32,517 kDa und einem pI von 4,7. Durch posttranslationale Modifikation entsteht ein glykosyliertes Protein von ca. 43 kDa. Das SPARC-Protein besteht aus drei strukturellen Domänen, basierend auf seiner Sekundärstruktur, einer N-terminalen Domäne, einer cysteinreichen, zu Follistatin homologen (FS-like) und damit hochkonservierte Region und einer EC-Domäne III [Busch, 2000].

### 2.3.2 Regulation, Funktion und Interaktion

SPARC wird durch eine Vielzahl von Molekülen reguliert, wie TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , VEGF, Progesteron und Glukokortikoide. Eine direkte Induktion der Transkription ist aber nur für Progesteron und Dexamethason nachgewiesen [Ng, 1989; Nomura, 1989; Wrana, 1991]. SPARC-Protein wird in vitro durch zahlreiche Proteasen degradiert [Lane, 1994 A]. SPARC ist ein Glykoprotein, das reversible Zell-Matrix-Interaktionen moduliert, jedoch kein dauerhafter struktureller Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) ist. Es ist an Prozessen in sich verändernden Geweben, wie Embryogenese, Wundheilung, Differenzierung, Angiogenese und Tumorgenese beteiligt [Iruela-Arispe, 1996; Maurer, 1995; Podhajcer, 2008]. SPARC interagiert

mit vielen Bestandteilen der EZM, wie Kollagen und Laminin, aber auch mit Wachstumsfaktoren, wie TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) oder PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und bindet auch Kupfer, Eisen, Thrombospondin und Albumin. SPARC beeinflusst die Expression von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs), die sowohl Basalmembran als auch weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren [Francki, 1999; Lane, 1992; Tremble, 1993]. SPARC führt über eine direkte Bindung der PDGF-Dimere AB und BB zu einer verminderten Verfügbarkeit und Assoziation mit ihrem Rezeptor [Bonner, 1994; Raines, 1992] an Endothelzellen und anderen Zellmembranen und hemmt darüber die Zellmigration und Proliferation. VEGF ähnelt PDGF in 20 % seiner Aminosäuresequenz, wird ebenfalls von SPARC gebunden, und kann sich damit nicht an seinen Rezeptor Flt-1 anlagern [Kupprion, 1999; Yan, 1999]. VEGF ist ein potenter Stimulator der Angiogenese. Weiterhin hemmt SPARC in vitro die VEGF-induzierte Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen und darüber die Endothelzellproliferation [Chouaib, 2010; Paley, 2000]. VEGF induziert dagegen die Expression von SPARC [Kato, 2001]. SPARC-Knockout-Mäuse, denen Tumorzellen injiziert wurden, zeigen eine verstärkte VEGF-MMP-Expression [Said, 2007]. SPARC bindet in vitro direkt an Endothelzellen und unterbricht fokale Adhäsionen zwischen der EZM und dem Aktinzytoskelett. Es scheint die Zellmorphologie über die Aktivierung von intrazellulären Proteasen mit konsekutiver Aktinreorganisation zu verändern. Dies erhöht die Permeabilität der Endothelzellbarriere bei gleichzeitigem Auftreten interzellulärer Lücken, die eine paravaskuläre Extravasation von Makromolekülen, wie Akute-Phase-Proteinen, Komplementfaktoren und Antikörpern ermöglichen [Goldblum, 1994; Hasselaar, 1992; Lane, 1994; Motamed, 1998; Sage, 1998]. Durch enzymatische Spaltung von SPARC entstehen Peptide, die eine KGHK (N-Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-OH)-Sequenz enthalten. Diese Sequenz ist im intakten, nativen Protein maskiert und wirkt sowohl in vitro als auch in vivo angiogenetisch [Hasselaar, 1992, Lane, 1994 A]. Interaktionen von SPARC und seinen Rezeptoren, posttranslationale Modifikation und Degradation durch Proteasen könnten zu den gewebs- und zellspezifischen unterschiedlichen Funktionen beitragen.

### **2.3.3 SPARC-Expression im Ovar**

SPARC wird vor allem in prämenopausalen Ovarien exprimiert. Präluteal wird SPARC in den Granulosa- weniger als in den Thekazellen des Follikels exprimiert. Nach einem luteinisierenden Stimulus steigt die Expression in den Granulosazellen an [Bagavandoss, 1998; Brown, 1999;

Smith, 1996]. Endothelzellen, die angiogenetisch aktiv sind, exprimieren SPARC. So kann es auch in den Kapillaren des entstehenden Gelbkörpers im Vergleich zum reifen Corpus Luteum vermehrt nachgewiesen werden [Bagavandoss, 1998, Goldblum, 1994]. SPARC-Protein ist auch im Zellkern der Eizelle lokalisiert, die es vermutlich aus der Umgebung aufnimmt [Bagavandoss, 1998]. Mok et al. zeigen eine starke SPARC-mRNA- und Proteinexpression im Oberflächenepithel und SPARC-Protein in der darunter liegenden Tunica albuginea [Mok, 1996]. Brown et al. weisen dagegen eine auf die Theka- und Granulosazellen beschränkte mRNA-Expression im Ovar nach, allerdings weist das Oberflächenepithel variabel SPARC-Protein auf. Brown et al. zeigen eine starke SPARC-mRNA-Expression in angiogenetisch aktiven Endothelzellen [Brown, 1999]. Paley et al. weisen eine SPARC-Protein-Expression in Theka- und Granulosazellen prämenopausaler Patientinnen nach, im Oberflächenepithel wird SPARC-Protein selten und teilweise im Stroma nachgewiesen [Paley, 2000].

### **2.3.4 SPARC-Expression in Karzinomen**

SPARC wird in zahlreichen malignen Neoplasien, wie malignem Melanom [Ledda, 1997] und Glioblastom [Porter, 1995] von den Tumorzellen überexprimiert und ist mit einem geringen Differenzierungsgrad und einem kürzeren Überleben assoziiert [Shanna, 2009]. In diesem Zusammenhang wird SPARC als Tumorpromoter diskutiert. Studien am Bronchial- und Pankreaskarzinom weisen dagegen eine starke SPARC-Expression im tumorassoziierten Stroma auf, welche mit einer schlechten Prognose korreliert, während die Tumorzellen keine SPARC-Expression zeigen [Koukurakis, 2003]. Bei den Ovarialkarzinomen sind die Ergebnisse bezüglich der Tumor-, Stroma- und Endothelzellexpression uneindeutig. Mok et al. berichten über eine starke SPARC-mRNA- und Proteinexpression im Oberflächenepithel von Ovarien gegenüber einer verminderten Expression in den Tumorzellen vom Ovarialkarzinom und diskutieren eine tumorsuppressorische Funktion von SPARC. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die Transfektion von SPARC-cDNA in eine ovariale Tumorzelllinie deren Proliferationsrate in vitro und in vivo reduziert [Mok, 1996]. Auch Yiu et al. weisen SPARC-Protein im Oberflächenepithel vom Ovar nach, während es in den Tumorzellen von Ovarialkarzinomen vermindert oder abwesend ist. Yiu et al. vermuten einen Oberflächenrezeptor für SPARC, da exogen zugeführtes SPARC sowohl auf Oberflächenepithelzellen als auch auf Tumorzellen antiproliferativ wirkt, aber nur bei Tumorzellen Apoptose induziert, während sich die Oberflächenepithelzellen von Ovarien über bisher unbekannte Mechanismen vor der apoptotischen Wirkung schützen [Yiu, 2001]. In einer aktuellen Studie konnte eine

Hypermethylierung des SPARC-Promotors in Ovarialkarzinomzelllinien nachgewiesen werden, was mit einer verminderten SPARC-mRNA-Expression korreliert [Socha, 2009].

SPARC vermindert in Tumorzellen die Oberflächenexpression von Integrinen, was die Fähigkeit der Tumorzellen zur Adhäsion an EZM oder Mesothel reduziert. Said et al. zeigen an SPARC-Knockout-Mäusen nach Injektion von Ovarialkarzinomzellen einen Anstieg von VEGF und MMPs im Aszites, eine vermehrte Tumorzellproliferation mit stärkerer Peritonealkarzinose, und eine kürzere Überlebenszeit gegenüber dem Wildtyp und vermuten eine Funktion als Tumorsuppressor [Said, 2005]. Brown et al. zeigen keine SPARC-mRNA-Expression im Oberflächenepithel und Stroma vom Ovar, allerdings weist das Oberflächenepithel eine variable SPARC-Protein-Expression auf. Im Stroma von Ovarialkarzinomen kommt es dagegen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu einem starken Anstieg der SPARC-Expression, während die Tumorzellen keine SPARC-mRNA, aber SPARC-Protein aufweisen [Brown, 1999]. Paley et al. weisen auf Proteinebene im Oberflächenepithel in einem von 14 Fällen und in den Tumorzellen in sieben von 48 Fällen eine SPARC-Expression nach. Das Stroma von Normalgewebe des Ovars exprimiert in 29 % der Fälle SPARC, demgegenüber weist das Stroma von Ovarialkarzinomen in 63 % eine SPARC-Expression auf, vor allem an der Tumor-Stroma-Grenze [Paley, 2000]. Des Weiteren wurde bei verschiedenen Karzinomen, so auch beim Ovarialkarzinom, eine gegenüber Normalgewebe erhöhte SPARC-Expression im Endothel nachgewiesen [Van Beijnum, 2009]. SPARC weist über die Hemmung von VEGF antiangiogenetische und nach Proteolyse auch angiogenetische Eigenschaften auf [Kupprion, 1999, Lane, 1994 A]. VEGF ist in Tumorzellen überexprimiert, ist direkt mit der Bildung von Aszites assoziiert und scheint mit einer schlechten Prognose zu korrelieren [Chen, 1999; Yoneda, 1998]. Eine aktuelle Studie deutet auf die Wichtigkeit der Zusammensetzung der EZM für das Ansprechen auf eine Chemotherapie hin. SPARC-Knockout-Mäuse, denen Cisplatin-refraktäre Ovarialkarzinomzellen injiziert wurden, zeigen unter einer Cisplatintherapie ein längeres Überleben als die Wildtyp-Mäuse, die nicht auf die Chemotherapie ansprechen. Anscheinend senkt SPARC über eine veränderte Zusammensetzung der EZM die Sensitivität für eine Chemotherapie [Phelps, 2009]. Bekannt ist, dass SPARC in Abhängigkeit von der Tumorentität über die Synthese von MMPs die Bildung eines permissiven Stromas fördert oder hemmt [Chlenski, 2010]. Harefuah et al. konnten zeigen, dass die Überexpression von MMP im Ovarialkarzinom mit erhöhter Invasivität, Metastasierung und einer schlechteren Prognose einhergeht [Harefuah, 2003]. Proteolyse der EZM, welche die Tumordinvasion erleichtert, und Angiogenese sind die limitierenden Schritte für Tumorzellwachstum und Metastasierung [Macchiarini, 1992; Maeda, 1995; Olivarez, 1994; Paley, 1997; Weidner 1993].

### 2.4 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit werden mittels elektronischem Northern, einer virtuellen Expressionsanalyse, die Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC als potenziell tumorassoziierte Gene identifiziert. Im Northern-Blot wird eine Übersicht zum Expressionsverhalten von Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC in verschiedenen Normalgeweben und in gematchten Normal- und Tumorproben gewonnen. Anschließend wird mittels RNA-in-situ-Hybridisierung das zelluläre Expressionsmuster (Epithel, Stroma, Endothel) in Normalgeweben des Ovars, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen detailliert beschrieben. Die weiterführende statistische Analyse der gewonnenen Daten untersucht die Möglichkeit einer Unterscheidung folgender Ovargewebe anhand des Expressionsmusters:

- Normalgewebe Ovar versus benigne Ovarialtumore versus Ovarialkarzinome
- primäre versus rezidierte Ovarialkarzinome

Die Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC-Expression wird mit folgenden klinisch-histopathologischen Parametern und Prognosefaktoren korreliert:

postoperativer Tumorrest, FIGO-Stadium, TNM-Stadium, Histologie, Differenzierungsgrad, Alter bei Erstdiagnose, Aszites, präoperativer CA125-Wert

In der anschließenden uni- und multivariaten Analyse wird der Einfluss der Genexpression und der klinisch-histopathologischen Faktoren und Prognosefaktoren auf das Überleben untersucht.

### **3 Patientinnen, Material und Methoden**

Die vorliegende Studie wurde in der Klinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Charité Campus Virchow Klinikum Berlin im Zeitraum von Mai 2001 bis Oktober 2003 durchgeführt. Die Nachbeobachtungszeit war bis Mai 2009. Am Paraffinmaterial wurde die Expression der Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC mittels RNA-in-situ-Hybridisierung nachgewiesen.

#### **3.1 Patientinnenkollektiv**

In die Studie wurden insgesamt 62 Patientinnen im Alter von 27 - 85 Jahren zum Zeitpunkt der Operation eingeschlossen. Es bestand keine Altersbeschränkung. Alle Patientinnen wurden vor der Gewebeentnahme durch ihren behandelnden Arzt umfassend informiert und erklärten ihr schriftliches Einverständnis. Das positive Votum der Ethikkommission der Charité zur Durchführung der Studie lag zu deren Beginn vor. Der überwiegende Teil der eingeschlossenen Patientinnen wurde im Zeitraum von 2001 - 2003 in der Abteilung der Gynäkologie des Universitätsklinikums Charité Berlin, Campus Virchow-Klinikum aufgrund ihrer Erkrankung operiert. Einige Gewebeproben stammen aus einer Kooperation mit dem Städtischen Klinikum Hoyerswerda und dem Klinikum Erlangen. Die Ovarproben wurden direkt nach chirurgischer Entfernung in flüssigem Stickstoff bei ca.  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefroren oder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Alle Gewebeproben und klinischen Daten wurden im Rahmen der „Tumor Bank Ovarian Cancer“ archiviert und aufgearbeitet ([www.toc-network.de](http://www.toc-network.de)). Zur Erhebung aller krankheitsrelevanter Daten, z. B. die Menge des intraoperativ vorliegenden Aszites, wurde nach Beendigung des Eingriffs der Operateur befragt [Sehouli, 2003] und die Krankenakte verwendet. Das histologische Grading und die Stadieneinteilung beruht auf den Kriterien der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). Alle Ovargewebe wurden postoperativ lichtmikroskopisch durch einen von unserer Studie unabhängigen Pathologen untersucht und histologisch klassifiziert. Anschließend erfolgte die Dokumentation der krankheitsrelevanten klinischen und histopathologischen Daten. In der Nachbeobachtungszeit erfolgte die Aktualisierung der Daten sowohl im Rahmen der Tumornachsorgesprechstunde als auch durch Kontaktaufnahme mit den Patientinnen oder deren weiterbehandelnden Ärzten. Es wurde Normalgewebe des Ovars von neun Frauen untersucht, bei denen aufgrund einer benignen Erkrankung eines Ovars oder aufgrund einer Erkrankung der Gebärmutter eine einfache Adnektomie oder eine abdominale Hysterektomie mit Adnexentfernung durchgeführt wurde. Die drei benignen Zystadenome stammen von Frauen, bei denen die Adnexe wegen eines benignen

Ovarialtumors laparoskopisch entfernt wurden. Die 34 Frauen mit primärem Ovarialkarzinom wurden im Zeitraum von 2001 bis 2003 behandelt. Im Rahmen der primären zytoreduktiven Chirurgie, welche über einen Abdominallängsschnitt erfolgte, wurden die Hysterektomie, Adnexentfernung beidseits mit hoher Resektion der Ovarialgefäßbündel, infragastrische Omentektomie, Appendektomie, paraaortale und pelvine Lymphonodektomie und ggf. Resektion von Blasen- und Douglasperitoneum durchgeführt. Postoperativ erhielten alle Patientinnen eine leitliniengerechte Chemotherapie mit 6 Zyklen Paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> und Carboplatin nach AUC 5 [Schmalfeldt, 2007]. Es wurden 16 Patientinnen mit einem Spätrezidiv des Ovarialkarzinoms (krankheitsfreies Intervall  $\geq$  6 Monate) in die Studie eingeschlossen. Alle Frauen haben eine platinhaltige Chemotherapie erhalten, mehrere befinden sich in der Zweit- oder Drittlinie Chemotherapie. Die Operation erfolgte sowohl bei einem platinsensitiven Ovarialkarzinomrezidiv, als auch bei ausgeprägter, objektivierbarer klinischer Symptomatik (chronischer Subileus, Ileus, neurologische Ausfälle). Die 16 Rezidivgewebe stammen vom Mesenterium, Omentum minus, Peritoneum, Dünn- und Dickdarmserosa und Vaginalstumpf. Die Patientinnen mit Ovarialkarzinom unterzogen sich den üblichen Nachsorgeuntersuchungen, bestehend aus Anamnese, klinischen und laborchemischen Untersuchungen (CA 125), Sonografie und Computertomografie.

### **3.1.1 Probenmaterial für die RNA-in-situ-Hybridisierung**

#### **Paraffinmaterial**

Die einzubettenden Gewebestücke wurden direkt nach der operativen Entnahme in Formalin fixiert und noch am selben Tag unter Verwendung eines Heizblockes in Metallformen in flüssiges Paraffin eingebettet. Nach entsprechender Ausrichtung der Gewebe wurden die Metallformen zur Erstarrung des Paraffins auf Eis gestellt. Dabei musste mit großer Sorgfalt flüssiges Paraffin nachgegossen werden, um zu verhindern, dass um das Gewebe herum zwei Phasen entstehen. Bis zur weiteren Verwendung konnten die erstarrten Paraffinblöcke bei Raumtemperatur gelagert werden. Das Schneiden der Gewebe-Paraffinblöcke erfolgte mit einem Schlittenmikrotom der Firma MICROM. Es wurden je nach Erfordernis Schnitte im Bereich von 4-5  $\mu$ m erstellt und auf einem Objektträger (Schütt) fixiert. Von jeder Gewebeprobe wurden HE-gefärbte Schnitte angefertigt.



## **HE-Färbung**

1. Schnitte entparaffinieren und rehydratisieren, dafür 2 x 15 min. in Xylol und anschließend absteigende Alkoholreihe (Ethanol): je 2 min mit: 100 %, 96 %, 80 %, 70 % und Aqua destillatum
2. Schnitte 3 min. färben in Hämalaun-Lösung
3. Schnitte 2 sec. spülen in HCl-Lösung 0,1 %
4. 3-5 min. differenzieren in fließendem Leitungswasser
5. 3 min. färben in Eosin-Lösung 0,5 %,
6. 30 sec. spülen in Leitungswasser
7. aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min. Ethanol 70 %, 80 %, 96 %, 100 %) und 3-5 min Xylol
8. eindeckeln

### **3.1.2 Probenmaterial des Multi Tissue Northern-Blots**

Auf dem MTN-Blot werden PolyA+ Ribonukleinsäuren aus 16 gepoolten Normalgeweben (Ovar, Herz, ZNS, Plazenta, Skelettmuskel, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Thymus, Hoden, Dünndarm, Dickdarm, Leukozyten, Leber, Lunge, Niere) dargestellt. Detaillierte Erläuterungen siehe Clontech, Catalog # 7760-1.

### **3.1.3 Probenmaterial des Dot-Blots**

Auf dem Dot-Blot ist cDNA, isoliert aus elf unterschiedlichen humanen soliden Tumoren (Niere, Brust, Prostata, Uterus, Ovar, Zervix, Kolon, Lunge, Magen, Rektum, Dünndarm) und deren entsprechenden Normalgeweben und neun Krebszelllinien (Burkitt-Lymphom, HeLa, CML, promyeloische Leukämie, Melanom, Lungenkarzinom, lymphoblastische Leukämie, Kolorektales Adenokarzinom, Burkitt Lymphom), aufgetragen. Der Dot-Blot bietet zu jedem Organ Proben verschiedener Patienten.

## **1.4 Probenmaterial des Cancer Profiling Arrays**

Der Cancer Profiling Array (CPA) schließt normierte SMART™-amplifizierte cDNA von 241 Tumoren und deren korrespondierenden normalen Geweben, 9 Krebs-Zelllinien von Patienten und Positiv- bzw. Negativkontrollen ein (Erläuterungen s. Lot # 1030366 Clontech Catalog # 7841-1). Es sind 14 Ovarproben (A-P) aufgetragen mit in der Tab. 2 dazugehörigen den klinische Daten.

Tab. 2: Klinisch-histopathologische Daten zu den Ovarproben des Cancer Profiling Arrays (CPA).

Koordinaten	Normal- gewebe	Tumorprobe	FIGO- Stadium	Alter	Tumor- größe
15A/16A	Normalovar	seröses Karzinom	IIIb	58	
15 B/16B	Normalovar	muzinöser Borderline Tumor	Ia	38	
15C/16C	Normalovar	seröses Zystadenokarzinom	unbekannt	69	
15D/16D	Normalovar	Karzinom	I	58	
15E/16E	Normalovar	Klarzellkarzinom	I	72	
15F/16F	Normalovar	Adenosquamöses Karzinom	IIa	57	
15G/16G	Normalovar	serös-papilläres Zystadenokarzinom	IIIa	56	1,6x1,5x 5cm
15H/16H	Normalovar	Zystadenokarzinom	IIIb	50	9x6x3cm
15I/16I/16J	Normalovar	Metastase/seröses Zystadenokarzinom	IIIa	50	3,5cm
15K/16K/16L	Normalovar	Metastase/Adenokarzinom	III	53	2cm
15M/16M	Normalovar	serös-papilläres Karzinom, Leber-,Omentum- und Lymphknotenmetastasen	unbekannt	72	
15N/16N	Normalovar	seröses Zystadenokarzinom, Fernmetastasen	unbekannt	61	
15O/16O	Normalovar	serös-papilläres Zystadenokarzinom	unbekannt	64	
15P/16P	Normalovar	Adenokarzinom; Fernmetastasen	unbekannt	41	

### 3.2 Material

#### 3.2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien in Analyse-Qualität und Enzyme nachfolgender Firmen verwendet: Amersham (Braunschweig), Boehringer Mannheim (Mannheim), Invitrogen (Leek, NL), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Göttingen), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Promega (Mannheim), Quiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemiker (Heidelberg), Sigma Chemie (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg)

#### 3.2.2 Radiochemikalien

Die Radiochemikalie  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (6000 Ci/mmol; 10mCi/ml; wässrige Lösung) wurde von Amersham (Braunschweig) bezogen.

#### 3.2.3 Bakterienstämme und Herkunft der cDNA Klone

Kandidatengen-spezifische cDNA-Klone konnten über den UniGene-Eintrag (NCBI) identifiziert werden. Dabei wurden öffentliche Klone ausgewählt und bei Incyte Genomics (St.Louis, MO, USA) bestellt. Die Klone wurden als Agarsteps geliefert und konnten sofort ausgestrichen werden.

Tab. 3: cDNA-Klone von Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC. Abkürzung RE: Restriktionsenzym, P: RNA-Polymerase

Name	Vektor	Antisense		Sense		Klon	Insert
		RE+Puffer	P	RE+Puffer	P		
Thymosin $\beta$ -10	pT7T3D-Pac	EcoRI+H	T3	Hind III+B	T7	AA527683	448 bp
SPARC	Bluescript SK- (pBSK-)	EcoRI+H	T7	Xho I + H	T3	AA991865	2028 bp

### 3.2.4 Sonden und Primer für die Sequenzierung

Sämtliche Primer wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei MWG-Biotech AG, Ebersberg, bestellt. Es wurden folgende Sequenzierprimer für die entsprechenden Vektoren verwendet:

#### Thymosin $\beta$ -10

Vektor: pT7T3D

Vorwärtsprimer: M13

5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'

Rückwärtsprimer: T7

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

#### SPARC

Vektor: Bluescript pBSK-

Vorwärtsprimer: T3

5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'

Rückwärtsprimer: M13

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

### 3.2.5 Kits

#### ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

(PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

- A-Dye markiert mit Dichlor[R6G], C-Dye markiert mit Dichlor[ROX], G-Dye markiert mit Dichlor[R110], T-Dye markiert mit Dichlor[TAMRA]; keine Konzentrationsangaben
- dNTPs (dATP, dCTP, dITP, dUTP); keine Konzentrationsangaben
- AmpliTaq DNA-Polymerase, FS, mit thermisch stabilem Pyrophosphat; keine Konzentrationsangaben
- MgCl<sub>2</sub>; keine Konzentrationsangabe
- Tris-HCl Puffer, pH 9,0; keine Konzentrationsangaben
- pGEM®-3Zf(+) doppelsträngige Kontroll-DNA, 0,2 µg/µl
- M13 Kontroll-Primer (vorwärts), 0,8 pmol/µl

### **Megaprime™ DNA Labelling Systems**

(Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig)

- Primer-Lösung: Zufalls Nonamer Primer in wässriger Lösung; keine Konzentrationsangaben
- Markierungspuffer: dATP, dGTP und dTTP in Tris-HCl pH 7,5, 2-Mercaptoethanol, MgCl<sub>2</sub>; keine weiteren Angaben
- Nukleotid-Lösungen: dATP, dCTP, dGTP und dTTP in Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA
- Reaktionspuffer: 10x konzentrierter Puffer, Tris-HCl pH 7,5, 2-Mercaptoethanol, MgCl<sub>2</sub>
- Enzym-Lösung: 1 U/μl DNA Polymerase I Klenow Fragment (kloniert) in 100 mM Kaliumphosphat (pH 6,5), 10 mM 2-Mercaptoethanol und 50 % (v/v) Glycerol

### **Nucleobond AX 500 (Macherey-Nagel, Düren)**

- S1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 μg RNase A/mL, pH 8,0
- S2: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS
- S3: 2,80 M Kac, pH 5,1
- N2: 100 mM Tris, 15 % (v/v) Ethanol, 0,9 M KCl, mit Phosphorsäure auf pH 6,3 eingestellt
- N3: 100 mM Tris, 15 % (v/v) Ethanol, 1,15M KCl, mit Phosphorsäure auf pH 6,3 eingestellt
- N5: 100 mM Tris, 15 % (v/v) Ethanol, 1 M KCl, mit Phosphorsäure auf pH 8,5 eingestellt

### **3.2.6 Restriktionsenzyme**

Sämtliche Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von der Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim bezogen.

10 x SuRE Cut Puffer B: Endkonzentrationen (1:10 verdünnt):

10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0

10x SuRE Cut Puffer H: Endkonzentrationen (1:10 verdünnt):

50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM Dithioerythriol (DTE), pH 7,5

Restriktionsendonukleasen Eco RI (10 U/μl), Hind III (10 U/μl), Xho I (10 U/μl)

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Elektronischer Northern zur Identifizierung von Kandidatengen durch in silico-Analyse

Die Selektion tumorassoziierter Kandidatengene aufgrund differenzieller Expression in Normal- und korrespondierendem Tumorgewebe fand zunächst ohne aufwendige labortechnische Methoden statt. Der elektronische Northern, eine virtuelle Expressionsanalysen-Methode, ermöglicht die Identifizierung potenziell tumorassoziierter Gene, die als Grundlage für weiterführende Experimente dient. Zunächst wurden aus einer Vielzahl öffentlicher cDNA-Datenbanken wie CGAP (Cancer Genome Anatomy Project), NCBI (National Center for Biotechnology Information) und kommerzieller genomischer Sequenzdatenbanken der Firma Incyte Pharmaceuticals ([www.incyte.com](http://www.incyte.com)) alle ESTs (expressed sequence tag) ausgewählt, die in dem zu untersuchenden Gen vorkommen. ESTs sind kurze, sequenzierte und dadurch bekannte cDNA-Sequenzen von exprimierten Genen. Sie entstehen durch Isolierung der mRNA aus dem entsprechenden Gewebe mit anschließender Synthese der komplementären DNA (= cDNA). Die Bestimmung der Sequenz erfolgt nach der Klonierung mittels Sequenzierung. ESTs spiegeln in ihrer Gesamtzahl und -zusammensetzung nur annähernd die realen Transkriptionsverhältnisse eines Zelltyps wieder, zumal je nach Gewebe vermutlich zwischen 10.000 und 30.000 verschiedene Gene mit einer durchschnittlichen Gesamtzahl von 300.000 Transkripten pro Zelle vorliegen, die analysierten EST-Bibliotheken enthielten aber nur zwischen 1000 und 10.000 ESTs. Mit Hilfe der Software AUTEX ("automatic extension") wurden alle verfügbaren, zum jeweiligen Gen sequenzidentischen ESTs ausgewählt und mittels des Programms GAP [Bonfield, 1995] assembliert. Werden die einzelnen ESTs entsprechend ihrem Ursprungsgewebe und nach Normal- und Tumorgewebe unterteilt, kann durch eine Sequenzabgleich mit dem Programm BLAST [Altschul, 1990] für jedes Gen die Zahl der homologen EST-Sequenzen der einzelnen Bibliotheken bestimmt werden [Schmitt, 1999]. Über den Vergleich der EST-Sequenzen des Gens zwischen der Tumorbibliothek und der Normalbibliothek, ist es möglich ein Gen zu identifizieren, das in Ovarialtumoren anders als im korrespondierenden Normalovar exprimiert ist. Dabei gibt das Verhältnis Tumor/Normal (T/N) die Intensität der differentiellen Expression und eine Über- ( $T/N > 1$ ) bzw. Unterexpression ( $T/N < 1$ ) im korrespondierenden Tumor an [Schmitt, 1999]. Die Validierung der im elektronischen Northern differenziell exprimierten Kandidatengene erfolgt über die Northern-Blot Verfahren (s. Kap. 3.3.5).

### **3.3.2 DNA-Minipräparation mit dem BioRobot 960**

Die DNA-MiniPräp dient der Aufreinigung der Plasmid-DNA für die Gewinnung der spezifischen cDNA von Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC.

Die verwendeten cDNA-Klone liegen kloniert als Passagierfragment („Insert“) in sogenannten Plasmid-Vektoren vor, die in *E. coli* Bakterien vermehrt werden können. Zur Vervielfältigung der cDNAs wurden die Bakterienklone zunächst auf LB-Agar mit Antibiotika, abhängig von der Resistenz [100  $\mu$ g/ml Ampicillin oder Kanamycin (Fluka Biochemika, Neu-Ulm)], ausgestrichen und etwa 12 h bei 37 °C kultiviert. Von jedem Klon wurden auf den Agarplatten drei Einzelkolonien gepickt und in einer 2 ml LB-Medium-Flüssigkultur 10 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln kultiviert. Aus dieser Flüssigkultur wurde mit 0,5 ml Bakterien und 0,5 ml 30 % Glycerin eine Dauerkultur angelegt (Lagerung bei – 80 °C), aus den restlichen 1,5 ml Bakterienkultur wurde die Plasmid-DNA nach dem Protokoll QIAprep Turbo High-Speed auf dem BioRobot 9600 präpariert und aufgereinigt. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde über ein 1 % iges Agarosegel abgeschätzt.

#### **3.3.2.1 Agarosegel-Elektrophorese**

Die für die Durchführung der Experimente notwendigen DNA-Präparationen im kleinen (MiniPräp) und im großen (MaxiPräp) Maßstab wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese hinsichtlich Degradationserscheinungen der DNA, aufgrund möglicher Kontamination mit Nukleasen, überprüft. Die Agarosegel-Elektrophorese erfolgte gemäß üblichem Standardprotokoll. Es wurden 0,8 - 2 % (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer gelöst. Die angelegten Spannungen variierten zwischen 100-300 V und die Laufzeit zwischen 30 min und 3 h, je nach Aufgabenstellung. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch Interkalation mit Ethidiumbromid (Konz. 0,5  $\mu$ g/ml). In allen Proben waren nach optischer Schätzung ausreichende DNA-Mengen für die Sequenzierung bzw. Linearisierung vorhanden.

#### **3.3.2.2 Spektroskopische Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit**

Die spektroskopische Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte an dem UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 2000 bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 320 nm. In allen Proben waren nach spektroskopischer Bestimmung ausreichende DNA-Mengen für die Sequenzierung bzw. Linearisierung vorhanden.

### 3.3.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestätigung der Sequenz des bestellten Klones. Die Sequenzierung nach Sanger et al. [Sanger, 1992] wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Dabei wird die isolierte Plasmid-DNA zuerst in eine einzelsträngige Form, die Matrize, überführt. Diese Matrizen-DNA wird mit einem Oligonukleotid, dem Sequenzierprimer, hybridisiert, der nur zu einer einzigen Stelle der Matrize komplementär sein sollte. Ausgehend von diesem Primer laufen unter der Zugabe von DNA-Polymerase, allen vier 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und zusätzlich fluoreszierenden 2',3'- Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) zahlreiche Primerverlängerungen ab. Die Polymerase akzeptiert sowohl die dNTPs als auch die ddNTPs als Substrat zur Synthese des zur Matrize komplementären Stranges. Wird ein ddNTP eingebaut, kommt es allerdings zum Abstoppen der Reaktion (Kettenabbruch), denn aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe kann kein weiteres Nukleotid angefügt werden. Somit erhält man nach mehreren Zyklen eine Mischung an DNA-Fragmenten unterschiedlichster Kettenlängen. Das 5'-Ende wird vom Sequenzierprimer gebildet, während das 3'-Ende aus dem fluoreszierenden Didesoxynukleotid besteht. Die DNA-Fragmente werden nun in einem Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt. Da jede Farbstoff-markierte ddNTP-Base nach Anregung durch einen Laserstrahl eine für sie spezifische Wellenlänge emittiert, die durch eine CCD-Kamera detektiert wird, kann dem Bandenmuster die fortlaufende Nukleotidsequenz zugeordnet werden.

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

400-500 ng	DNA
1 µl	Primer (5pmol/µl)
3 µl	Big Dye Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt)
ad 15 µl	H <sub>2</sub> O

Der Big Dye Mix enthält Puffer, Taq DNA-Polymerase, dNTP's und Fluoreszenz- markierte ddNTP's. In Abhängigkeit von der zu sequenzierenden DNA wurden Primer eingesetzt, die bei Plasmiden vektorspezifisch waren.

PCR-Programm:	4 min	95 °C	} 30 Zyklen
	30 s	95 °C	
	10 s	50 °C	
	4 min	60 °C	



Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Produkte von überschüssigen nicht eingebauten Nukleotiden durch eine Sephadex-Reinigung getrennt. Das Sephadex G50 (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde hierfür zuvor für 2 h in MultiScreen-PCR Platten (Millipore GmbH, Eschborn) mit 300 µl Wasser aufgequollen und dann für 5 min bei 910 g zentrifugiert. Auf das Sephadex konnte dann die PCR-Reaktion aufgetragen und in 5 min bei 910 g zentrifugiert werden. Das gereinigte PCR-Produkt wurde eingetrocknet und anschließend in 3 µl Sequenzier-Auftragepuffer durch Schütteln resuspendiert. Die Proben wurden dann für 10 min auf Eis gestellt und 1,5 µl auf das Gel aufgetragen. Als Gel wurde eine 5,25 % Polyacrylamid-Gellösung (PAGE plus, Amresco, Solon, USA) verwendet, bestehend aus 180g Urea, 66ml PAGE Plus Concentrate, 50ml 10x TBE, aufgefüllt auf 500ml mit H<sub>2</sub>O, filtriert und entgast. Zur radikalischen Polymerisation wurden zu der Gellösung 0,5 % (w/v) Ammonium-Persulfat (APS) und 0,05 % (v/v) N',N',N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED) gegeben. Die Lösung wurde blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Nach Polymerisation wurden die Glasplatten in den ABI Prism 377 DNA-Sequenzer der Firma Perkin-Elmer (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingespannt, die Pufferkammern mit TBE-Puffer gefüllt und die Proben aufgetragen. Nach automatischer Sequenzierung der DNA erfolgte die Auswertung der Rohdaten mit Hilfe der dazugehörenden Macintosh-Software. Anschließend wurden die Daten auf einen UNIX-Rechner transferiert, wo sie mittels verschiedener Programme (reap, scope, blast) nach Qualitätsparametern sortiert und in eine GAP4-Datenbank (autogap) assembliert werden. In dieser Datenbank erfolgte der Vergleich der sequenzierten Plasmide mit den Datenbank-Sequenzen mittels des GAP4-Programms [Bonfield, 1995] und somit die Bestätigung der DNA-Sequenzen der Klone AA527683 für Thymosin β-10 und AA991865 für SPARC.

### **3.3.4 DNA-Maxipräparation**

Von den durch Sequenzierung bestätigten Klonen wurde eine Maxipräparation angesetzt, um ausreichend DNA für die weiteren Expressionsexperimente zu gewinnen. Die Bakterien des bestätigten Glycerinstocks wurden auf ein mit Ampicillin (100 µg/ml) versetztes großes Volumen LB-Medium angeimpft und unter ständigem Rotieren etwa 14 h bei 37 °C kultiviert. Nach ca. 12 h Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Kultur bei 4 °C und 3000-5000 g 15 min zentrifugiert, um das LB-Medium von den Zellbestandteilen zu trennen. Das Pellet wurde nun nach dem Standardprotokoll des Nucleobond AX500-Kits (Macherey-Nagel, Düren) aus dem Zelldetritus isoliert und aufgereinigt. Die durchgeführte Methode der Präparation von Plasmid-DNA beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979).

Dabei wird chromosomale Bakterien-DNA durch alkalische Denaturierung und Fällung von der Plasmid-DNA getrennt. Zunächst wurde das Pellet sorgfältig in 12 ml Puffer S1 resuspendiert und anschließend 12 ml Puffer S2 zugegeben. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Schwenken gemischt und bei RT für 5 min inkubiert. Es wurden 12 ml Puffer S3 untergemischt und es erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde für 40 min bei 4 °C und 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Faltenfilter auf eine mit 5ml Puffer N2 equilibrierte Säule gegeben. Die durch Adsorption an der Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde zweimal mit je 12 ml Puffer N3 gewaschen und durch die Zugabe von 12 ml Puffer N5 eluiert. Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und 30-60 min Inkubation bei RT, wurde die Plasmid-DNA gefällt und im anschließenden Zentrifugationsschritt (30 min, 15.000 g, 4 °C) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde schließlich mit 70 % igem Ethanol (4 °C) gewaschen, nochmalig zentrifugiert (10 min, 15.000 g, 4 °C) und bei RT getrocknet. Die pelletierte DNA wurde in 500 µl EB-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde über Gelelektrophorese neben einem DNA-Standard oder mit dem PicoGreen-Kit bestimmt.

### **3.3.5 Northern Hybridisierungen**

Die Auftrennung von aus eukaryotischen Zellen gewonnener, gereinigter Gesamt-RNA in Agarosegelen, der anschließende Transfer auf eine Zellulose- oder Nylonmembran und die Detektion mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde wird, in Analogie zu den Arbeiten von Edwin Southern mit dem Transfer genomischer DNA [Southern, 1975], Northern Hybridisierung genannt. In unserer Studie erfolgten Northern Hybridisierungen zur Validierung der Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression in verschiedenen Normal- und korrespondierende Tumorgeweben. Zumal in jeder Spur gleiche RNA-Mengen aufgetragen sind, normiert auf die Expression von  $\beta$ -Actin, kann von der Signalstärke auf die Expressionshöhe des untersuchten Gens in dem jeweiligen Gewebe bzw. Zell-Linien geschlossen werden.  $\beta$ -Actin wird, wie andere "House Keeping Gene", konstitutiv ubiquitär gleichmäßig exprimiert, unterliegt normalerweise keinen Schwankungen zwischen verschiedenen Geweben und wird daher generell als Standard verwendet. Über die Expression der  $\beta$ -Actin-mRNA lassen sich Unterschiede in der Auftragsmenge nachweisen. Neben der Stärke der gewebespezifischen Expression eines Gens ist dieses Verfahren durch die Gelauf trennung auch in der Lage die Größe des Transkripts und der möglichen Spleißvarianten zu zeigen. Bis zur Verwendung der Northern-Blots wurden diese, einzeln in Plastikfolie eingeschweißt, unter Lichtausschluss bei - 20 °C gelagert.

### 3.3.5.1 Sondenherstellung für die Hybridisierungsverfahren

#### **Restriktionsverdau**

Für die Herstellung einer DNA-Sonde für den CPA, MTN- und Dot-Blot wurde die durch Sequenzierung bestätigte Maxipräp-DNA mittels vektorspezifischen Restriktionsenzymen in Plasmid- und Insert-DNA gespalten und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es musste zunächst die Enzymkombination ermittelt werden, die nur eindeutige und einzelne Banden liefert, d.h. nur das Insert ausschneidet und nicht auch innerhalb dessen die DNA spaltet. Für den Klon AA527683 (Thymosin  $\beta$ -10) wurden die Restriktionsenzyme EcoRI/Hind III und der Puffer B und für AA991865 (SPARC) die Kombination Eco RI/Xho I und der Puffer H, bei dem die Enzyme die höchste Effizienz besitzen, ausgewählt. Es wurden etwa 1  $\mu$ g Plasmid-DNA in einem Volumen von 25  $\mu$ l mit jeweils 1  $\mu$ l des entsprechenden Restriktionsenzym für 2 - 3 h bei 37 °C verdaut. Nach der Inkubation wurden die DNA-Fragmente in einem 1 % igem Agarosegel aufgetrennt und die Insert- und Plasmid-Bande unter UV-Licht nachgewiesen.

#### **Extraktion der DNA aus Agarosegelmatrix mit dem Kit QiaEx II**

Unter UV-Licht wurde die Insert-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des QIAEX II Gel Extraction Kits (QIAGEN, Düsseldorf) nach den Arbeitsanweisungen des Herstellers aufgereinigt. Dabei wurde zu den ausgeschnittenen und gewogenen Fragmenten das dreifache Volumen Puffer QX1 gegeben und 15  $\mu$ l QIAEX II Suspension hinzu pipettiert. Die Suspension wurde 10 min bei 50 °C inkubiert und 2 min. durchmischt. Dadurch löste sich die Agarose und die DNA adsorbierte an die QIAEX II-Silikagel-Partikel. Die QIAEX II-Partikel wurden durch die anschließende Zentrifugation (RT, 30 s, 13.000 rpm) pellettiert. Durch Waschen mit je 500  $\mu$ l QX1 bzw. Puffer PE wurde die DNA von restlichen Agarose- bzw. Salzkontaminationen befreit. Um die DNA aus den QIAEX II-Partikeln zu eluieren wurde das Pellet in 30  $\mu$ l Wasser<sub>demin.</sub> gelöst. Die maximale Elution geschieht bei einem pH zwischen 7,0 und 8,5. Durch wiederholte kurze Zentrifugation wurden die QIAEX II-Partikel pellettiert und die Konzentration des im Überstand befindlichen Inserts durch PicoGreen Messung bestimmt.

#### **Radioaktive Markierung und Aufreinigung der Sonden**

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem Kit Megaprime<sup>TM</sup> DNA Labeling Systems (Amersham Biosciences, Freiburg) nach der Anleitung des Herstellers. Ein Aliquot der Sonde mit 25 ng DNA wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 28  $\mu$ l aufgefüllt. Mit 5  $\mu$ l Zufalls-

Nonamer Primermix versehen wurde der Ansatz 5 min bei 95-100 °C denaturiert, so dass die Sonde in Einzelsträngen vorlag und beim sich langsamen Abkühlen auf RT die Primer anlagern können. Anschließend wurden 10 µl Markierungspuffer hinzugefügt, der die unmarkierten Nukleotide enthielt, die im nun folgenden Schritt durch Zugabe von 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (10 mCi/ml, Amersham Biosciences, Freiburg) und 2 µl Klenow-Enzym (1 U/µl) radioaktiv markiert wurden. Der gesamte Ansatz von 50 µl wurde leicht gemischt, abzentrifugiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die markierte Sonde wurde anschließend über Sephadex G50 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgereinigt, um ungebundene Nukleotide zu entfernen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 3000 rpm wurde die Säule in ein 1,5 ml Safe-Lock Eppi gestellt und die 50 µl der Markierungsreaktion auf die Säule pipettiert und erneut für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert, um die aufgereinigte Sonde zu erhalten. Dem Eluat wurde 1 µl entnommen, um die Radioaktivität zur Bestätigung der erfolgreichen Markierung mit dem Hand-Geigerzähler gemessen.

### **3.3.5.2 Herstellung von Kontroll-Dot-Blot-Membranen**

Zur Abschätzung der Effizienz der radioaktiven Markierung wurden unterschiedliche Konzentrationen der unmarkierten Sonden-DNA auf Membranen (Blottingpapier, Amersham Biosciences, Freiburg) punktförmig aufgetragen.

Es werden jeweils 1 ng, 10 pg, 1 pg, 100 fg und 10 fg der entsprechenden cDNA-Sonde in jeweils 100 µl 15x SSC gelöst, für 3 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die unterschiedlichen Sondenverdünnungen wurden mit Hilfe einer Standard-Vakuumparatur auf eine ungeladene Hybond N Nylonmembran transferiert. Nachdem die Membran mittels 2x SSC gewaschen und anschließend getrocknet wurde, wird nun die DNA durch UV-Licht (0,15 J/cm<sup>2</sup>) mit der Membran vernetzt (cross-linking).

### **3.3.5.3 Hybridisierung des Multi-Tissue-Northern (MTN) -Blots**

Zur Beurteilung der Hybridisierung und Einschätzung der Signalstärke wurde bei jeder Hybridisierung des MTN-Blots (MTN®-Blot, Catalog # 7760-1 und Catalog # 7759-1, CLONTECH GmbH, Heidelberg) eine Kontroll-Dot-Blot-Membran, hergestellt mit der jeweiligen cDNA-Sonde, mitgeführt. Die Membran des MTN- und des Kontroll-Dot-Blots wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 30 min bei 68° C im Hybridisierungsofen mit 15 ml der vorgewärmten Hybridisierungslsg. Expresshyb vorhybridisiert. Die Hybridisierungslsg. (Ambion, Huntington Großbritannien) wurde anschließend gewechselt und

die radioaktiv markierte Sonde bei 95 °C nochmals in die einzelsträngige Form überführt, und vorsichtig in die Mitte der Hybridisierungsröhre pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte 1 h bei 68 °C. Nach Entfernen der Hybridisierungslsg. wurde der Filter einmal mit einer 2x SSC- und SDS-Lsg. (0,05 %) gespült, und mit der gleichen zweimalig 15 min bei 37 °C und einmalig mit einer 0,1x SSC- und SDS-Lsg. (0,1 %) bei 50 °C gewaschen. Nach Beenden des letzten Waschschrtes wurde der Filter, in Klarsichtfolie eingeschweißt, einem Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt, und der Film in einer lichtundurchlässigen Kassette bei -70 °C zwischen 1 und 3 Tagen exponiert. Zur Bestätigung der gleichen Konzentration der aufgetragenen Patienten-RNA wurde jeder MTN-Blot mit der Sonde des Housekeeping Gens  $\beta$ -Actin hybridisiert, bevor der Blot mit der spezifischen Sonde reagierte.

#### **3.3.5.4 Hybridisierung des Dot-Blots**

Die Vorhybridisierung des Dot-Blots (Catalog # 7840-1, CLONTECH Laboratories, USA) und des Kontroll-Blots erfolgte mit 15 ml der Hybridisierungslsg. Expresshyb und 1,5 mg denaturierter Heringsperm-DNA 30 min bei 65 °C. Die radioaktiv-markierte Sonde wurde mit 30  $\mu$ l C<sub>0</sub>t-1 DNA (Konz. 1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 50  $\mu$ l 20 x SSC, 16  $\mu$ l denaturierte Heringsperm-DNA (Konz. 9,4 mg/ml) und 54  $\mu$ l Wasser auf 200  $\mu$ l Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 95 - 100 °C 5 min denaturiert und dann bei 68 °C 30 min inkubiert. Die Hybridisierungslsg. wurde gewechselt und die Sonde dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ü. N. bei 65 °C im Hybridisierungsofen. Nach Entfernen der Hybridisierungslsg. wurde der Filter einmal mit 2x SSC- und 1,0 % (w/v) SDS-Lösung gespült und mit demselben Lösungsansatz noch zweimal 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Filter einmal mit 0,1 x SSC- und 0,5 % (w/v) SDS-Lsg. bei 50 °C inkubiert. Nach Beenden des letzten Waschschrtes wurde der Filter, in Folie eingeschweißt, einem Röntgenfilm aufgelegt, der in einer lichtundurchlässigen Kassette bei -70 °C zwischen 1 und 3 Tagen exponiert wurde. Zur Bestätigung der gleichen Konzentration der aufgetragenen Patienten-RNA wurde jeder Dot-Blot mit der Sonde des Housekeeping Gens  $\beta$ -Actin hybridisiert, bevor der Blot mit der spezifischen Sonde reagierte.

#### **3.3.5.5 Hybridisierung des Cancer Profiling Arrays**

Die Vorhybridisierung des CPAs und des Kontroll-Dot-Blots erfolgt mit der vorgewärmten Hybridisierungslsg. „Expresshyb“, angereichert mit denaturierter (5 min bei 94 °C) Lachssperm-DNA (Konz. 9,4 mg/ml), 30 min bei 65 °C. Die Hybridisierungslsg. wird anschließend gewechselt, die radioaktiv markierte Sonde, 30  $\mu$ l C<sub>0</sub>t-1 DNA (Konz. 1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 50  $\mu$ l 20 x SSC,

16 µl denaturierte Lachssperm-DNA (Konz. 9,4 mg/ml) und 54 µl Wasser hinzugefügt und bei 94 °C 5 min denaturiert. Dann werden 15 ml frische Hyb.-Expresslsg., 1,5 mg denaturierte Lachssperm-DNA und die Sonde in die Mitte der Hybridisierungsröhre pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte ü. N. bei 65° C. Nach Entfernen der Hybridisierungslsg. wird der Filter dreimal 30 min mit einer 2 x SSC- und 0,5 % (w/v) SDS-Lsg. gespült, einmalig mit einer 0,2x SSC- und SDS-Lsg. (0,5 %) 30 min bei 65 °C und einmalig mit einer 2 x SSC-Lsg. 5 min bei RT gewaschen, um das SDS zu entfernen. Der Blot wird in Folie eingeschweißt einem Röntgenfilm aufgelegt, der dem Blot bei - 80 °C zwischen 1 und 3 Tagen exponiert wird.

### 3.3.6 RNA-in-situ-Hybridisierung [Höltke H-J, 1990]

#### 3.3.6.1 Herstellung der spezifischen RNA-Sonden

##### Linearisierung

Als Hybridisierungsprobe wird markierte einzelsträngige RNA und DNA benutzt. Um linearisierte Transkripte zu erhalten muss die Plasmid-DNA zunächst am 3'-Ende mittels Restriktionsenzym geschnitten werden. Dafür enthalten die DNA-Plasmide vektorspezifische Schnittstellen. Für den Klon AA527683 (Thymosin β-10) werden die Restriktionsenzyme Eco RI für die Herstellung der Antisense- bzw. Hind III der Sense-Sonde und für den Klon AA991865 (SPARC) Eco RI für die Herstellung der Antisense- bzw. Xho I der Sense-Sonde gewählt. Der folgende Ansatz des Verdaus Antisense und Sense wird 2 - 4 h bei 37 °C inkubiert.

Ansatz	100 µl
Maxipräp-DNA	20 µg
DNA+ H <sub>2</sub> O	84 µl
10x Restriktionspuffer	10 µl
Restriktionsenzym	6 µl

##### Reinigung und Fällung der linearisierten Plasmid-DNA

Der Linearisierungsansatz wird mit 100 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Phenol (Tris-gesättigt, pH 8,0) versetzt, gemischt und 5 min bei RT und 13000 rpm (Eppendorf 5417 R) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Tube überführt und mit der gleichen Menge Chloroform versetzt. Nach nochmalig schütteln wird der Ansatz 5 min bei 13000 rpm bei RT zentrifugiert. Der wässrige Überstand enthält die gereinigte DNA und wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung wird der Ansatz mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 7,0) und der 2,5 fachen Menge 100 % Ethanol gemischt, 10 min bei - 80 °C gelagert, dann 30 min bei 14000 rpm (Eppendorf

5417 R) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das DNA-Pellet mit 400 µl Ethanol (70 %) gewaschen und bei 13000 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet nach Lufttrocknung in 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### **In-vitro-Transkription**

Auf den linearisierten DNA-Molekülen („Templates“) wird mit Hilfe der entsprechenden RNA-Polymerase die RNA-Sonde transkribiert. Dabei werden Digoxigenin (ein Hapten) -markierte Basen in die entstehende RNA-Sonde eingebaut, die für die Detektion der mRNA bei der späteren Hybridisierung verantwortlich sind. Der folgende Ansatz für die in-vitro-Transkription der Sense bzw. Antisense-Sonde wird gemischt, kurz zentrifugiert und 2-3 h bei 37 °C inkubiert.

Ansatz	20 µl
Template-DNA	1 µg
Linearisierte Template-DNSDNA und H <sub>2</sub> O	14 µl
RNA Labeling Mix 10x konz. (Digoxigenin UTP)	2 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,8 µl
RNA-Polymerase (20 U/µl) T3 oder T7	1,2 µl

### **Fällung der RNA-Sonden**

Durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl<sub>2</sub> und 75 µl Ethanol (100 %, eiskalt) wird die RNA 10 min bei -80 °C gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 13000 rpm, 4 °C) wird der Überstand verworfen, das RNA-Pellet mit 400 µl Ethanol (70 %) gewaschen, zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird 5 min luftgetrocknet und in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. 2 µl werden zur elektrophoretischen Konzentrationsabschätzung entnommen, die restlichen 48 µl RNA werden auf 2 Eppendorfgefäße verteilt. 24 µl RNA werden bei -80 °C gelagert und weitere 24 µl werden in 456 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen (V= 1:20) und bei -20 °C gelagert.

### **3.3.6.2 Vorbereitung und Hybridisierung der Schnitte**

Die Paraffinschnitte werden mittels Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 %) in PBS überführt. Nach zweimaligem Waschen in PBS werden die Gewebeschnitte in PFA (4 %) 30 min fixiert. Durch zweimaliges Waschen in PBS wird das übrige PFA entfernt, und die Schnitte werden 10 min mit Proteinase K

permeabilisiert, um das Eindringen der Sonde in den folgenden Schritten zu erleichtern. Das Enzym wird durch PBS ausgewaschen und in PFA (4 %) nachfixiert. Zur Entfernung der Reagenzien wird das Gewebe zweimal in PBS und SSC gewaschen und in Tris-Glycin-Puffer überführt. Für die Hybridisierung wird die RNA Sonde auf 1-2 µg/ml verdünnt. Nach der Zugabe der Sonde werden die 4-Wellschalen mit den darin befindlichen Objektträgern in feuchtes Papier eingeschlagen und ü. N. bei 65 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die Hybridisierungsprobe wird bei -20 °C gelagert und kann ca. fünf Mal wieder verwendet werden.

### **3.3.6.3 Histochemische Anfärbung**

Die hybridisierten Schnitte werden unter Schütteln fünfmalig in 5x SSC, dreimalig jeweils in Formamid-Waschlsg. und NTE-Puffer gewaschen und in Blockinglsg. (1 % Blocking Reagent, Roche, Mannheim, in 0,1 M Maleinsäure-Puffer) mindestens 1 h inkubiert. Zu jedem Objektträger werden 1 ml Anti-Digoxigenin-AP Antikörperlsg. (Antikörper 1: 5000 verdünnt in Blockinglösung) gegeben und bei 4 °C ü. N. inkubiert. Durch viermaliges kurzes Waschen in 1x TBST und dreimaliger einstündiger Inkubation in 1 x TBST, wird der ungebundene Antikörper entfernt. Der Antikörper bindet an die Digoxigenin-markierten Basen der Sonde und ist mit einem Enzym, der Alkalischen Phosphatase konjugiert, das durch die Reaktion mit einem ansonsten farblosen Stoff (BM-Purple), diesen sichtbar macht. Für die Anfärbung werden die Schnitte dreimalig kurz in NTMT-Puffer gewaschen, und 1 - 4 Tage lang mit BM Purple bei 4 °C gefärbt. Bei schwachem Signal wird die Färbelösung alle zwei Tage gewechselt. Gut gefärbte Schnitte werden der Färbelsg. entnommen und in NTMT-Puffer überführt.

### **Gegenfärbung mit Kernechtrot**

Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur zweimalig kurz in NTMT und einmalig in jeweils 1 x PBS und 1 h autoklaviertem Wasser gewaschen, bevor sie zehn Minuten lang in Kernechtrot gefärbt wurden. Mittels Kaiser Glyceringelatine wurden die Gewebeschnitte eingedeckelt.

### **Substitutionskontrolle („Sense-Kontrolle“)**

Substitutionskontrollen dienen der Überprüfung der Sense-Sonde. Es wird zu jeder Probe ein Schnitt mitgeführt, der anstelle der Antisense-Sonde mit der entsprechenden Sense-Sonde hybridisiert wird. Jede bei dem Präparat auftretende Färbung lässt auf falsch positive Ergebnisse schließen. In diesem Fall geht die Untersuchungsserie nicht mit in die Auswertung ein.



### 3.3.6.4 Beurteilung der hybridisierten Schnitte

Die Präparate wurden von zwei unabhängigen Untersuchern (Dr. I. Klamann und A. Leib), ohne Kenntnis der klinischen Daten, einer sorgfältigen lichtmikroskopischen Untersuchung bei 100 bis 400-facher Vergrößerung unterzogen. Es wurde die epitheliale, stromale (Fibroblasten) bzw. endotheliale Reaktion nach dem Prozentsatz positiver Zellen (prozentuale Positivität) und der Intensität der Expression von Thymosin  $\beta$ -10- bzw. SPARC beurteilt (s. Tab. 4). In Anlehnung an den Score nach Remmele und Stegner (1987) erfolgte die Bewertung der Expression anhand eines Scores, der sich aus prozentualer Positivität Thymosin  $\beta$ -10- bzw. SPARC-exprimierender Zellen und der Intensität der Thymosin  $\beta$ -10- bzw. SPARC-Expression zusammensetzt.

Tab. 4: Beurteilung der hybridisierten Schnitte nach prozentualer Positivität und Intensitätsgrad der Färbung

Prozentuale Positivität		Intensitätsgrad der Färbung	
Keine	= 0 Punkte	keine Färbereaktion	= 0 Punkte
< 10 %	= 1 Punkt	schwache Färbereaktion	= 1 Punkt
10-50 %	= 2 Punkte	mäßige Färbereaktion	= 2 Punkte
51-80 %	= 3 Punkte	starke Färbereaktion	= 3 Punkte
81-100 %	= 4 Punkte		

Die Bewertung der Expression erfolgte durch Multiplikation der Punktzahlen der prozentualen Positivität und des Intensitätsgrads der Färbung nach folgender Skala:

- negative Expression = 0 Punkte
- schwache Expression = 1 - 4 Punkte
- mäßige Expression = 5 - 8 Punkte
- starke Expression = 9 - 12 Punkte

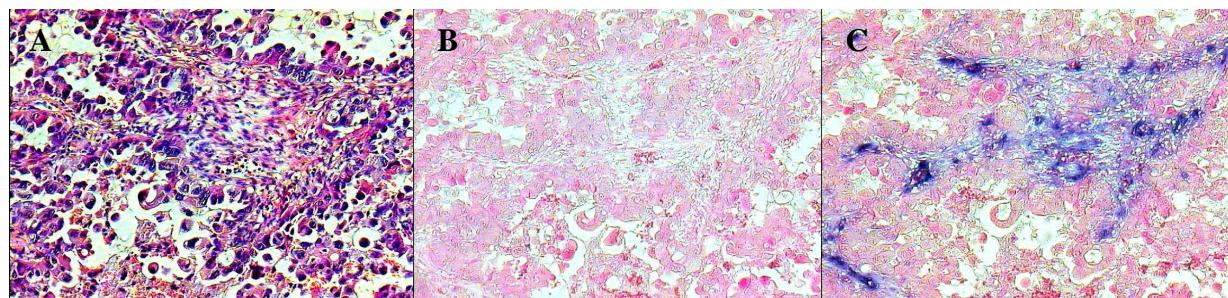


Abb. 2: Beispiel für eine erfolgreiche RNA-in-situ-Hybridisierung: HE-Färbung (A), negative Sense-Kontrolle (B) und Antisense-Schnitt (C) eines serös-papillären Ovarialkarzinoms hybridisiert mit der SPARC-Sonde. Die blau gefärbten Anteile des Antisense Schnittes zeigen eine mäßige Expression von SPARC-mRNA im Stroma. In diesem Fall sind 100 % des Stromas positiv für das SPARC Transkript, während 100 % der Tumorzellen negativ sind.

### **3.3.7 Statistik**

Excel und Access PC Software dienten zur Dokumentation und zum Datenmanagement. Die Berechnungen wurden mit dem statistischen Programm SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2008) unter Mithilfe von Dr. Rolf Richter am Universitätsklinikum Charité CVK Berlin durchgeführt. Zur Anwendung kamen der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben und der Mann-Whitney U-Test zur Darstellung von Unterschieden in den Medianwerten von binären Variablen. Zur Signifikanzberechnung von ordinalen Variablen wurde Kendall's tau b verwendet, ansonsten der Chi-Quadrat-Test. Signifikante Unterschiede lagen vor, wenn  $p \leq 0,05$  war. Die Überlebensanalysen erfolgten mittels Kaplan-Meier-Analyse und mittels multivariater Cox Regression. Graphiken (z. B. Balkendiagramme, Box-Plots, Kreisdiagramme, Kaplan Meier Kurven) wurden mit SPSS erstellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakteristika des Patientinnenkollektivs

In die Studie wurden insgesamt 62 Patientinnen eingeschlossen. Dabei ist das Patientinnenkollektiv wie folgt zusammengesetzt: 34 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom, 16 Patientinnen mit platinenswertem rezidiviertem Ovarialkarzinom, drei Patientinnen mit benignem Ovarialtumor und neun Patientinnen mit Normalgewebe des Ovars. Eine genaue Darstellung der Charakteristika des Gesamtkollektivs ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Allgemeine Charakteristika des Gesamtkollektivs.

Variablen	Normalgewebe Ovar n (%)	Benigne Ovarialtumore n (%)	Primäres Ovarialkarzinom n (%)	Rezidiviertes Ovarialkarzinom n (%)
<b>Anzahl der Patientinnen</b>	9	3	34	16
<b>Alter bei Erstdiagnose, Jahre</b> Median (Range)	57 (42-65)	72 (71-73)	58,5 (27-85)	56 (34-67)
<b>Histologie</b>	-			
Serös-papillär		2 (66,7)	23 (67,7)	14 (87,6)
Endometroid		0 (0)	9 (26,5)	1 (6,2)
Muzinös		0 (0)	1 (2,9)	1 (6,2)
Gemischt (serös-muzinös)		1 (33,3)	1 (2,9)	0 (0)
<b>Differenzierungsgrad</b>	-	-		
1			1 (2,9)	2 (12,5)
2			15 (44,1)	6 (37,5)
3			18 (53)	8 (50)
<b>FIGO-Stadium*</b>	-	-		
I			5 (14,7)	1 (6,2)
II			2 (5,9)	0 (0)
III			17 (50)	13 (81,3)
IV			10 (29,4)	2 (12,5)
<b>Lymphknotenstatus bei Erstdiagnose</b>	-	-		
NX			17 (50)	7 (43,8)
N0			7 (20,6)	4 (25)
N1			10 (29,4)	5 (31,2)
<b>CA 125 präoperativ (U/ml)</b> Median (Range)	59 (31 – 99)	27 (8 – 46)	269 (4 - 8081)	159 (9 - 29000)
<b>Aszites</b>				
Kein	9 (100)	3 (100)	11 (32,4)	11 (68,8)
≤ 500 ml			9 (26,5)	2 (12,5)
> 500 ml			14 (41,2)	3 (18,8)
<b>postoperativer Tumorrest</b>	-	-		
Makroskopisch tumorfrei			19 (55,9)	7 (43,75)
≤ 1cm			4 (11,8)	2 (12,5)
> 1cm			11 (32,3)	7 (43,75)

\* Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

### 4.1.1 Altersverteilung

Das Alter der Patientinnen mit Normalgewebe des Ovars bei der Operation liegt im Median bei 57 Jahren (Range, 42 - 65 Jahre), der Frauen mit benignem Ovarialtumor bei 72 Jahren (Range, 71 - 73 Jahre), der Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom bei 58,5 Jahren (Range, 27 - 85 Jahre) und mit rezidiviertem Ovarialkarzinom bei Erstdiagnose des Primärtumors bei 56 Jahren (Range, 34 - 67 Jahre). Patientinnen mit benignen Tumoren sind in dieser Untersuchung mit 71 bis 73 Jahren signifikant ( $p < 0,05$ ) älter als Patientinnen mit Normalgewebe vom Ovar, primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom.

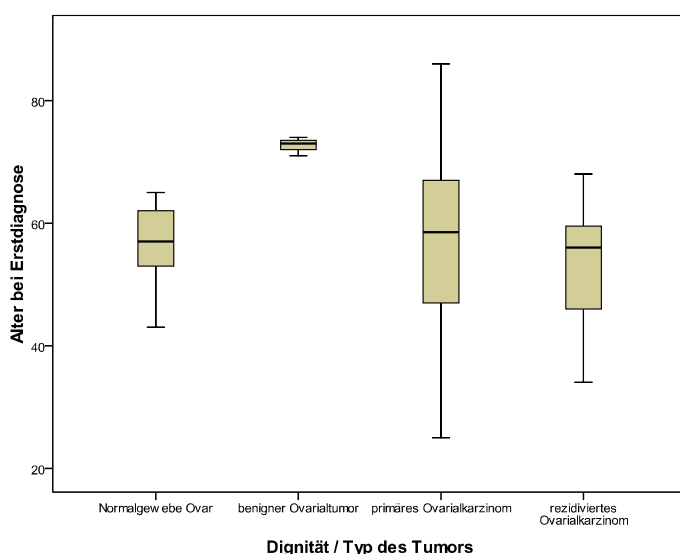


Abb. 3: Altersverteilung der Patientinnen bei Erstdiagnose Normalgewebe des Ovars, benigner Ovarialtumor, primäres oder rezidiviertes Ovarialkarzinom.

### 4.1.2 Histologische Tumorklassifikation

Von den neun Frauen mit Normalgewebe des Ovars sind insgesamt zwei prä- und sieben postmenopausal. Die benignen Ovarialtumore sind histologisch serös-papillär (zwei) und serös-muzinös (eins). In der Gruppe der primären Ovarialkarzinome sind 23 Fälle (67,7 %) serös-papillär, neun endometroid, jeweils eins serös-muzinös (gemischt) und muzinös (s. Abb. 4). Bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinomrezidiv sind 14 Rezidive (87,5 %) histologisch serös-papillär und je eins ist endometroid oder muzinös (s. Abb. 4). Es gibt bezüglich der Häufigkeit des histologischen Typs keinen signifikanten Unterschied zwischen primären und rezidivierten Ovarialkarzinomen.

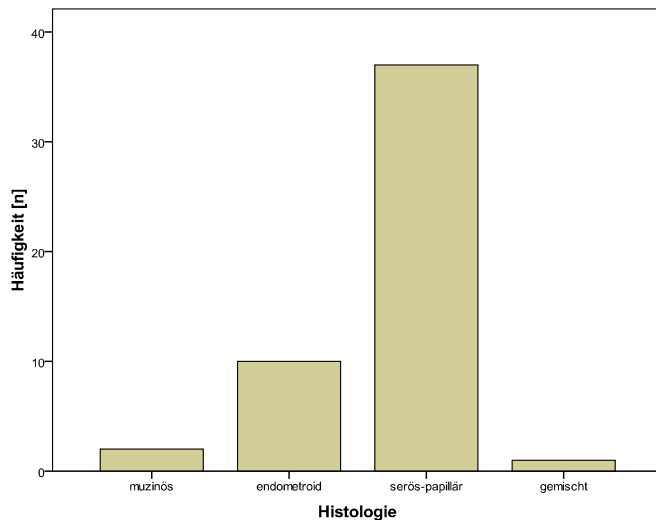


Abb. 4: Häufigkeitsverteilung der Histologie bei primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.

#### 4.1.3 Differenzierungsgrad

Nach den Richtlinien der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) werden hinsichtlich des Differenzierungsgrads (Grading) der Ovarialkarzinome drei Grade unterschieden: Grad 1 (gut/hoch differenziert), Grad 2 (mäßig/mittelgradig differenziert) und Grad 3 (gering differenziert/undifferenziert). Bei den 34 primären Ovarialkarzinomen sind eins gut, 15 mäßig und 18 gering differenziert. Bei den 16 rezidierten Ovarialkarzinomen sind zwei gut, sechs mäßig und acht gering differenziert. Es gibt bezüglich der Häufigkeitsverteilung des Gradings keinen signifikanten Unterschied zwischen primären oder rezidierten Ovarialkarzinomen.

#### 4.1.4 Postoperativer Tumorrest

Nach dem Ausmaß der erzielten Tumorresektion werden Patientinnen mit kompletter Tumorentfernung und makroskopischer Tumorfreiheit (R0), sowie Patientinnen mit weniger und mehr als 1 cm Tumorrest unterschieden. In unserem Studienkollektiv erfolgte eine Tumorresektion mit makroskopischer Tumorfreiheit in 26 Fällen (52 %), mit einem Tumorrest  $\leq 1$  cm in 6 Fällen (12 %) und mit einem Tumorrest  $> 1$  cm in 18 Fällen (36 %).

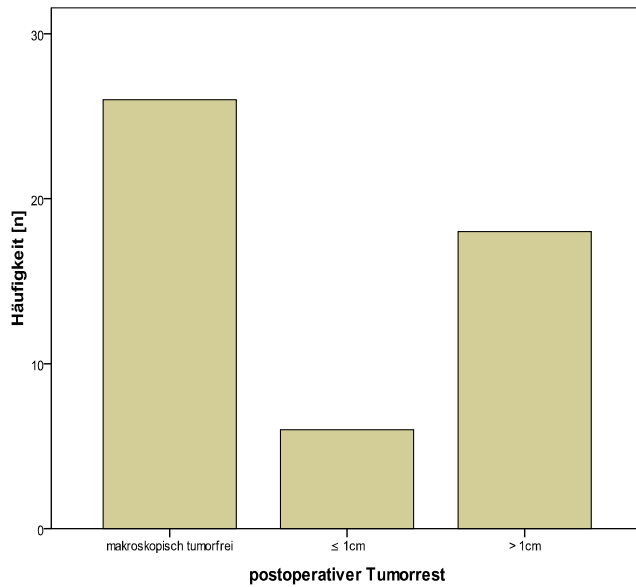


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der Patientinnen mit makroskopischer Tumorfreiheit oder mit postoperativem Tumorrest  $\leq 1$  cm und  $> 1$  cm.

#### 4.1.5 Tumor-Stadieneinteilung nach FIGO

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Ovarialkarzinoms liegt bei 27 Patientinnen (79,4 %) ein fortgeschrittenes Stadium vor (FIGO III: 50 %, FIGO IV: 29,4 %). Bei zwei Patientinnen (5,9 %) liegt ein FIGO-Stadium II und bei fünf (14,7 %) ein FIGO-Stadium I vor (s. Abb. 6).

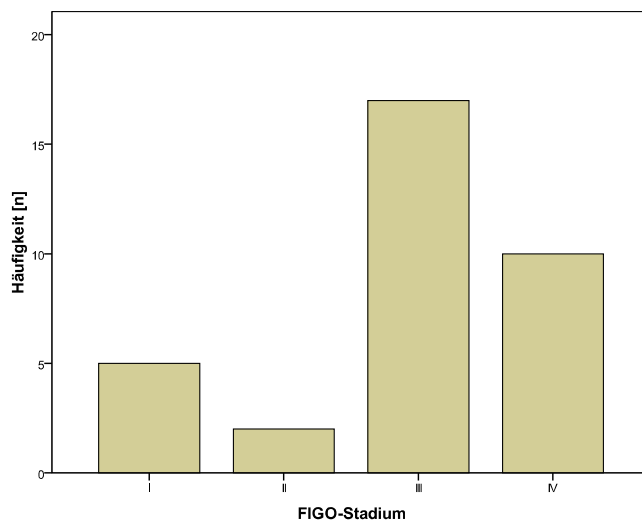


Abb. 6: Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien nach FIGO der Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom (n=34).

#### 4.1.6 Tumorklassifikation nach TNM

Postoperativ lag bei 61,8 % (21 Fälle) der Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom ein fortgeschrittenes Tumorstadium pT3c vor. Bei 17 primär operierten Patientinnen (50 %) erfolgte eine Lymphonodektomie, dabei fanden sich bei zehn Patientinnen (58,8 %) positiv befallene Lymphknoten. 41,2 % der Patientinnen (14 Fälle) mit einem primären Ovarialkarzinom hatten bei Erstdiagnose Metastasen, bei 23,5 % wurden keine Metastasen festgestellt und bei 35,3 % war der Metastasierungszustand nicht bekannt.

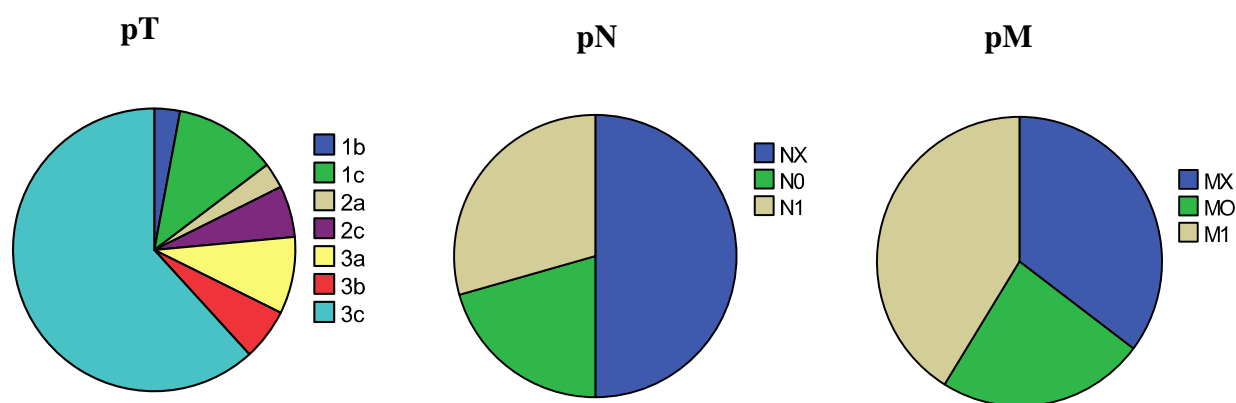


Abb. 7 : Häufigkeitsverteilung der Tumorklassifikation nach TNM.

#### 4.1.7 Präoperativer CA 125-Wert

Der Median des präoperativ bestimmten CA 125-Wertes bei Patientinnen mit Normalgewebe vom Ovar, benignen Ovarialtumoren, primären oder rezidierten Ovarialkarzinomen ist der Tabelle 6 zu entnehmen. Alle CA 125-Werte von Frauen mit Normalgewebe des Ovars liegen unter dem Median der CA 125-Werte von Patientinnen mit Ovarialkarzinom, fallen aber in deren Konfidenzintervall und unterscheiden sich nicht signifikant von den CA 125-Werten der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom.

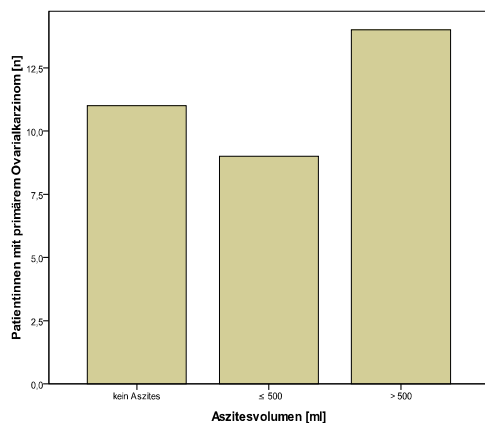
Tab. 6: Präoperativer CA 125-Wert im Median bei Patientinnen mit Normalgewebe des Ovars, benignen Ovarialtumoren, primären oder rezidierten Ovarialkarzinomen.

Diagnose	Präoperativer CA 125 (U/ml), Median (Range)
Normalgewebe Ovar	59 (31 – 99)
Benigne Ovarialtumore	27 (8 – 46)
Primäre Ovarialkarzinome	269 (4 – 8081)
Rezidierte Ovarialkarzinome	159 (9 - 29000)

#### 4.1.8 Aszites

Die Bildung von Aszites bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist ein bedeutendes Tumorsymptom und wird daher in die Auswertung aufgenommen. Nach dem Aszitesvolumen werden drei Gruppen unterschieden: Patientinnen ohne Aszites, Patientinnen mit  $\leq 500$  ml und mit  $> 500$  ml Aszites. Es weisen elf Patientinnen (32,4 %) mit primärem und elf Patientinnen (68,8 %) mit rezidiviertem Ovarialkarzinom kein Aszites, neun (26,5 %) bzw. zwei (12,5 %)  $\leq 500$  ml Aszites und 14 (41,2 %) bzw. drei (18,8 %)  $> 500$  ml Aszites auf (s. Abb. 8). Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom weisen signifikant häufiger Aszites auf ( $p = 0,018$ ) als Patientinnen mit rezidiviertem Ovarialkarzinom. Bei Auftreten von Aszites umfasst das Volumen sowohl bei primären Ovarialkarzinomen als auch bei Ovarialkarzinomrezidiven in mehr als 50 % der Fälle  $> 500$ ml.

A



B

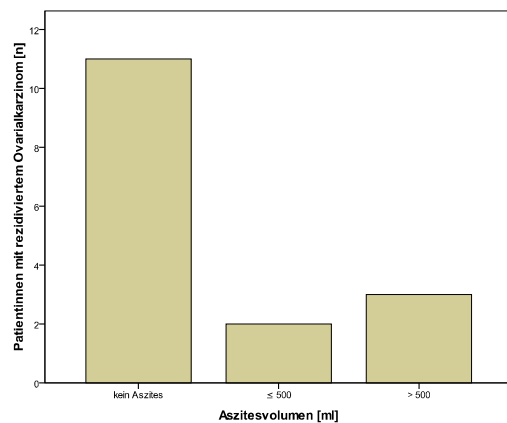


Abb. 8: Häufigkeit des Auftretens und der Menge von Aszites bei Patientinnen mit primärem (A) oder rezidiviertem (B) Ovarialkarzinom.



## 4.2 Identifizierung der Überexpression von Thymosin $\beta$ -10 und SPARC im Ovarialkarzinom mittels elektronischem Northern

	NORMAL	TUMOR	Verhältnisse	
	% Häufigkeit	% Häufigkeit	N/T	T/N
Blase	0.0078	0.0665	0.1173	8.5221
Brust	0.0217	0.0169	1.2854	0.7779
Ovar	0.0210	0.0650	0.3224	3.1022
Intestinum	0.0421	0.0925	0.4556	2.1950
Gehirn	0.0163	0.0647	0.2514	3.9775
Hepatisch	0.0095	0.0259	0.3676	2.7200
Herz	0.0307	0.0412	0.7453	1.3418
Hoden	0.0058	0.0819	0.0703	14.2284
Prostata	0.0065	0.0192	0.3412	2.9308
Uterus	0.0457	0.0272	1.6834	0.5940

Tab. 7 A : Relative Häufigkeit der Thymosin  $\beta$ -10-Expression in Normal- (N) und Tumorgewebe (T) und deren Verhältnisse zueinander (N/T bzw. T/N).

	NORMAL	TUMOR	Verhältnisse	
	% Häufigkeit	% Häufigkeit	N/T	T/N
Blase	0.0117	0.0383	0.3051	3.2777
Brust	0.0141	0.0301	0.4679	2.1374
Ovar	0.0060	0.0234	0.2558	3.9088
Intestinum	0.0077	0.0139	0.5522	1.8109
Gehirn	0.0074	0.0185	0.4000	2.5001
Herz	0.0615	0.0275	2.2358	0.4473
Lunge	0.0218	0.0204	1.0669	0.9373
Niere	0.0027	0.0479	0.0566	17.6536
Pankreas	0.0017	0.0221	0.0748	13.3713
Uterus	0.0152	0.1290	0.1181	8.4650

Tab. 7 B: Relative Häufigkeit der SPARC-Expression in Normal (N)- und Tumorgewebe (T) und deren Verhältnisse zueinander (N/T bzw. T/N).

Der elektronische Northern zeigt eine ungefähre Verdreifachung der Expression von Thymosin  $\beta$ -10 in Ovarialkarzinomen gegenüber Normalgewebe des Ovars (s. Tab. 7 A). Hodengewebe, als männliches gonadales Pendant zum Ovar, weist auch eine deutliche Überexpression im Tumorgewebe auf.

Der elektronische Northern zeigt eine ungefähre Vervielfachung der SPARC-Expression in Ovarialkarzinomen gegenüber Normalgewebe des Ovars (s. Tab. 7 B).

### 4.3 Validierung der Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression in kommerziellen Northern-Blot Arrays

Die MTN-Blot-, Dot-Blot- und CPA-Analysen erfolgen zur Validierung der spezifischen Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression in unterschiedlichen Normal- und Tumorgeweben.

#### 4.3.1 Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Multi-Tissue Northern-Blot

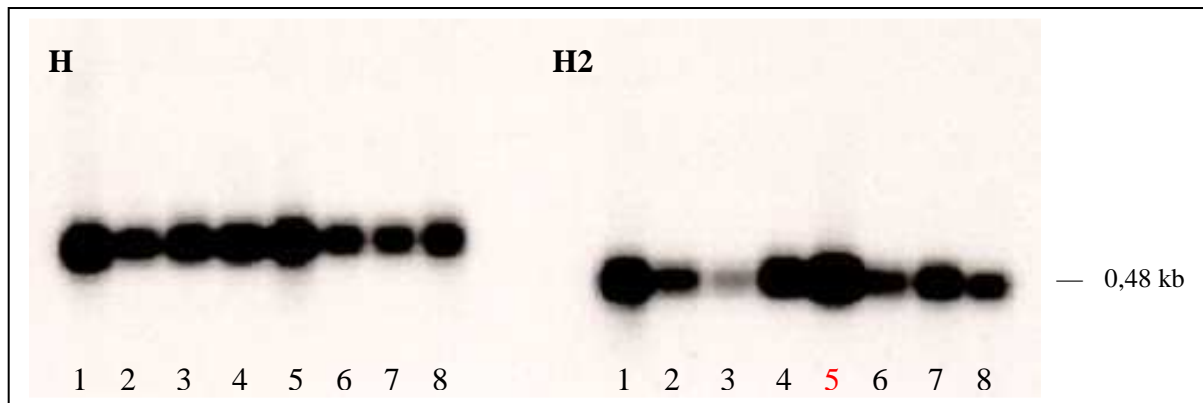


Abb. 9 A: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Multi-Tissue-Northern-Blot.

H: 1 Herz, 2 ZNS, 3 Plazenta, 4 Lunge, 5 Leber, 6 Skelettmuskel, 7 Niere, 8 Pankreas

H2: 1 Milz, 2 Thymus, 3 Prostata, 4 Hoden, 5 Ovar, 6 Dünndarm, 7 Kolon, 8 Periphere Blutleukozyten

Die Thymosin  $\beta$ -10-Sonde weist eine ubiquitäre Signalreaktion auf (s. Abb. 9 A). Starke Signale zeigen sich in Herz und Leber (Blot H, Bande 1,5), Milz und Ovar (Blot H2, Bande 1, 5). Ein schwaches Signal ist in Prostatagewebe zu vermerken (Blot H2, Bande 3). Die Transkriptgröße von Thymosin  $\beta$ -10 liegt im Bereich von 0,4-0,5 kb. Dies stimmt mit der bekannten Transkriptgröße von 482 bp überein [NCBI, Nucleotide, Homo sapiens, TMSB 10].

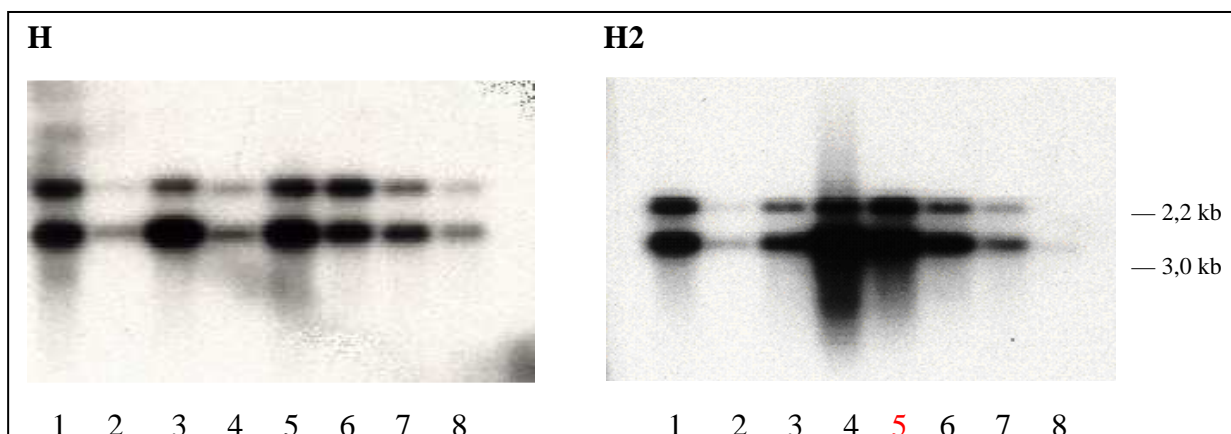


Abb. 9 B: SPARC-Expression im Multi-Tissue-Northern-Blot.

H: 1 Herz, 2 ZNS, 3 Plazenta, 4 Lunge, 5 Leber, 6 Skelettmuskel, 7 Niere, 8 Pankreas

H2: 1 Milz, 2 Thymus, 3 Prostata, 4 Hoden, 5 Ovar, 6 Dünndarm, 7 Kolon, 8 Periphere Blutleukozyten

In der Autoradiographie für die SPARC-Sonde sind je Gewebespur zwei Banden ähnlicher Intensität zu erkennen, die auf die bekannten Spleißvarianten von SPARC zurückzuführen sind (s. Abb. 9 B). Die Signale in Herz, Plazenta, Leber und Skelettmuskel (Blot H, Bande 1, 3, 5, 6) und Milz, Hoden, Ovar und Dünndarm (Blot H2, Bande 1, 4, 5, 6) sind stark. Eine weniger intensive Bande ist in Lunge, Niere und Pankreas (Blot H, Bande 4, 7, 8) und Prostata und Kolon (Blot H2, Bande 3, 7) zu sehen. Ein lediglich schwaches Signal zeigt sich in Gehirn (Blot H, Bande 2) Thymus und peripheren Blutleukozyten (Blot H2, Bande 2, 8). Die Transkriptgröße der Einzelbanden liegt für SPARC bei 2,2 kb bzw. 3,0 kb. Dies stimmt mit der bekannten Transkriptgröße von 2,2 kb und 3,0 kb überein [NCBI, Nucleotide, Homo sapiens, SPARC].

Die auf  $\beta$ -Actin normierten MTN-Blots bestätigen, dass in allen Spuren annähernd gleiche Mengen an Gesamt-RNS mit ausreichender RNA-Qualität von Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC aufgetragen wurden. Somit lässt die Signalstärke der Autoradiografien für beide Gene auf deren relative Expressionsstärke in den verschiedenen Geweben schließen. Sowohl Thymosin  $\beta$ -10 als auch SPARC stellt sich in den untersuchten Geweben mit einer ubiquitären Expression dar und sind demnach nicht ovarialspezifisch.

### 4.3.2 Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Dot-Blot

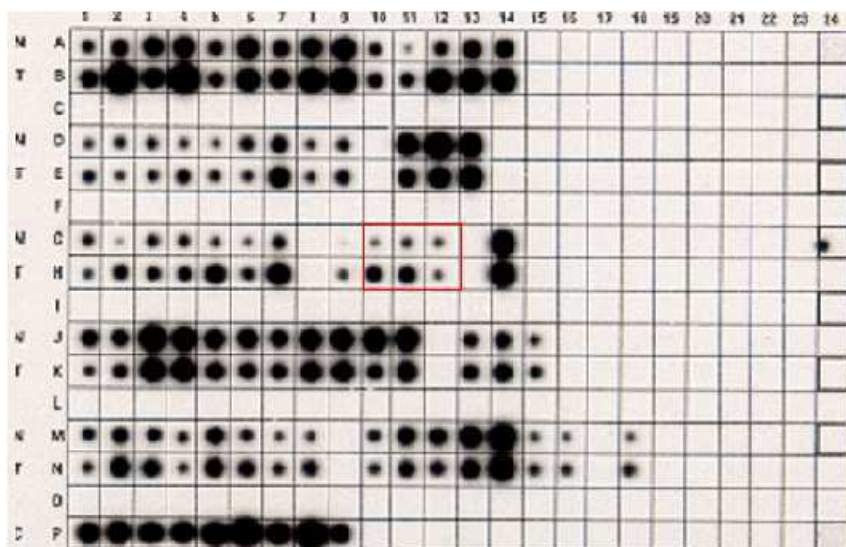


Abb. 10 A: Thymosin  $\beta$ -10- Expression im Dot-Blot.

A/B 1-14 Niere, D/E 1-9 Brust, D/E 11-13 Prostata, G/H 1-7 Uterus, G/H 9 Niere, G/H 10-12 Ovar, G/H 14 Zervix, J/K 1-11 Kolon, J/K 13-15 Lunge, M/N 1-8 Magen, M/N 10-16 Rektum, M/N 18 Dünndarm, P 1-9 Zelllinien: 1 HeLa, 2 Burkitt Lymphom, 3 Chronisch myeloische Leukämie, 4 Promyelozytische Leukämie, 5 Melanom, 6 Lungenkarzinom, 7 Lymphoblastische Leukämie, 8 Kolorektales Adenokarzinom, 9 Burkitt Lymphom, Kontrollen: 24 A Ubiquitin cDNA, 24 C Hefe Total RNA, 24 E Hefe tRNA, 24 G E.coli DNA, 24 I Poly (A), 24 K humane C<sub>0</sub> t-1 DNA, 24 M humane genomische Dann

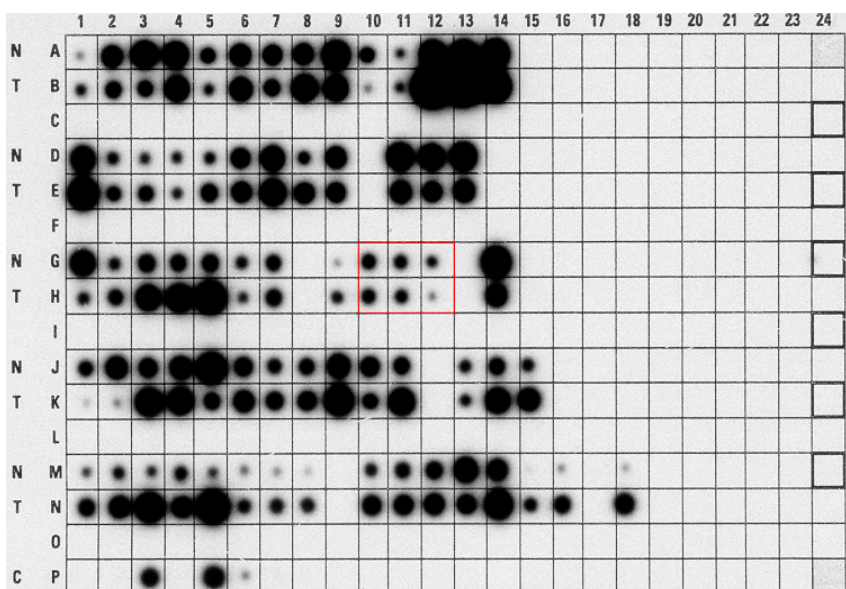


Abb. 10 B: SPARC- Expression im Dot-Blot.

A/B 1-14 Niere, D/E 1-9 Brust, D/E 11-13 Prostata, G/H 1-7 Uterus, G/H 9 Niere, G/H 10-12 Ovar, G/H 14 Zervix, J/K 1-11 Kolon, J/K 13-15 Lunge, M/N 1-8 Magen, M/N 10-16 Rektum, M/N 18 Dünndarm, P 1-9 Zelllinien: 1 HeLa, 2 Burkitt Lymphom, 3 Chronisch myeloische Leukämie, 4 Promyelozytische Leukämie, 5 Melanom, 6 Lungenkarzinom, 7 Lymphoblastische Leukämie, 8 Kolorektales Adenokarzinom, 9 Burkitt Lymphom, Kontrollen: 24 A Ubiquitin cDNA, 24 C Hefe Total RNA, 24 E Hefe tRNA, 24 G E.coli DNA, 24 I Poly (A), 24 K humane C<sub>0</sub> t-1 DNA, 24 M humane genomische DNA

Die Dot-Blots für Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC wurden auf  $\beta$ -Actin normiert. Alle Spuren zeigen annähernd gleiche Mengen an Gesamt-RNS mit einer ausreichenden RNA-Qualität. Die Abbildung 10 A zeigt die ubiquitäre Thymosin  $\beta$ -10-Expression. Intensive Signale finden sich in folgenden Organen: Niere (A/B 1 - 14), Prostata (D/E 1 - 13), Zervix (G/H 14), Kolon (J/K 1 - 11) und den Zelllinien (P 1 - 9). Schwächere Signale zeigen Brust (D/E 1 - 9), Uterus (G/H 1 - 7), Niere (G/H 9), Ovar (G/H 10 - 12), Lunge (J/K 13 - 15), Magen (M/N 1 - 8), Rektum (M/N 10 - 16) und Dünndarm (M/N 18). Dabei erkennt man sowohl zwischen Normal- und Tumorgewebe als auch interindividuell innerhalb einer Gewebeentität Unterschiede in der Expression. In 31 von 68 Tumorproben (45,6 %) ist Thymosin  $\beta$ -10 überexprimiert.

Das Autoradiogramm der Hybridisierung der SPARC-Sonde (AA991865) mit dem Dot-Blot ist in Abbildung 10 B dargestellt. SPARC zeigt sich als ein in allen untersuchten Geweben exprimiertes Gen. Intensive Signale finden sich in folgenden Organen: Niere (A/B 1 - 14), Brust (D/E 1 - 9), Prostata (D/E 1 - 13), Uterus (G/H 1 - 7), Zervix (G/H 14), Kolon (J/K 1 - 11), Lunge (J/K 13 - 15), Magen (M/N 1 - 8), Rektum (M/N 10 - 16), Dünndarm (M/N 18) und den Zelllinien (P 3, 5). Schwächere Signale zeigen Niere (G/H 9), Ovar (G/H 10 - 12) und die Zelllinie eines Lungenkarzinoms (P 6). Dabei erkennt man sowohl zwischen Normal- und Tumorgewebe als auch interindividuelle Unterschiede in der Expression. In 34 von 68 Tumorproben (50 %) ist SPARC überexprimiert.

Im Folgenden soll ausschließlich auf die Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression in den korrespondierenden Ovargeweben eingegangen werden. Von den drei Ovarproben ist Thymosin  $\beta$ -10 in zwei Ovarialtumoren gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe überexprimiert, in einer Probe besteht kein Unterschied in der Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe. Von den drei Proben ist SPARC in zwei Ovarialtumoren gleichbleibend im Normal- und Tumorgewebe exprimiert, in einer Probe wird SPARC vom Tumor geringer exprimiert (s. Tab. 8).

Tab. 8: Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Dot-Blot

	Thymosin $\beta$ -10		SPARC	
	Expression Tumor > Normal in n Fällen (%)	Expression Tumor = Normal in n Fällen (%)	Expression Tumor < Normal in n Fällen (%)	Expression Tumor = Normal in n Fällen (%)
Ovarialproben	2 von 3 (66,67)	1 von 3 (33,33)	1 von 3 (33,33)	2 von 3 (66,67)

### 4.3.3 Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Cancer Profiling Array

Dargestellt sind die Autoradiogramme eines Cancer Profiling Arrays (CPA) hybridisiert mit der Thymosin  $\beta$ -10- bzw. SPARC-Sonde (Abb. 11 A - B). Auf dem CPA sind 241 Tumore mit dem korrespondierenden Normalgewebe dargestellt. Der CPA wurde auf  $\beta$ -Actin normiert und zeigt in allen Proben annähernd gleich viel cDNS.

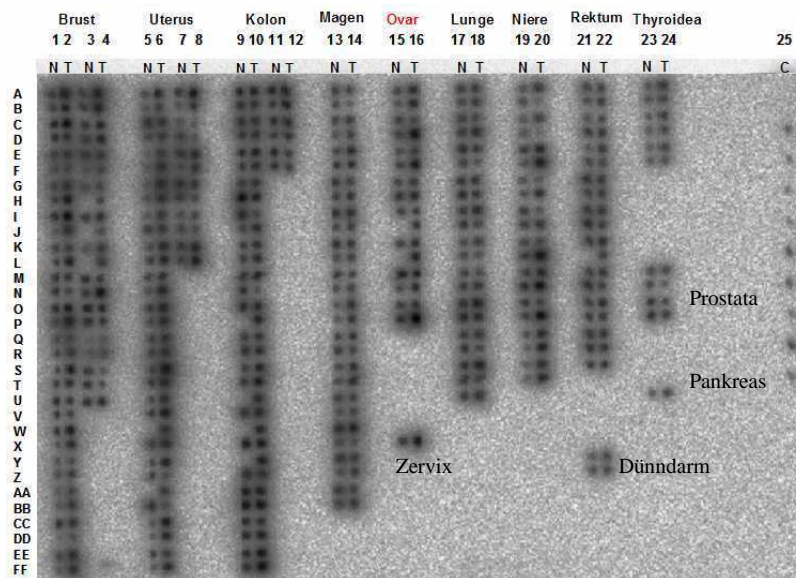


Abb. 11 A: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Cancer Profiling Array.

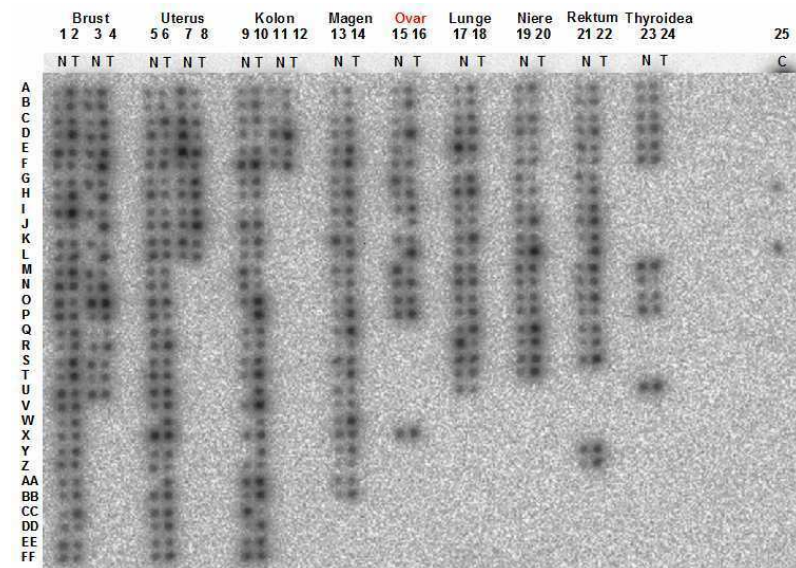


Abb. 11 B: SPARC-Expression im Cancer Profiling Array.

Die genaue Expression einiger untersuchter Tumorentitäten kann der Tabelle 9 entnommen werden.

Tab. 9: Verhältnis der Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression von Normalgewebe und korrespondierendem Tumor verschiedener Organe.

	Thymosin $\beta$ -10			SPARC		
	Expression Tumor/Normal $\geq 2$ in n Fällen (%)	Expression Tumor/Normal $\leq 0,5$ in n Fällen (%)	Expression Tumor = Normal in n Fällen (%)	Expression Tumor/Normal $\geq 2$ in n Fällen (%)	Expression Tumor/Normal $\leq 0,5$ in n Fällen (%)	Expression Tumor = Normal in n Fällen (%)
Ovar	9 von 16 (56,25)	0 von 16 (0)	7 von 16 (43,75)	7 von 16 (43,75)	2 von 16 (12,5)	7 von 16 (43,75)
Brust	19 von 50 (38)	2 von 50 (4)	29 von 50 (48)	26 von 50 (52)	3 von 50 (6)	21 von 50 (42)
Uterus	20 von 42 (48)	0 von 42 (0)	22 von 42 (52)	8 von 42 (19)	7 von 42 (17)	27 von 42 (64)
Magen	6 von 27 (22)	0 von 27 (0)	21 von 27 (78)	19 von 27 (70)	0 von 27 (0)	8 von 27 (30)
Rektum	1 von 18 (6)	0 von 18 (0)	17 von 18 (94)	10 von 18 (56)	0 von 18 (0)	8 von 18 (44)
Lunge	6 von 21 (29)	0 von 21 (0)	15 von 21 (71)	5 von 21 (24)	2 von 21 (10)	14 von 21 (66)
Prostata	0 von 4 (0)	2 von 4 (50)	2 von 4 (50)	0 von 4 (0)	1 von 4 (25)	3 von 4 (75)
Kolon	5 von 35 (14)	3 von 35 (9)	27 von 35 (77)	14 von 35 (40)	6 von 35 (17)	15 von 35 (43)
Niere	10 von 20 (50)	0 von 20 (0)	10 von 20 (50)	8 von 20 (50)	1 von 20 (5)	11 von 20 (45)

Im Folgenden wird detailliert die Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression in Ovargeweben untersucht. Thymosin  $\beta$ -10 wird in neun von 16 Ovarialkarzinomen (56,25 %) signifikant (Tumor / Normal  $\geq 2$ ) gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe des Ovars überexprimiert in den übrigen Ovarialtumoren bleibt die Expression gleich (s. Tab. 10).

Thymosin  $\beta$ -10 zeigt die höchste Expression im Adenokarzinom, im nicht näher definierten Karzinom, im adenosquamösen Karzinom und im muzinösen Borderline Tumor (s. Tab. 10). Die zwei Metastasen exprimieren im Vergleich zu deren korrespondierendem Karzinom tendenziell weniger Thymosin  $\beta$ -10. Alle Normalgewebe des Ovars zeigen eine nur geringe Thymosin  $\beta$ -10-Expression. Eine im Tumor signifikant geringere Expression (Tumor/Normal  $\leq 0,5$ ) ist in keinem Fall zu verzeichnen.

SPARC zeigt in sieben von 16 Ovarialkarzinomen (43,75 %) eine signifikante Überexpression im Tumor gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe des Ovars. Eine im Ovarialkarzinom geringere SPARC-Expression ist in zwei von 16 Fällen (12,5 %) und eine gleich bleibende Expression in 7 Fällen (43,75 %) zu verzeichnen (s. Tab. 10).

SPARC zeigt Die höchste Expression im Adenokarzinom, im nicht näher definierten Karzinom und im muzinösen Borderline Tumor (s. Tab. 10). Tendenzuell zeigen die weniger fortgeschrittenen Karzinome (FIGO I) eine höhere SPARC-Expression im korrespondierenden

Tumor. Eine signifikant geringere Expression im Tumor (Tumor/Normal  $\leq 0,5$ ) war in zwei von 16 Fällen (12,5 %) zu verzeichnen, dem serös papillärem Karzinom und dem serös papillärem Zystadenokarzinom. Alle Normalovare zeigen mindestens eine geringe SPARC-Expression. Die Expression der Metastasen im Verhältnis zu deren korrespondierendem Normalgewebe des Ovars ist uneinheitlich. Die Metastase des serösen Zystadenokarzinoms exprimiert signifikant mehr SPARC als das Normalgewebe des Ovars und signifikant mehr SPARC als der Primärtumor. Die Metastase des Adenokarzinoms zeigt eine gegenüber dem Normalgewebe gleichbleibende Expression, im Vergleich zum Primärtumor wird SPARC in der Metastase aber signifikant weniger exprimiert.

Tab. 10: Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Cancer Profiling Array und klinische Daten. Dargestellt ist die Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression in Ovarialtumoren unterschiedlicher Dignität und Histologie im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe des Ovars. Eine signifikante Überexpression im Tumor ist ab einem Quotienten Tumor/Normal  $\geq 2$  anzunehmen, eine signifikant geringere Expression im Tumor ab einem Quotienten Tumor/Normal  $\leq 0,5$ .

Tumorentität	histopathologische Charakteristika			Thymosin $\beta$ -10	SPARC
	Alter	FIGO	Besonderheiten	Tumor/Normal	Tumor/Normal
Metastase eines serösen Zystadenokarzinoms	50	IIIa	Fernmetastasen Tumorgroße 3,5 cm	1,06	2,78
Seröses Zystadenokarzinom				1,44	1,21
Metastase eines Adenokarzinoms	53	III	Fernmetastasen Tumorgroße 2 cm	2,10	1,41
Adenokarzinom				<b>3,18</b>	<b>7,31</b>
Seröses Karzinom	58	IIIb	/	2,29	2,75
Seröses Zystadenokarzinom	69	unbekannt	/	0,89	1,15
Seröses Zystadenokarzinom	61	unbekannt	Fernmetastasen	2,44	1,60
Serös papilläres Karzinom	72	unbekannt	Fernmetastasen G 2	1,02	<b>0,26</b>
Serös papilläres Zystadenokarzinom	56	IIIa	Tumorgroße 1,6 x 1,5 x 5 cm	1,57	<b>0,37</b>
Serös papilläres Zystadenokarzinom	64	unbekannt	/	1,48	1,27
Karzinom	58	I	/	<b>4,55</b>	<b>7,02</b>
Adenokarzinom	41	unbekannt	Fernmetastasen	<b>4,60</b>	2,15
Zystadenokarzinom	50	IIIb	Tumorgroße 9 x 6 x 3 cm	1,35	1,95
Adenosquamöses Karzinom	57	IIa	/	<b>4,14</b>	1,13
Klarzellkarzinom	72	I	/	1,96	0,65



## 4.4 RNA-in-situ-Hybridisierung

### 4.4.1 Deskriptive Charakterisierung der Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in Ovargewebe unterschiedlicher Dignität

#### 4.4.1.1 Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in Normalgeweben des Ovars

Die Thymosin  $\beta$ -10-Expression ist im Normalgewebe des Ovars ( $n = 9$ ) vor allem auf die Rindenzone beschränkt, in der es konstitutiv in steroidproduzierenden Zellen exprimiert wird. Die höchste Expression weisen Granulosazellen auf. Ein Corpus luteum weist eine starke Färbung auf, im Gegensatz zum Corpus albicans, das kein Hybridisierungssignal mehr zeigt. Die Expression im Stroma ist in vier Fällen (44,5 %) schwach, in vier Fällen (44,5 %) mäßig und in einem Fall stark (11 %). Im Oberflächenepithel wird Thymosin  $\beta$ -10 nur in 22 % der Fälle schwach exprimiert, die übrigen 78 % zeigen kein Hybridisierungssignal. In der Markzone ist in einigen Fällen eine schwache Expression nachweisbar. Bei fünf der neun normalen Ovargewebeprobe (55,5 %) ist die Expression im Endothel negativ, in vier Fällen (44,5 %) schwach positiv (s. Abb. 12).

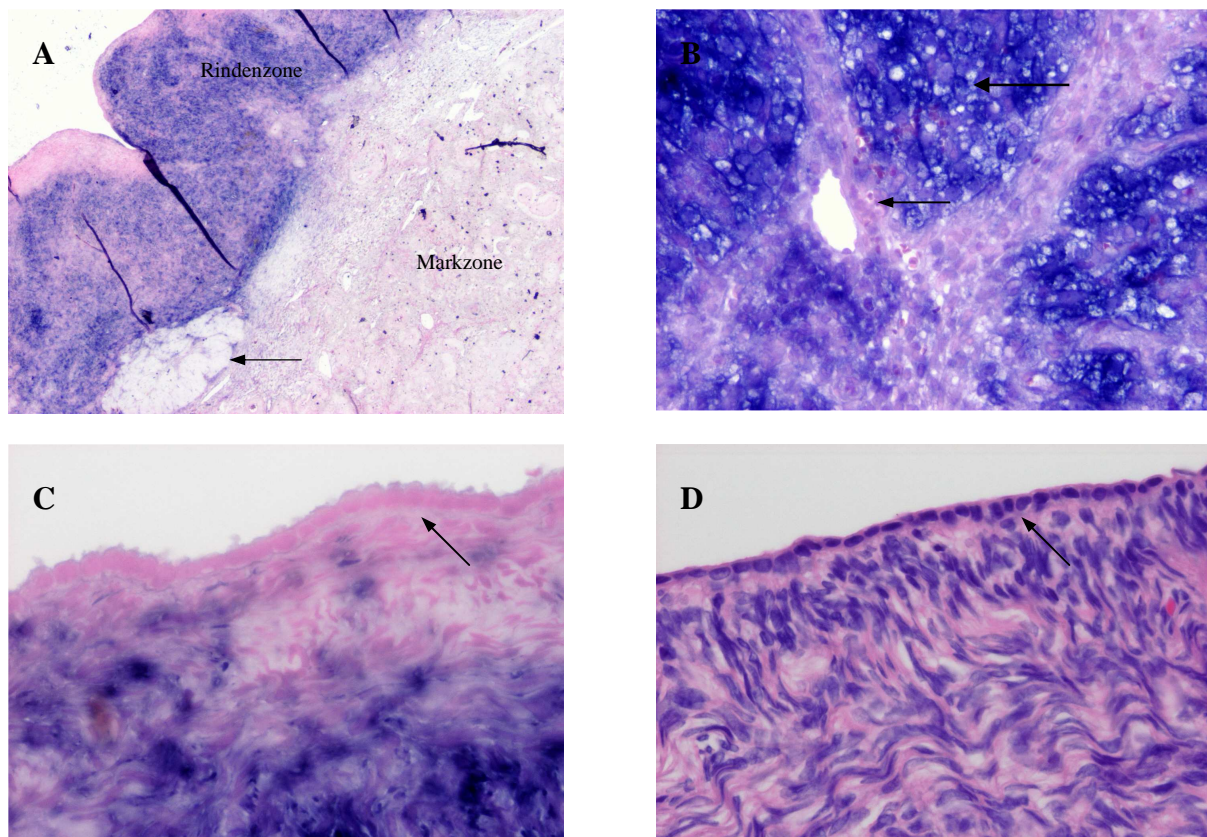


Abb. 12: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Normalovar einer 63-jährigen Frau (A, C, D): Übersicht mit bindegewebigem Corpus albicans (Pfeil), Antisense, 50-fache Vergrößerung (A), Oberflächenepithel (Pfeil) mit angrenzendem Stroma, Antisense, 400-fache Vergrößerung (C) und HE-Färbung (D). Die Abbildung B zeigt schwach positives Endothel (dünner Pfeil) und Granulosaluteinzellen (dicker Pfeil) im Corpus luteum einer 42-jährigen Frau in 200-facher Vergrößerung, Antisense.

#### 4.4.1.2 Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in benignen Ovarialtumoren

Das Tumorepithel in benignen Ovarialtumoren ( $n = 3$ ) ist in einem Fall schwach positiv, ansonsten negativ. Die stromale Expression ist in zwei Fällen (67 %) schwach und in einem Fall (33 %) stark. Vor allem die an das Zystenepithel angrenzenden Fibroblasten zeigen eine gegenüber dem übrigen Stroma verstärkte Thymosin  $\beta$ -10-Expression. Das Endothel zeigt in zwei von drei Fällen ein schwaches Hybridisierungssignal (s. Abb. 13).

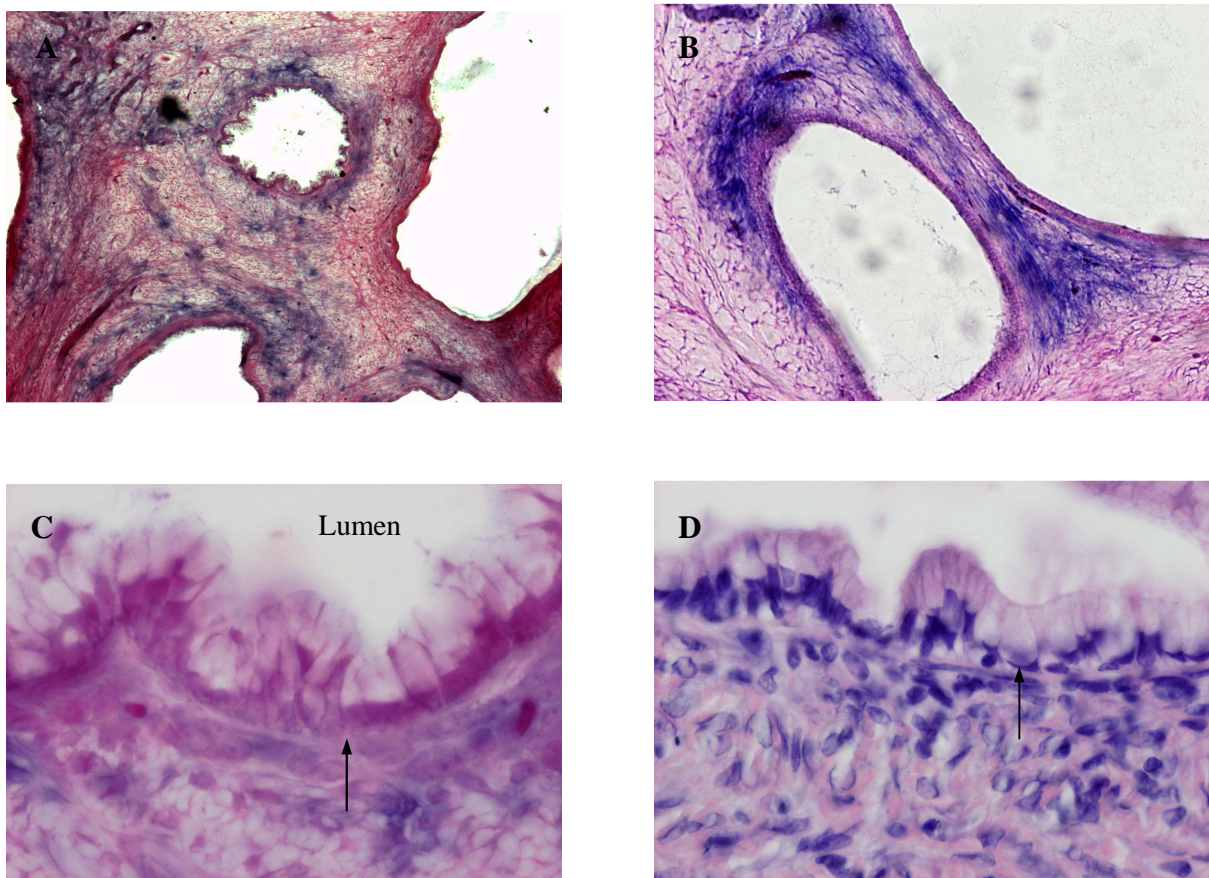


Abb. 13: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im muzinösen Zystadenofibrom einer 73-jährigen Frau: negatives Zystenepithel (Pfeil) mit angrenzendem stark gefärbtem Stroma, Übersicht, Antisense, 50-fache (A), Antisense, 100-fache Vergrößerung (B), Antisense, 400-fache Vergrößerung (C) und HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung (D).

#### 4.4.1.3 Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in primären Ovarialkarzinomen

Von den 34 untersuchten primären Ovarialkarzinomen sind alle Thymosin  $\beta$ -10-positiv im Tumorepithel, davon zehn (29 %) schwach, 18 (53 %) mäßig und sechs (18 %) stark. Im Stroma ist die Expression in 22 Fällen (64,7 %) negativ, in fünf Fällen (14,7 %) schwach, in vier Fällen (11,8 %) mäßig und in drei Fällen (8,8 %) stark. Die endotheliale Expression ist in 20 Fällen (59 %) negativ, in elf Fällen (32 %) schwach und in drei Fällen (9 %) mäßig (s. Abb. 14).

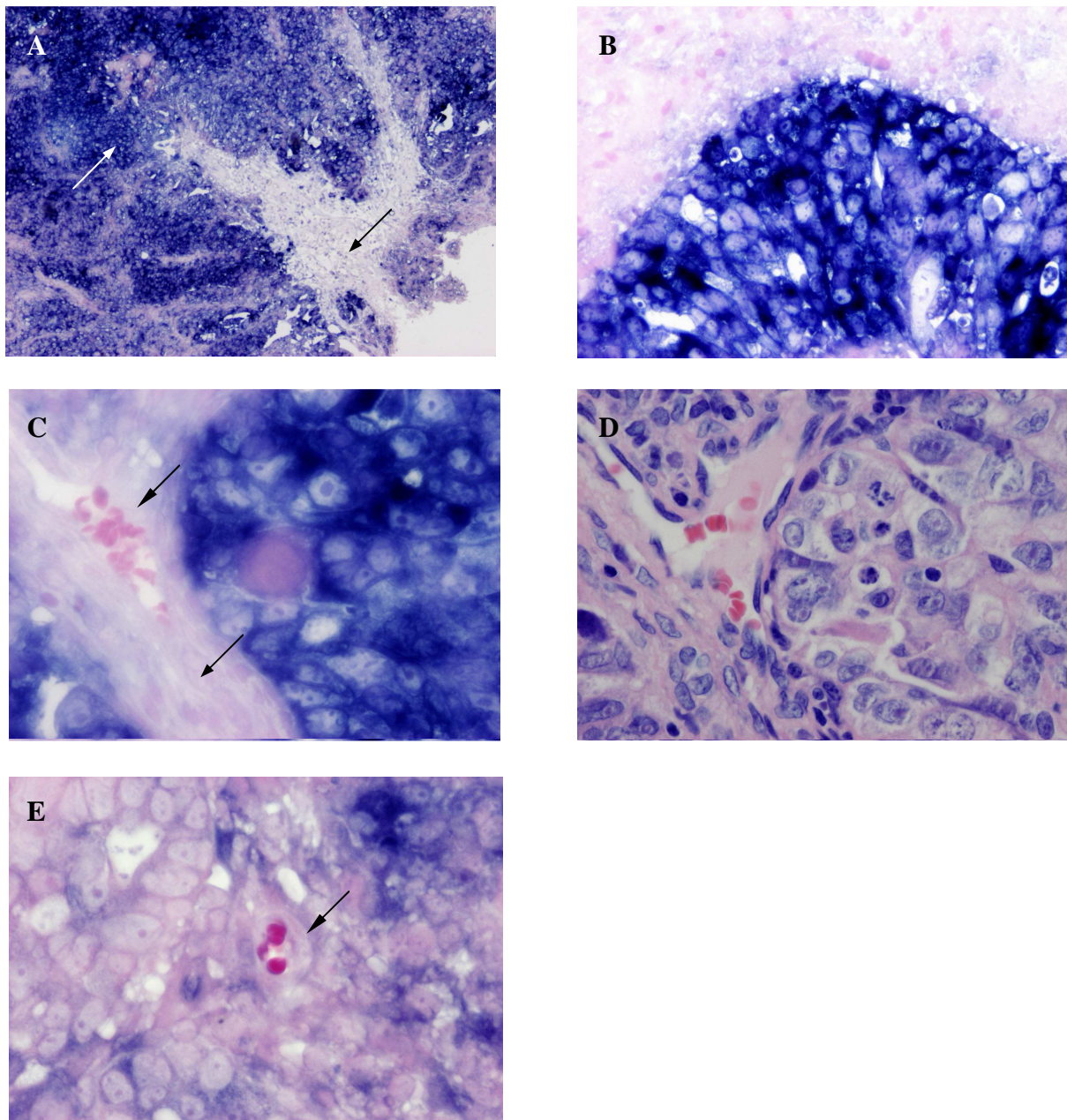


Abb. 14: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im serös-papillären Ovarialkarzinom einer 47-jährigen Frau (G3, T3c, Nx, M1): Übersicht, Antisense, 50-fache (A) und 200-fache Vergrößerung (B). Es stellen sich stark gefärbte Tumorzellen (weißer Pfeil) mit angrenzendem negativem Stroma (dünner, schwarzer Pfeil) und negativem Endothel (dicker, schwarzer Pfeil) dar, 400-fache Vergrößerung, Antisense (C) und HE-Färbung (D). In der Abbildung E ist schwach positives Endothel (Pfeil) in einem endometrioiden Ovarialkarzinom inmitten von Tumorzellen dargestellt, Antisense, 400-fache Vergrößerung (E).

#### 4.4.1.4 Thymosin $\beta$ -10-mRNA-Expression in rezidierten Ovarialkarzinomen

Ovarialkarzinomrezidive (n = 16) zeigen ein ähnliches Expressionsmuster wie primäre Ovarialkarzinome. Das Tumorepithel ist in sechs Fällen (37,5 %) schwach gefärbt, in acht Fällen (50 %) mäßig und in zwei Fällen (12,5 %) stark. Die stromale Expression ist in zwölf Ovarialkarzinomrezidiven (75 %) negativ und in vier Fällen (25 %) schwach. Die endotheliale Expression ist in fünf Ovarialkarzinomrezidiven (31 %) negativ, in neun Fällen (56 %) schwach und in zwei Fällen (13 %) mäßig (s. Abb. 14).

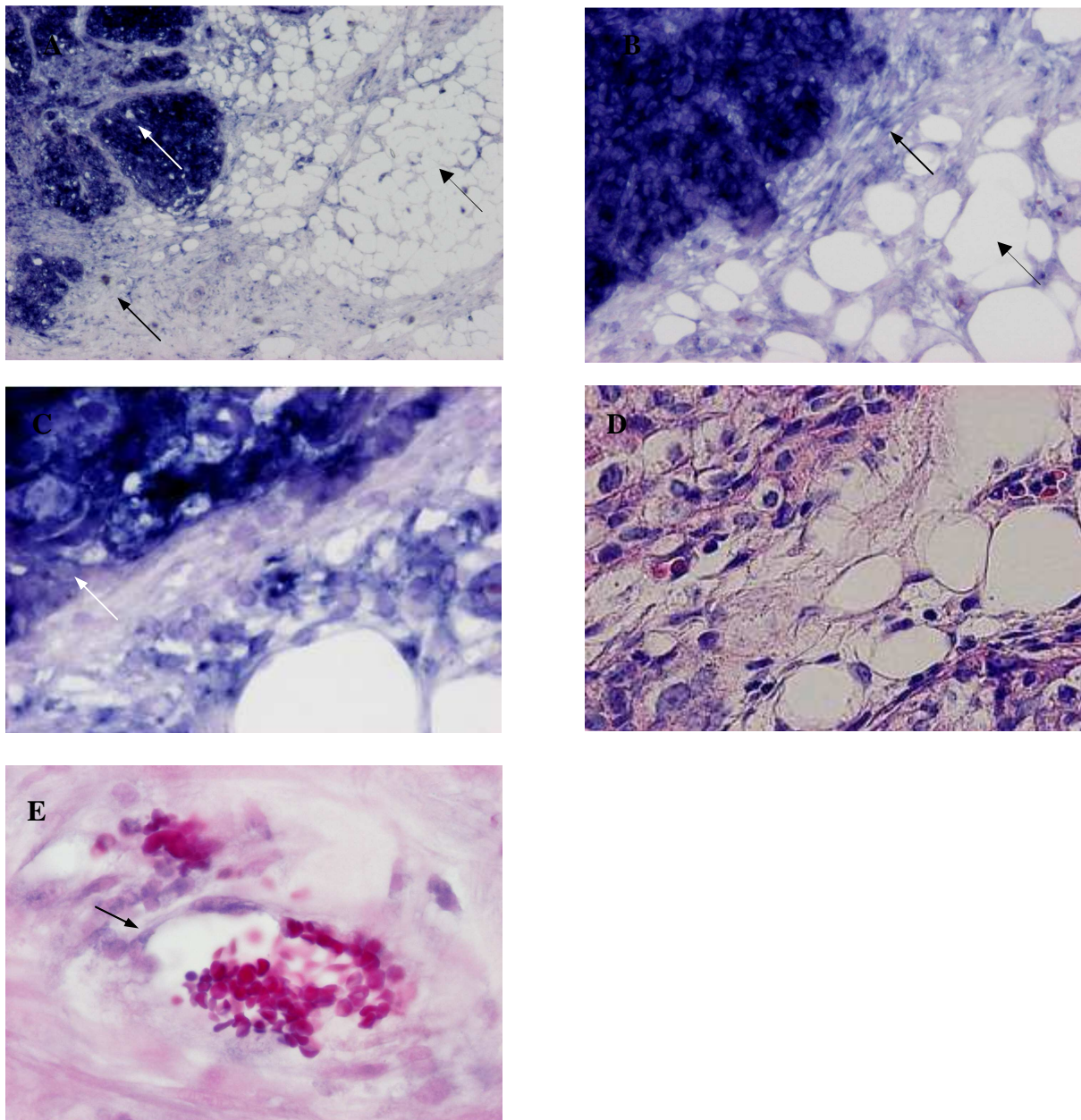


Abb. 15: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Rezidiv eines serösen Ovarialkarzinoms einer 73-jährigen Frau (Erstdiagnose mit 68 Jahren, G2, T3c, Nx, Mx): Übersicht, stark gefärbtes Tumorepithel (weiße Pfeile) mit angrenzendem negativem bis mäßig gefärbtem Stroma (schwarze, dünne Pfeile) und negativem Fettgewebe des Omentum minus (schwarze, dicke Pfeile), Antisense, 50-fache (A), 200-fache (B) und 400-fache Vergrößerung (C) und HE-Färbung (D). In Abbildung E ist eine schwache Färbung des Endothels (Pfeil) dargestellt, umgeben von negativem Stroma, Antisense, 400-fache Vergrößerung (E).

## 4.4.2 Statistische Analyse der zellulären Thymosin $\beta$ -10-Expression

### 4.4.2.1 Vergleich der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Epithel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität

Für die Unterscheidung Normalgewebe vom Ovar versus benignen Ovarialtumoren ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Epithel. Die epitheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression in Normalgeweben des Ovars bzw. in benignen Ovarialtumoren ist signifikant geringer als in primären ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,003$ ) und rezidierten Ovarialkarzinomen ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,023$ ). Für die Unterscheidung primäres versus rezidiertes Ovarialkarzinom ergibt sich keine statistische Signifikanz ( $p = 0,75$ ).

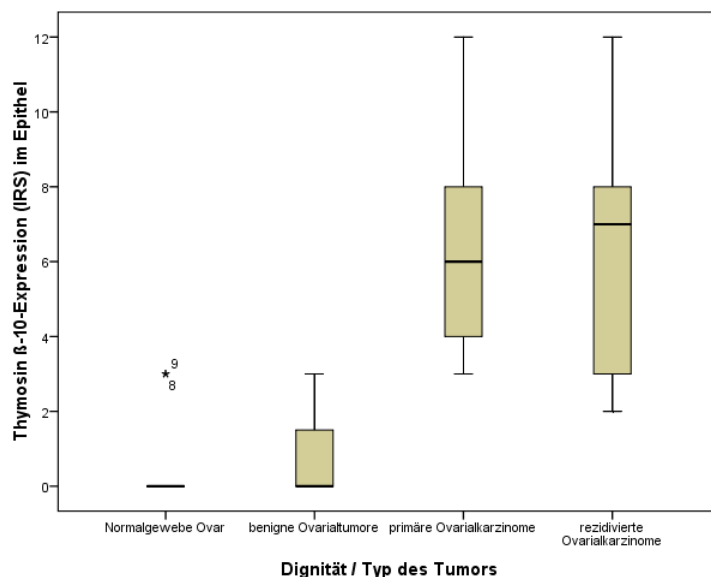


Abb. 16: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Epithel in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.

Bei maligne transformierten Epithelzellen des Ovars kommt es zu einer signifikant stärkeren Thymosin  $\beta$ -10-Expression ( $p < 0,05$ ).

IRS: 0 = keine Färbereaktion, 1-4 = schwache Färbereaktion, 5-8 = mäßige Färbereaktion, 9-12 = starke Färbereaktion

#### 4.4.2.2 Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Epithel mit klinisch-histopathologischen Parametern

Im Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Normalgeweben des Ovars, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen kommt es mit Zunahme der epithelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression zu einer signifikanten Zunahme des Auftretens großer Mengen Aszites ( $p = 0,021$ ) und zum Anstieg von CA 125 ( $p = 0,041$ ). Der Anteil der Patientinnen ohne Aszites sinkt von 100 % bei negativer Thymosin  $\beta$ -10-Expression auf unter 40 % bei starker Thymosin  $\beta$ -10-Expression, und bei starker Expression steigt der Anteil mit großer Aszitesmenge auf über 60 % an. Im Gesamtkollektiv der Patientinnen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Epithel in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom haben Ovarialkarzinome mit starker Thymosin  $\beta$ -10-Expression in den Tumorzellen signifikant ( $p = 0,015$ ; bei Ausschluss von MX ist  $p < 0,001$ ) häufiger metastasiert, als Ovarialkarzinome mit schwacher Thymosin  $\beta$ -10-Expression (s. Abb. 17). Betrachtet man Patientinnen mit rezidiertem Ovarialkarzinom, so liegt bei Zunahme der Thymosin  $\beta$ -10-Expression in den Tumorzellen signifikant häufiger makroskopische Tumorfreiheit vor ( $p = 0,010$ ). Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Thymosin  $\beta$ -10-Expression in den Tumorzellen in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose, vom präoperativen CA 125-Wert, vom Vorhandensein von Aszites, vom FIGO-Stadium, vom postoperativen Tumorrest, vom Tumorstadium pT, vom Lymphknotenstatus pN, von der Histologie, vom Differenzierungsgrad oder vom postoperativen Überleben.

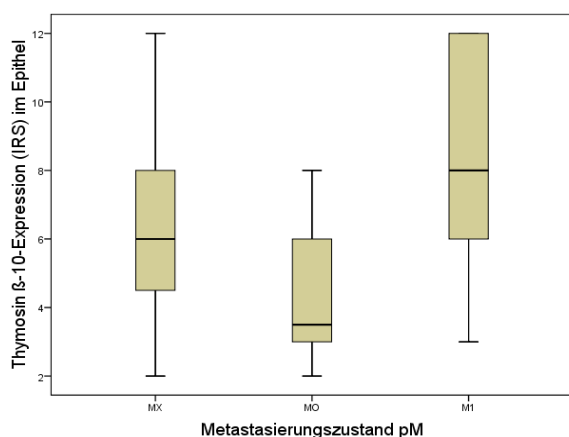


Abb. 17: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Tumorepithel in Abhängigkeit vom Metastasierungsstatus.

#### 4.4.2.3 Vergleich der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Stroma von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität

Normalgewebe vom Ovar und benigne Ovarialtumoren unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer stromalen Thymosin  $\beta$ -10-Expression. Die stromale Thymosin  $\beta$ -10-Expression von Normalgewebe des Ovars ist signifikant stärker als von primären ( $p = 0,004$ ) und rezidierten Ovarialkarzinomen ( $p < 0,001$ ). Für die Unterscheidung der Expression im Stroma benigner Ovarialtumoren versus primärer Ovarialkarzinome ergibt sich nur eine Tendenz ( $p = 0,092$ ). Benigne Ovarialtumoren zeigen aber eine signifikant ( $p = 0,008$ ) stärkere stromale Expression als rezidierte Ovarialkarzinome. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,242$ ) bei der stromalen Thymosin  $\beta$ -10-Expression zwischen primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.

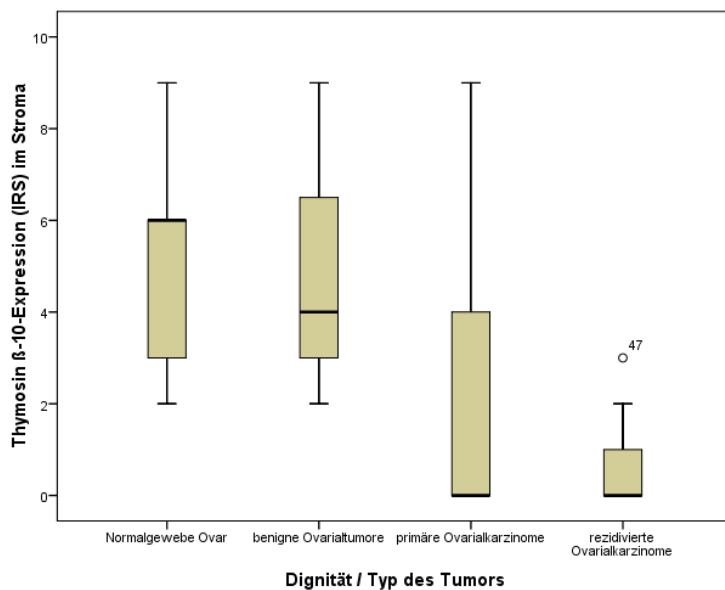


Abb. 18: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.

Im Stroma vom Normalgewebe des Ovars zeigt sich signifikant häufiger eine höhere Expression im Vergleich zum Stroma der primären und rezidierten Ovarialkarzinome ( $p < 0,05$ ).

IRS: 0 = keine Färbereaktion, 1-4 = schwache Färbereaktion, 5-8 = mäßige Färbereaktion, 9-12 = starke Färbereaktion

#### 4.4.2.4 Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Stroma mit klinisch-histopathologischen Parametern

Im Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Normalgeweben des Ovars, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen kommt es mit Abnahme der Stromaexpression signifikant ( $p = 0,02$ ) häufiger zum Vorhandensein von Aszites.

Im Gesamtkollektiv der Patientinnen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose und vom präoperativen CA 125-Wert.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom wird bei stromaler Thymosin  $\beta$ -10-Expression signifikant ( $p = 0,024$ ) häufiger makroskopisch tumorfrei operiert. Gegenüber einer fehlenden stromalen Expression besteht bei positiver Thymosin  $\beta$ -10-Expression die vierfache Chance tumorfrei operiert zu werden (OR 4,3; 95 % CI: 1-16). Dieser Zusammenhang ist auch nach der Korrektur für die Faktoren Alter bei Erstdiagnose, Histologie, Aszites, FIGO-Stadium, Differenzierungsgrad und primäres versus rezidiertes Ovarialkarzinom signifikant ( $p = 0,039$ ; OR 5,8; 95 % CI: 1-30). Weiterhin zeigen das serös-muzinöse bzw. die muzinösen Ovarialkarzinome signifikant ( $p = 0,009$ ) häufiger eine schwach bis mäßige stromale Thymosin  $\beta$ -10-Expression gegenüber den meist negativen serös-papillären oder endometroiden Ovarialkarzinomen.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom gibt es keinen signifikanten Unterschied der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose, vom präoperativen CA 125-Wert, vom Vorhandensein von Aszites, vom FIGO-Stadium, vom TNM-Stadium, vom Differenzierungsgrad oder vom postoperativen Überleben.

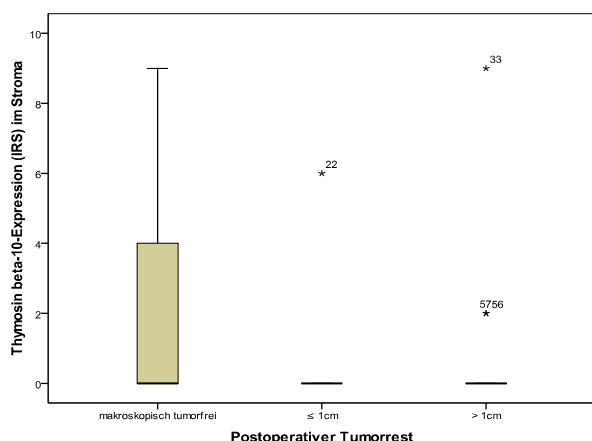


Abb. 19: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma in Abhängigkeit vom postoperativen Tumorrest.



#### 4.4.2.5 Vergleich der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Endothel verschiedener ovarialer Gewebe

Es existiert kein signifikanter Unterschied in der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel zwischen Normalgeweben vom Ovar, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.

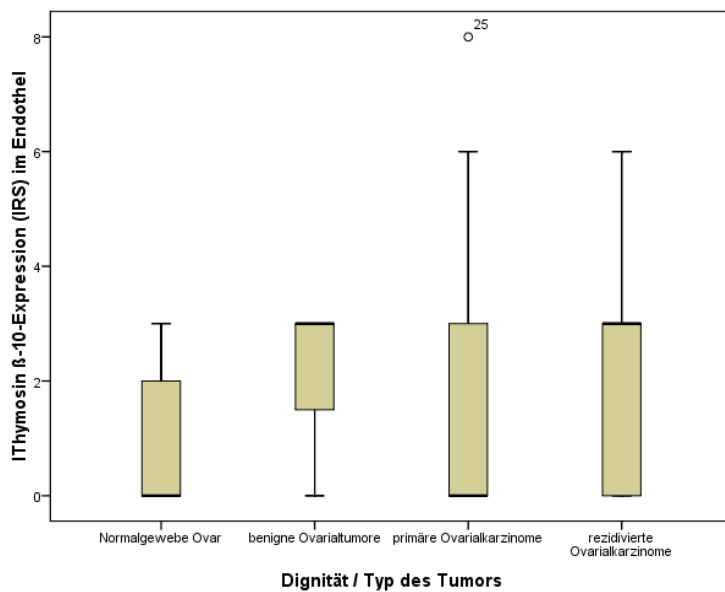


Abb. 20: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.

Es zeigt sich kein Unterschied in der Expressionshöhe in den verschiedenen Geweben.

IRS: 0 = keine Färbereaktion, 1-4 = schwache Färbereaktion, 5-8 = mäßige Färbereaktion, 9-12 = starke Färbereaktion

#### **4.4.2.6 Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Endothel mit klinisch-histopathologischen Parametern**

Im Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Normalgewebe des Ovars, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidivierten Ovarialkarzinomen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose, vom präoperativen CA 125-Wert und vom Vorhandensein von Aszites.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom ist der Zusammenhang mäßige endotheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression und fortgeschrittenes Stadium III oder IV bzw. schwach bis negative endotheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression und frühes FIGO-Stadium I oder II signifikant ( $p = 0,036$ ). Auch kommt es bei Zunahme der endothelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression signifikant ( $p = 0,005$  bei Ausschluss von MX) häufiger zum Auftreten von Metastasen. Eine negative bis schwache Expression tritt sowohl bei metastasierten Ovarialkarzinomen als auch bei Ovarialkarzinomen ohne Nachweis von Metastasen auf, während eine mäßige endotheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression immer mit metastasierenden Ovarialkarzinomen assoziiert ist.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom gibt es keinen signifikanten Unterschied der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose, vom präoperativen CA 125-Wert, vom postoperativen Tumorrest, vom Vorhandensein von Aszites, vom Tumorstadium pT, vom Lymphknotenstatus pN, von der Histologie, vom Differenzierungsgrad oder vom Überleben.

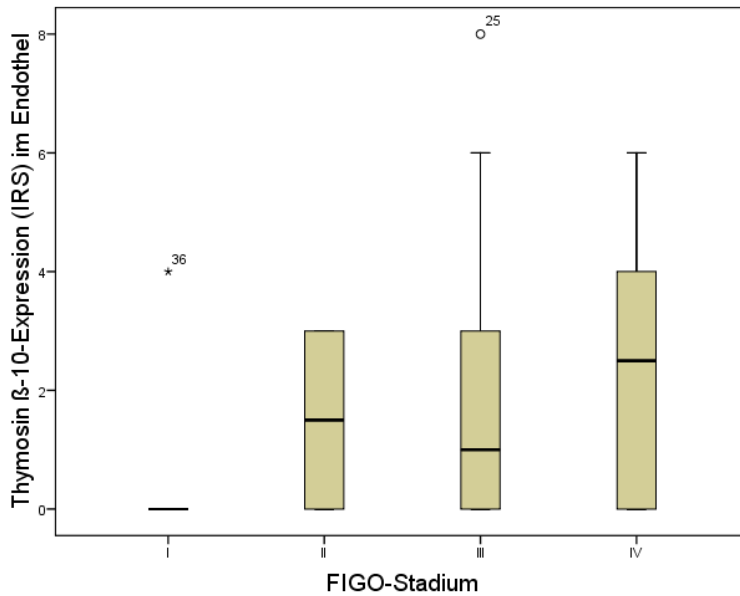


Abb. 21: Endotheliale Thymosin  $\beta$ -10 Expression in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium.

Der Zusammenhang mäßige endotheliale SPARC-Expression und fortgeschrittenes Stadium III oder IV bzw. schwach bis negative endotheliale SPARC-Expression und frühes FIGO-Stadium I oder II ist signifikant ( $p = 0,036$ ).

IRS: 0 = keine Färbereaktion, 1-4 = schwache Färbereaktion, 5-8 = mäßige Färbereaktion, 9-12 = starke Färbereaktion

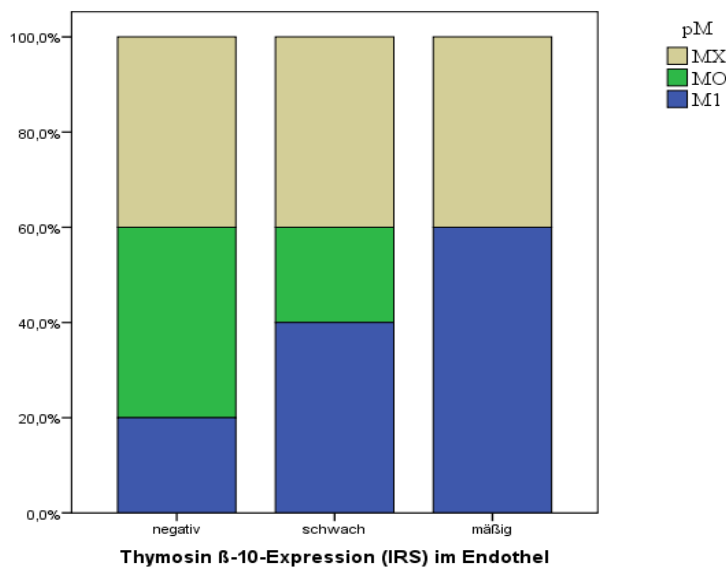


Abb. 22: Metastasierungsstatus in Abhängigkeit von der endothelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression.

Eine negative bis schwache Expression tritt sowohl bei metastasierten Ovarialkarzinomen als auch bei Ovarialkarzinomen ohne Nachweis von Metastasen auf, während eine mäßige endotheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression immer mit einem metastasierenden Ovarialkarzinom assoziiert ist. Bei Ausschluß von MX kommt es bei Zunahme der endothelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression signifikant häufiger zum Auftreten von Metastasen ( $p = 0,005$ ).

IRS: 0 = keine Färbereaktion, 1-4 = schwache Färbereaktion, 5-8 = mäßige Färbereaktion, 9-12 = starke Färbereaktion

### 4.4.3 Deskriptive Charakterisierung der SPARC-mRNA-Expression in Ovargewebe unterschiedlicher Dignität

#### 4.4.3.1 SPARC-mRNA-Expression in Normalgeweben des Ovars

SPARC wird in prämenopausalen Ovarien hauptsächlich in den Granulosa- und Luteinzellen der Follikel exprimiert, mit geringen Leveln in den Granulosazellen und den höchsten Leveln in den Lutealzellen des Corpus luteum. Fünf Fälle (56 %) zeigen eine schwache Färbung des Oberflächenepithels, vier (44 %) sind negativ. In fünf Fällen (ca. 55 %) ist die stromale Expression schwach, in zwei Fällen (22 %) mäßig, in einem Fall stark und in einer Probe negativ. Vom Stroma wird SPARC v. a. von der an das Oberflächenepithel angrenzenden Tunica albuginea synthetisiert. In kleineren Gefäßen ist die endotheliale Expression in sieben Fällen (78 %) schwach und bei je einem Fall stark bzw. negativ (s. Abb. 23).

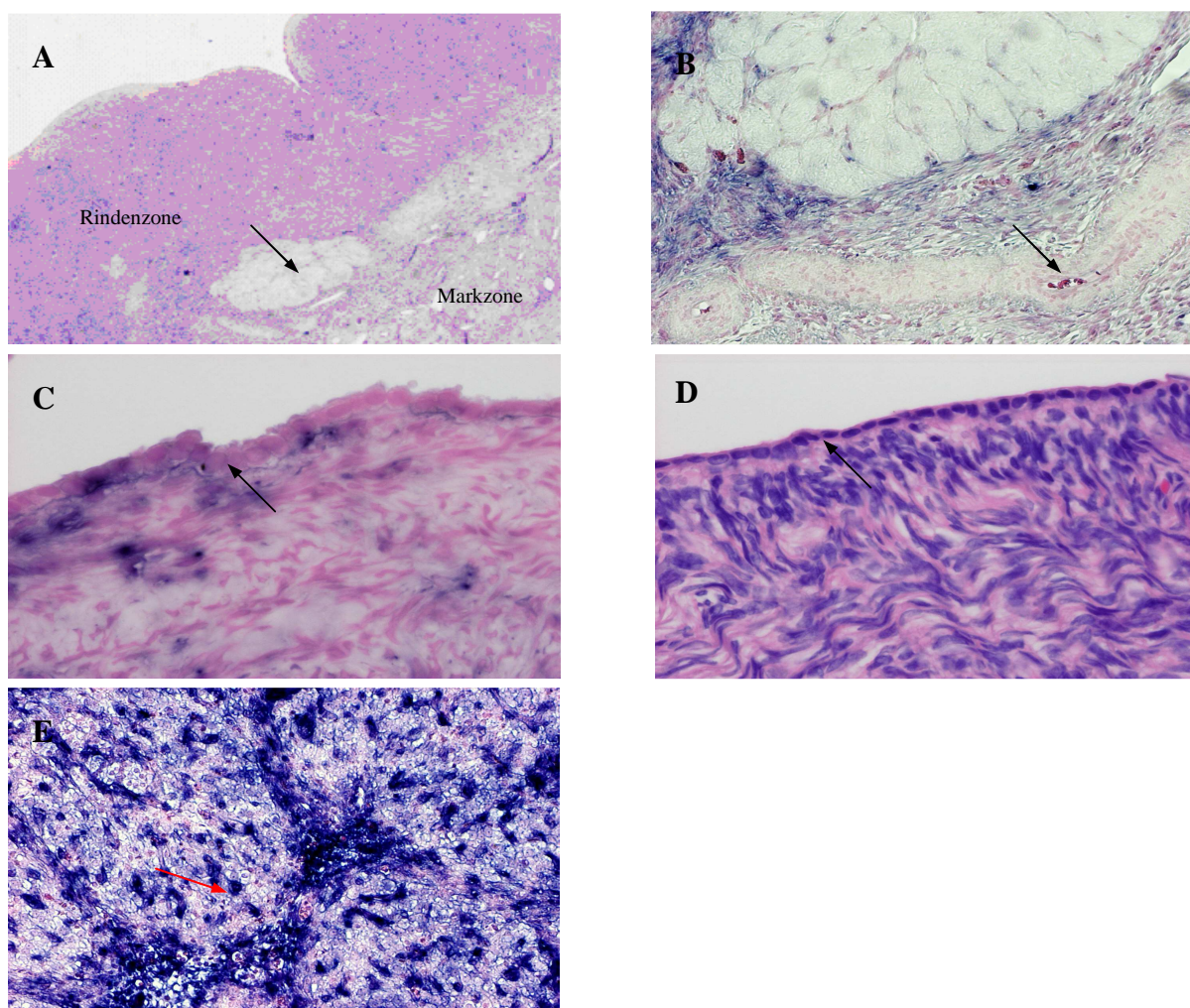


Abb. 23: SPARC-Expression im Normalovar einer 63-jährigen Frau (A-D): Übersicht mit bindegewebigem Corpus albicans (Pfeil), Antisense, 50-fache Vergrößerung (A), mit Corpus albicans und schwacher SPARC-Expression im Endothel (Pfeil), Antisense, 100-fache Vergrößerung (B), im Oberflächenepithel (Pfeile) mit angrenzendem Stroma, Antisense, 400-fache Vergrößerung (C) und HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung (D). Die Abbildung E zeigt Granulosaluteinzellen (roter Pfeil) im Corpus luteum einer 42-jährigen Frau in 400-facher Vergrößerung, Antisense.

#### 4.4.3.2 SPARC-mRNA-Expression in benignen Ovarialtumoren

Das benigne Tumorepithel ist in zwei Fällen (67 %) negativ in einem Fall schwach positiv. ein Tumor zeigt eine schwache und zwei Tumore (66 %) eine starke stromale SPARC-Expression, dabei v. a. von an die Tumorzellen angrenzenden Fibroblasten. Im Endothel wird SPARC in einem Fall schwach, mäßig bzw. stark exprimiert (s. Abb. 24).

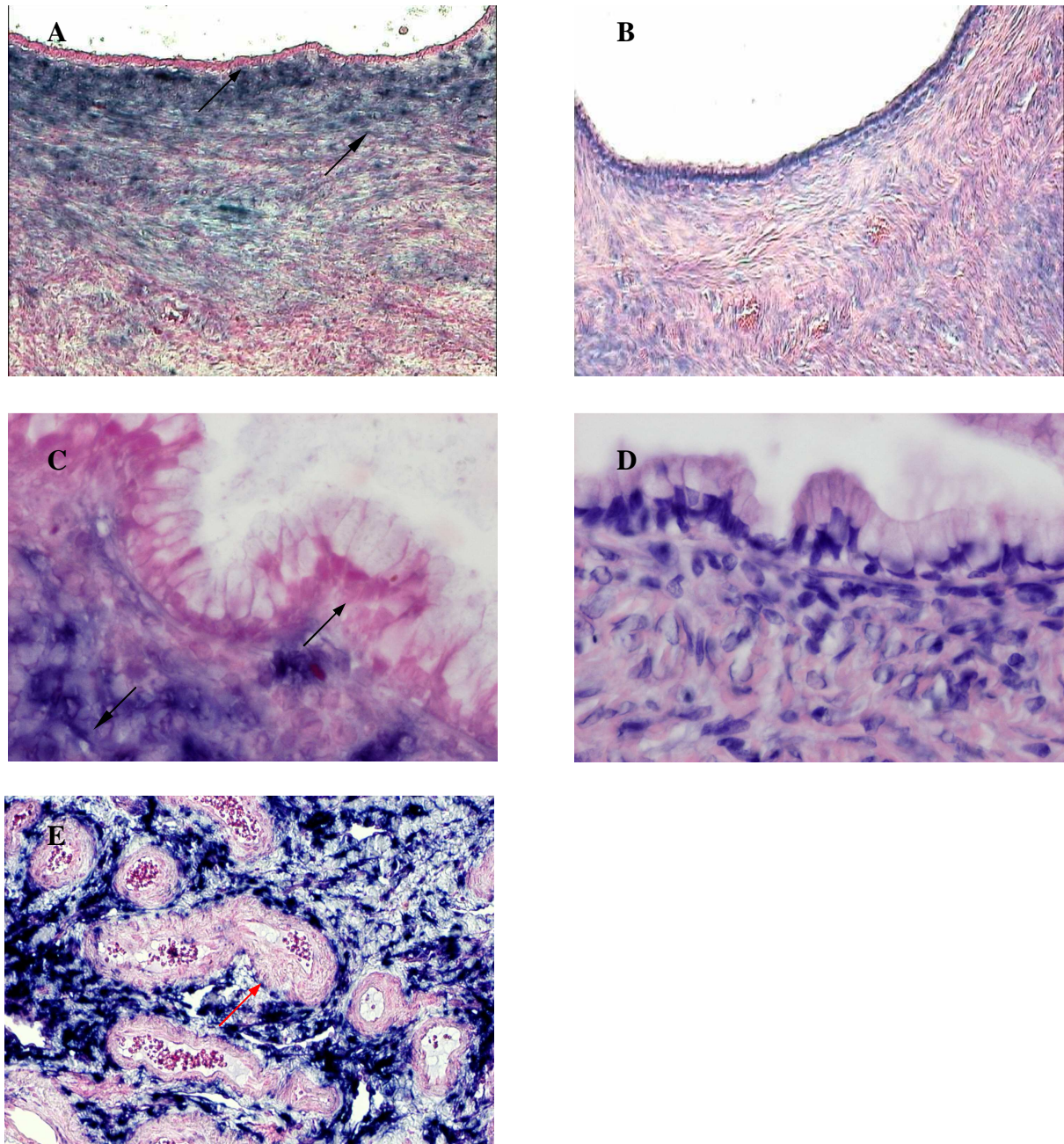


Abb. 24: SPARC-Expression im muzinösen Zystadenofibrom einer 73-jährigen Frau: Übersicht, Antisense, 100-fache Vergrößerung (A) und HE-Färbung (B). Das Epithel ist negativ (dünner Pfeil), das angrenzende Stroma (dicker Pfeil) positiv. Zystenepithel (dünner Pfeil) mit angrenzendem Stroma (dicker Pfeil), 400-fache Vergrößerung, Antisense (C) und HE-Färbung (D). Die Abbildung E zeigt eine schwache SPARC-Expression in Kapillaren (roter Pfeil) eines serösen Zystadenoms umgeben von einer starken stromalen SPARC-Expression, Antisense, 100-fache Vergrößerung.

#### 4.4.3.3 SPARC-mRNA-Expression in primären Ovarialkarzinomen

Bei den primären Ovarialkarzinomen zeigen 26 Fälle (77 %) keine Färbung und acht Ovarialkarzinome (23 %) eine schwache Färbung der Tumorzellen. Die stromale SPARC-Expression ist in allen (n = 34) untersuchten Fällen positiv, mit besonders intensiver Reaktion des an die Tumorzellen angrenzenden Stromas bzw. in durch Tumorzellen isolierten Stromainseln. Tumorproben, die kein Stroma enthalten, sind durchweg negativ. 17 Fälle (50 %) weisen eine starke, 13 Fälle (38 %) eine mäßige und vier Fälle eine schwache Färbung des Tumorstromas auf. Das Endothel kleinerer Gefäße zeigt in 16 Fällen (47 %) eine starke, elf Fällen (32 %) eine schwache, sechs Fällen eine mäßige und in einem Fall keine Färbung des Endothels (s. Abb. 25).

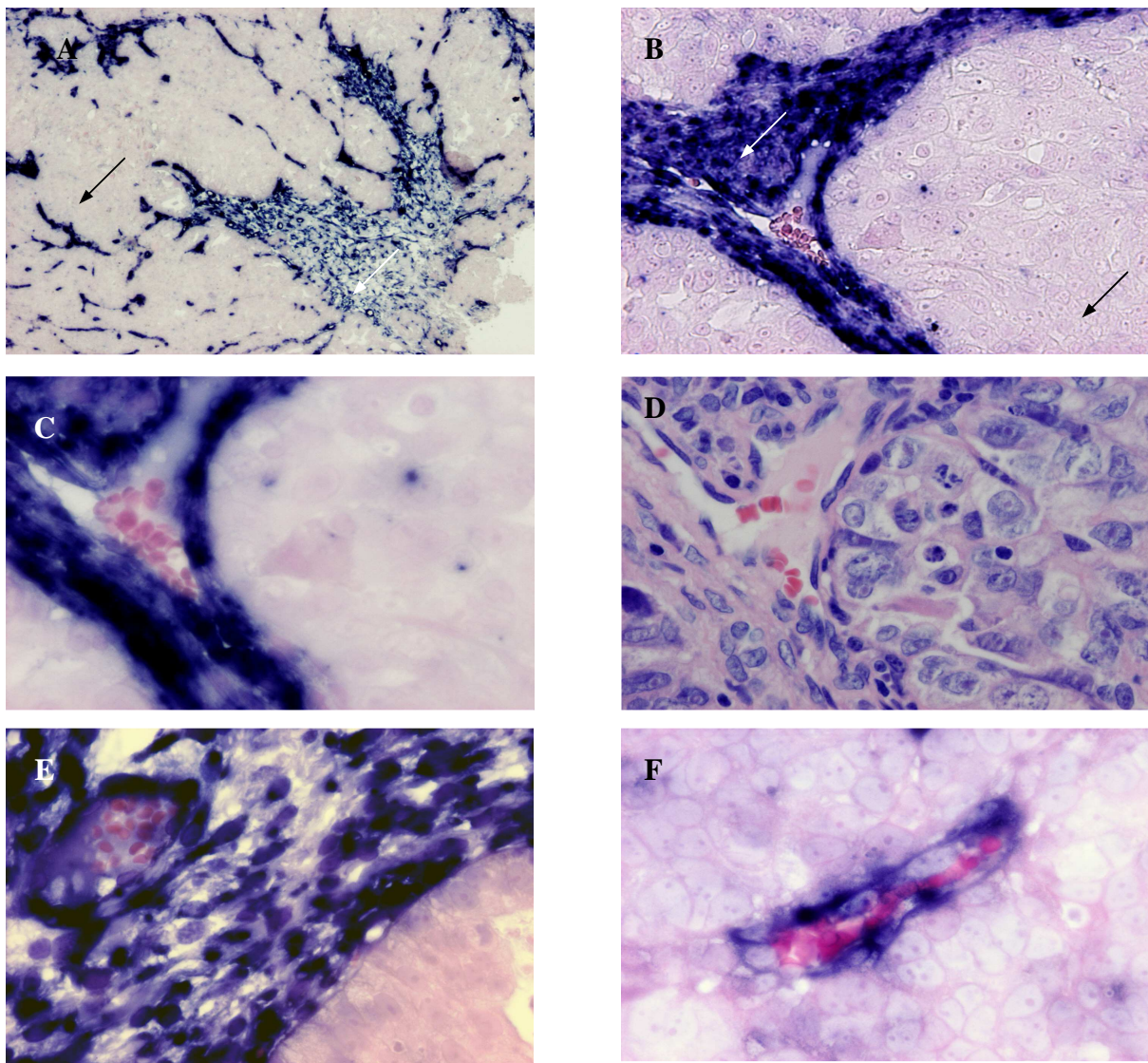


Abb. 25 A-D.: SPARC-Expression im serös-papillären Ovarialkarzinom einer 47-jährigen Frau (G3, T3c, Nx, M1): Übersicht, Antisense, 50-fache (A) und 200-fache Vergrößerung mit negativem Tumorepithel (schwarze Pfeile) und angrenzendem stark gefärbtem Stroma (weiße Pfeile) (B), 400-fache Vergrößerung, Antisense (C) und HE-Färbung (D). Die Abbildungen E und F zeigen eine starke Expression in einer Kapillare eines endometrioiden Ovarialkarzinoms (G3) umgeben von SPARC-positivem Stroma, Antisense, 400-fache Vergrößerung (E), und umgeben von SPARC-negativen Tumorzellen, Antisense, 400-fache Vergrößerung (F)

#### 4.4.3.4 SPARC-mRNA-Expression in rezidierten Ovarialkarzinomen

Ovarialkarzinomrezidive (n = 16) zeigen das gleiche Expressionsmuster wie primäre Ovarialkarzinome. Es exprimieren 14 Fälle (88 %) kein und zwei Fälle (12 %) schwach SPARC in den Tumorzellen. Im Stroma weisen 13 Proben eine starke (81 %) zwei Fälle eine mäßige und eine Probe eine schwache stromale SPARC-Expression. Ovarialkarzinomrezidive zeigen in den Fibroblasten des Stromas sogar noch signifikant häufiger eine intensive Färbung als primäre Ovarialkarzinome. Das Endothel ist in zehn Fällen (62,5 %) stark, in fünf Fällen schwach und in einem Fall mäßig gefärbt (s. Abb. 26).

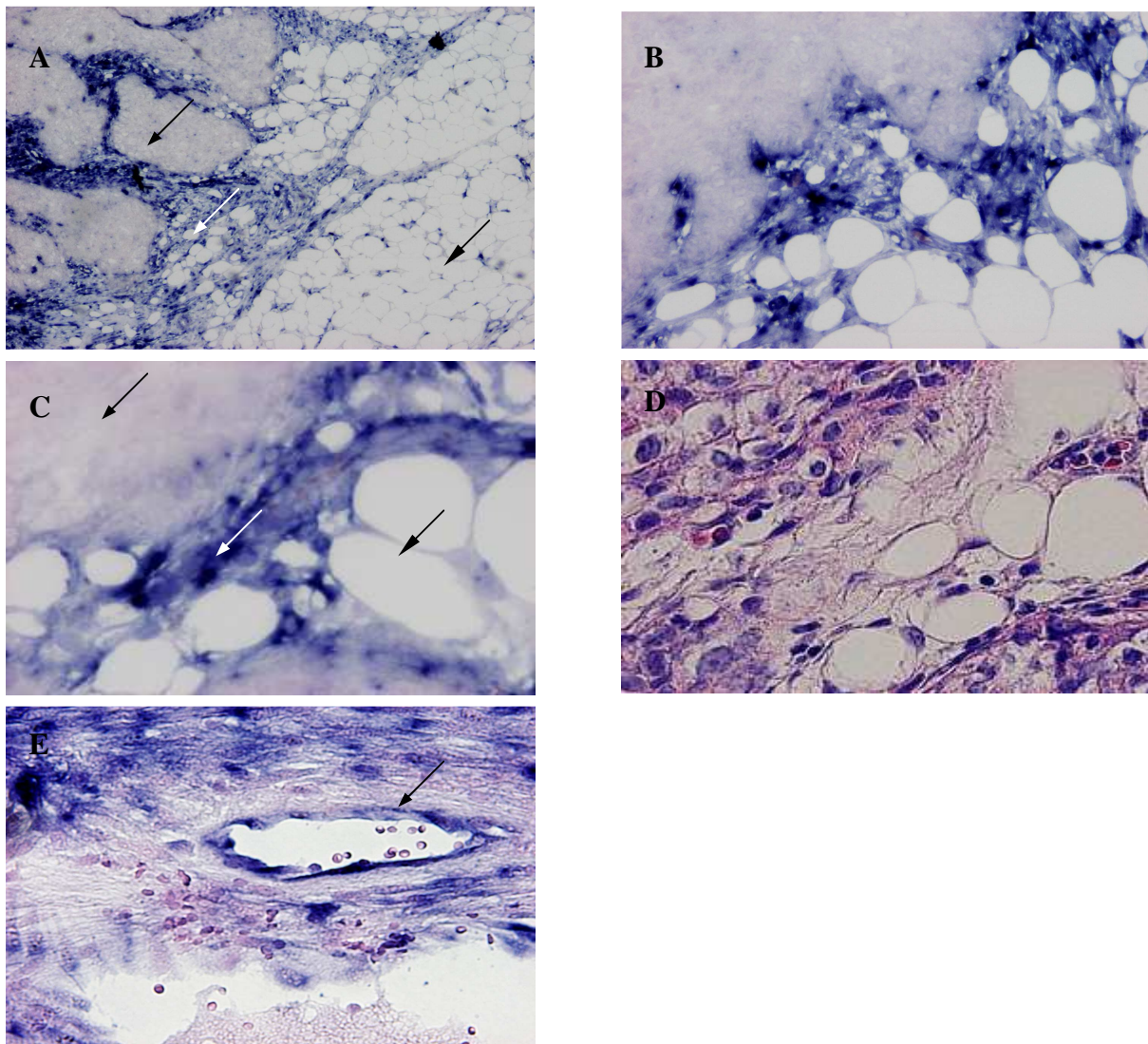


Abb. 26: SPARC-Expression im Rezidiv (A-D) eines serösen Ovarialkarzinoms einer 73-jährigen Frau (Erstdiagnose mit 68 Jahren, Grading 2, T 3c, Nx, Mx, FIGO-Stadium IIIc, > 500 ml Aszites, CA 125 präoperativ 1184 IE/ml): Übersicht, Antisense, 50-fache (A) und 200-fache Vergrößerung, Tumorepithel mit angrenzendem Stroma und Fettgewebe des Omentum minus (B), 400-fache Vergrößerung, Antisense (C) und HE-Färbung (D). Es zeigen sich im Ovarialkarzinomezidiv eine starke Färbung des Stromas (weiße Pfeile), während Tumorzellen (dünne, schwarze Pfeile) und Fettzellen (dicke, schwarze Pfeile) negativ für das SPARC-Transkript sind. Die Abbildung E zeigt eine starke Expression in einer Venole (Pfeil) in einem Rezidiv eines serös-papillären Ovarialkarzinoms (G2) umgeben von Stroma, Antisense, 200-fache Vergrößerung.

#### 4.4.4 Statistische Analyse der zellulären SPARC-Expression

##### 4.4.4.1 Vergleich der SPARC-Expression im Epithel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität

Es zeigt sich statistisch kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der SPARC-Expression im Epithel von Normalgeweben des Ovars, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.

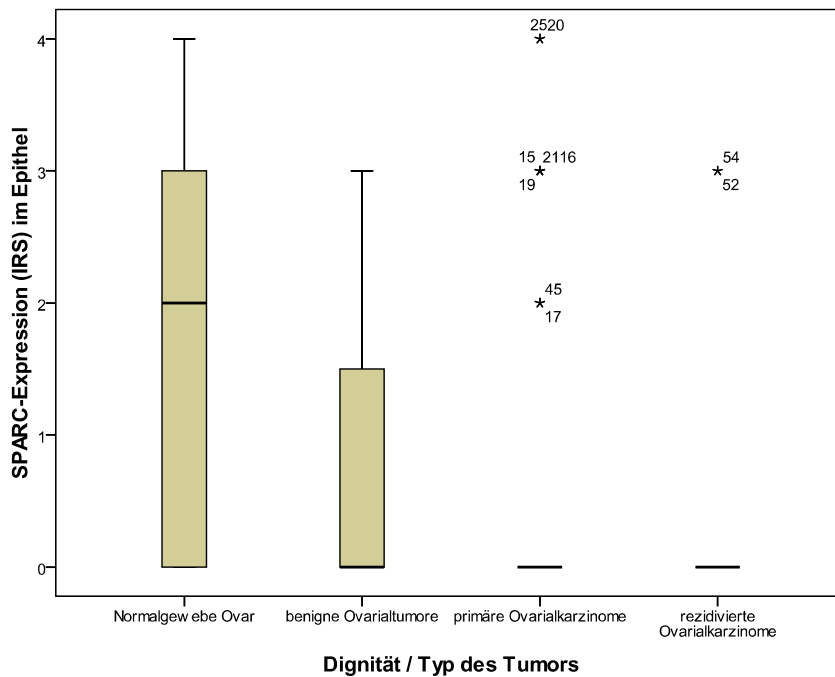


Abb. 27: SPARC-Expression im Epithel in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.

Es zeigt sich statistisch kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Epithelfärbung von Normalgewebe des Ovars, benignen Tumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.

IRS: 0 = keine Färbereaktion, 1-4 = schwache Färbereaktion, 5-8 = mäßige Färbereaktion, 9-12 = starke Färbereaktion



#### 4.4.4.2 Korrelation der SPARC-Expression im Epithel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität mit klinisch-histopathologischen Parametern

Im Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Normalgeweben, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge der SPARC-Expression im Epithel mit dem Alter bei Erstdiagnose, dem präoperativen CA 125-Wert und Aszites.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom kommt es bei Zunahme der SPARC-Expression im Epithel zur signifikanten Zunahme des Auftretens und des Volumens von Aszites ( $p = 0,023$ ). Eine negative epitheliale SPARC-Expression ist in 50 % der Fälle mit Aszites assoziiert, davon wiederum 50 % mit  $\leq 500$  ml und 50 %  $> 500$  ml. Eine schwache Expression ist dagegen in 80 % der Fälle mit Aszites assoziiert, davon 87,5 % mit Aszites  $> 500$  ml und 12,5 % mit Aszites  $\leq 500$  ml.

Weiterhin zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,013$ ) in Abhängigkeit vom Tumorstadium pT. Eine negative Epithelexpression von SPARC ist mit allen Tumorstadien pT1-T3 assoziiert, während eine schwache epitheliale SPARC-Expression immer mit einem Stadium pT3 assoziiert ist.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom gibt es keinen signifikanten Unterschied der SPARC-Expression im Epithel in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose, vom präoperativen CA 125-Wert, vom Lymphknotenstatus pN, vom Metastasierungszustand pM, vom FIGO-Stadium, vom postoperativen Tumorrest von der Histologie, vom Differenzierungsgrad oder vom Überleben.

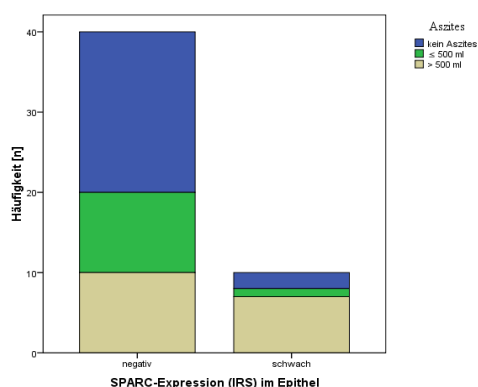


Abb. 28: Aszites in Abhängigkeit von der epithelialen SPARC-Expression bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom.

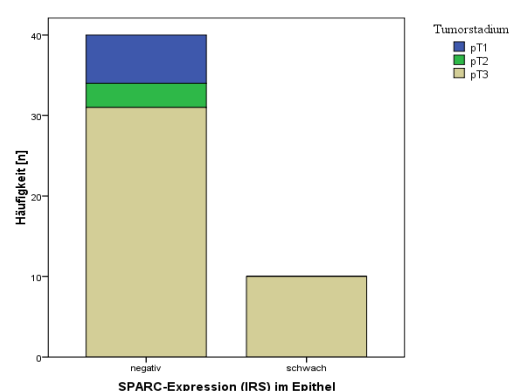


Abb. 29: Tumorstadium pT in Abhängigkeit von der epithelialen SPARC-Expression bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom.

#### 4.4.4.3 Vergleich der SPARC-Expression im Stroma von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität

Normalgewebe zeigen gegenüber primären Ovarialkarzinomen ( $p < 0,001$ ) und Ovarialkarzinomrezidiven ( $p < 0,001$ ) eine signifikant geringere SPARC-Expression im Stroma. Weiterhin weisen 81 % der rezidierten versus 50 % der primären Ovarialkarzinome eine starke stromale SPARC-Expression auf. Dieser Unterschied ist signifikant ( $p = 0,027$ ).

Es existieren keine signifikanten Unterschiede in der stromalen SPARC-Expression zwischen Normalgewebe und benignem Gewebe und zwischen benignen Tumoren und primären oder rezidierten Ovarialkarzinomen.

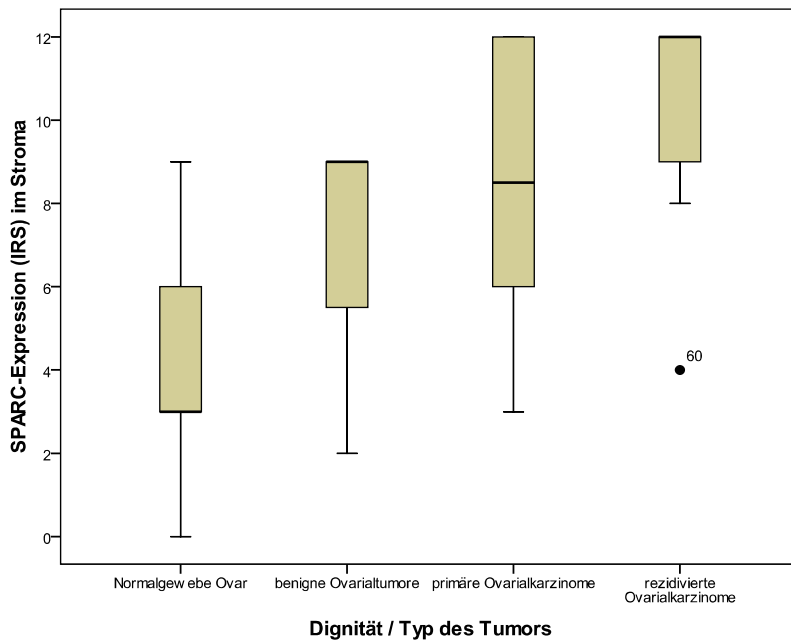


Abb. 30: SPARC-Expression im Stroma in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.

Es zeigt sich eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Zunahme der stromalen SPARC-Expression in Ovarialkarzinomen gegenüber Normalgewebe des Ovars, und signifikant ( $p = 0,027$ ) häufiger eine intensive Färbung im Stroma der Ovarialkarzinomrezidive gegenüber dem Stroma von primären Ovarialkarzinomen.

IRS: 0 = keine Färbereaktion, 1-4 = schwache Färbereaktion, 5-8 = mäßige Färbereaktion, 9-12 = starke Färbereaktion

#### 4.4.4.4 Korrelation der SPARC-Expression im Stroma von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität mit klinisch-histopathologischen Parametern

Im Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Normalgewebe, benignen Tumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen kommt es mit zunehmender stromaler SPARC-Expression signifikant ( $p = 0,032$ ) häufiger zur Ausprägung von Aszites und häufiger zu großen Mengen Aszites. Im Gesamtkollektiv gibt es keine signifikanten Zusammenhänge der SPARC-Expression im Stroma mit dem Alter bei Erstdiagnose und dem präoperativen CA 125-Wert.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom besteht bei schwach bis mäßiger SPARC-Expression eine dreifach erhöhte Chance tumorfrei operiert zu werden gegenüber Patientinnen mit starker stromaler SPARC-Expression (OR 3,3; 95 % CI: 0,73 - 14,79). Dieser Zusammenhang ist nach Korrektur für die übrigen histopathologischen Faktoren nicht signifikant. Weiterhin kommt es mit zunehmender stromaler SPARC-Expression zum signifikanten ( $p = 0,049$ ) Anstieg von CA 125. Der Median von CA 125 bei schwacher stromaler Expression liegt bei 248 U/ml (Range 18 - 8081), der Median bei mäßiger Expression bei 145 U/ml (Range 30 - 1536) und der Median bei starker stromaler Expression bei 784 U/ml (Range 4 - 4049).

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom gibt es keinen signifikanten Unterschied der SPARC-Expression im Stroma in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose, vom Aszites vom TNM-Stadium, vom FIGO-Stadium, von der Histologie, vom Differenzierungsgrad oder vom Überleben.

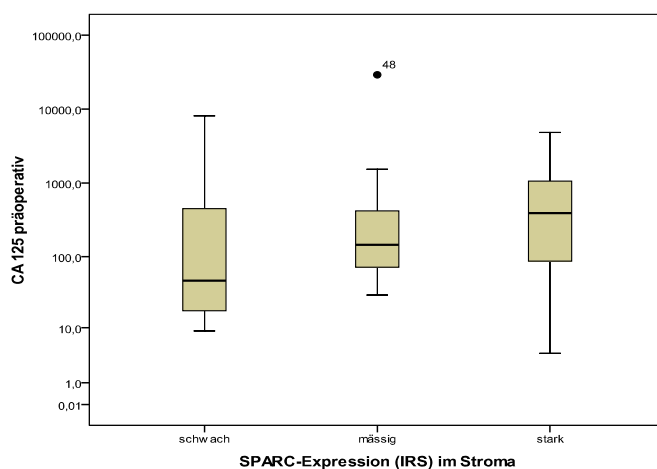


Abb. 31: Präoperativer CA 125-Wert in Abhängigkeit von der stromalen SPARC-Expression bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom.

#### 4.4.4.5 Vergleich der SPARC-Expression im Endothel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität

Normalgewebe vom Ovar zeigen gegenüber primären Ovarialkarzinomen ( $p = 0,002$ ) und Ovarialkarzinomrezidiven ( $p = 0,002$ ) eine signifikant geringere Expression im Endothel. Es existieren keine signifikanten Unterschiede in der endothelialen SPARC-Expression zwischen Normalgewebe und benignem Gewebe und zwischen benignen Tumoren und primären oder rezidierten Ovarialkarzinomen, und zwischen primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.

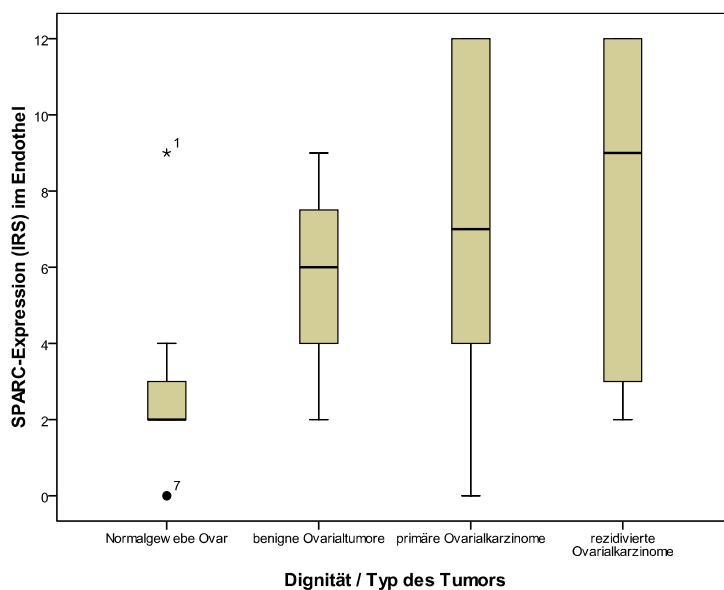


Abb. 32: SPARC-Expression im Endothel in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.

Es zeigt sich im normalen Ovargewebes eine meist geringe endotheliale SPARC-Expression und eine signifikant ( $p = 0,002$ ) stärkere Expression in primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.

IRS: 0 = keine Färbereaktion, 1-4 = schwache Färbereaktion, 5-8 = mäßige Färbereaktion, 9-12 = starke Färbereaktion.

#### **4.4.4.6 Korrelation der SPARC-Expression im Endothel von Ovargewebe unterschiedlicher Dignität mit klinisch-histopathologischen Parametern**

Im Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Normalgewebe vom Ovar, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen kommt es mit zunehmender endothelialer SPARC-Expression signifikant ( $p = 0,038$ ) häufiger zum Auftreten und zu häufiger großen Menge Aszites.

Im Gesamtkollektiv gibt es keine signifikanten Zusammenhänge der SPARC-Expression im Endothel mit dem Alter bei Erstdiagnose und dem präoperativen CA 125-Wert.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom zeigt sich ein Unterschied bei der SPARC-Expression im Endothel in den verschiedenen FIGO-Stadien. Werden die Stadien I und II wegen der kleinen Fallzahl zusammengefasst wird der Zusammenhang niedrige SPARC-Expression und frühes FIGO-Stadium bzw. hohe Expression und fortgeschrittenes Stadium III oder IV signifikant ( $p = 0,003$ ). Weiterhin kommt es mit zunehmender SPARC-Expression im Endothel zu einer signifikanten ( $p = 0,014$ ) Zunahme an entdifferenzierten Ovarialkarzinomen. Es existiert ein in der Signifikanzschwelle liegender Zusammenhang ( $p = 0,050$ ) zwischen dem Tumorstadium pT und der endothelialen SPARC-Expression, mit Zunahme der SPARC-Expression im Endothel kommt es häufiger zum Vorhandensein eines fortgeschrittenen Tumorstadiums.

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom gibt es keinen signifikanten Unterschied der SPARC-Expression im Endothel in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose, vom präoperativen CA 125-Wert, vom Aszites, vom postoperativen Tumorrest, vom Lymphknotenstatus pN, vom Metastasierungszustand pM, von der Histologie und vom Überleben.

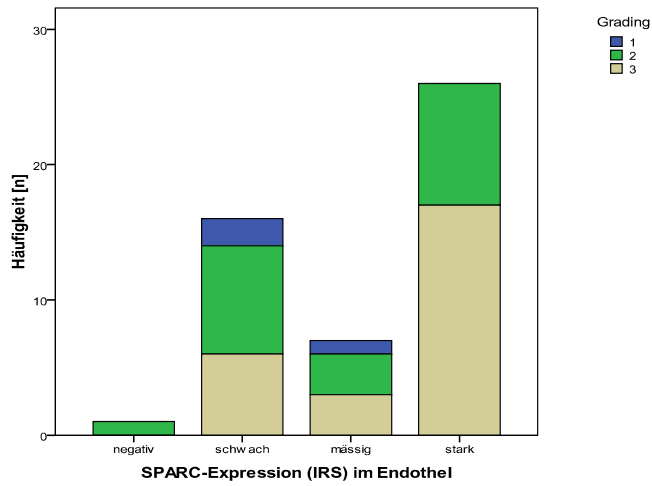


Abb. 33: Differenzierungsgrad in Abhängigkeit von der endothelialen SPARC-Expression.

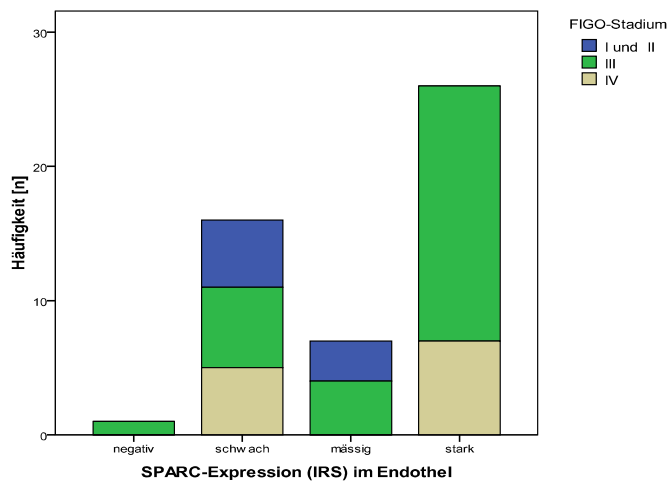


Abb. 34: FIGO-Stadium in Abhängigkeit von der endothelialen SPARC-Expression.

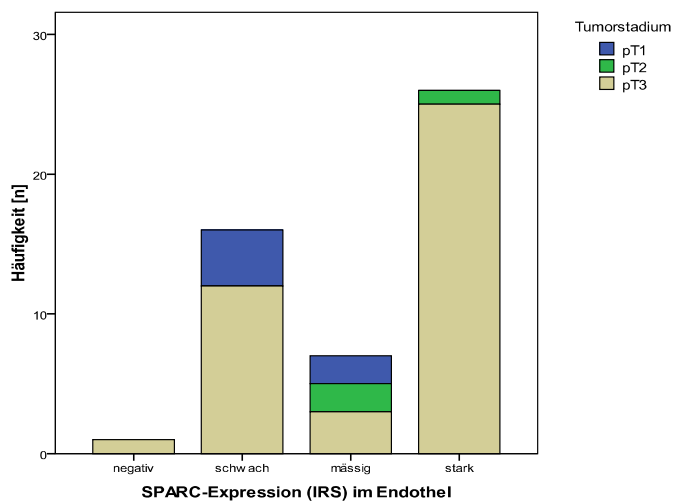


Abb. 35: Tumorstadium pT in Abhängigkeit von der endothelialen SPARC-Expression.

#### 4.5 Statistische Auswertung von Nachbeobachtungszeit und postoperativem Überleben

##### Nachbeobachtungszeit

Insgesamt wurden 48 von 50 Patientinnen mit Ovarialkarzinom (96 %) in die Nachbeobachtungszeit aufgenommen. Bei zwei Patientinnen war kein Follow up möglich (lost of follow up), diese konnten bei den Überlebensanalysen nicht berücksichtigt werden. Die mediane Nachbeobachtungszeit der Patientinnen mit einem primären Ovarialkarzinom betrug 29,7 Monate (Range 0,3 - 144,9 Monate) und die der Patientinnen mit einem rezidierten Ovarialkarzinom 61,2 Monate (Range 20,2 - 139,1 Monate). Innerhalb der Nachbeobachtungszeit verstarben 31 Patientinnen am primären oder rezidierten Ovarialkarzinom, das entspricht 65 % aller Patientinnen. Es verstarben 16 Patientinnen mit einem primären Ovarialkarzinom (47 % aller Patientinnen mit einem primären Ovarialkarzinom) und 15 Patientinnen mit einem rezidierten Ovarialkarzinom (94 % aller Patientinnen mit einem Ovarialkarzinomrezidiv).

##### Postoperatives Überleben

Das postoperative Überleben für Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom ( $n = 32$ ), liegt im Median bei 44,3 Monaten (95 % CI: 20,8 - 67,7 Monate) und für Patientinnen mit rezidiertem Ovarialkarzinom ( $n = 16$ ) bei 61,1 Monaten (95 % CI: 55 - 67,1 Monate). Es gibt keinen signifikanten Unterschied im medianen postoperativen Überleben zwischen den Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom und Patientinnen mit Ovarialkarzinomrezidiv ( $p = 0,745$ ).

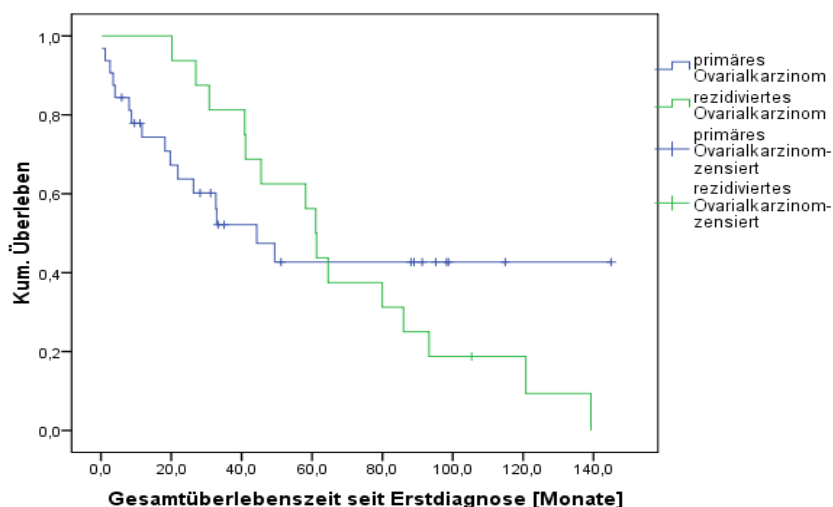


Abb. 36: Gesamtüberleben der Patientinnen mit primärem ( $n = 32$ ) versus rezidiertem Ovarialkarzinom ( $n = 16$ ).

#### **4.5.1 Univariate Analyse zum Einfluss von Prognosefaktoren auf das postoperative Überleben**

In die univariate Analyse werden alle klinisch-histopathologischen Faktoren und die mittels RNA-in-situ-Hybridisierung ermittelte Thymosin  $\beta$ -10- (s. Kap. 4.4.1) bzw. SPARC-Expression (s. Kap. 4.4.3) im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom untersucht (s. Tab. 8). Folgende Faktoren zeigen univariat einen signifikanten Einfluss auf das postoperative Überleben und werden im Anschluß detailliert beschrieben:

FIGO-Stadium, postoperativer Tumorstadium pT, Metastasierungszustand pM und präoperativer CA 125-Wert.

Es zeigt sich univariat kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Thymosin  $\beta$ -10- bzw. SPARC-Expression im Epithel, Stroma und Endothel, dem Alter bei Erstdiagnose, dem Lymphknotenstatus pN, der Histologie, dem Differenzierungsgrad und dem postoperativen Überleben.

#### **Korrelation von FIGO-Stadium und postoperativem Überleben**

Von den 31 Patientinnen, die am Ovarialkarzinom starben, war eine Patientin im FIGO-Stadium I, 19 im FIGO-Stadium III und elf im FIGO-Stadium IV. Von den 17 Patientinnen, die nicht am Ovarialkarzinom verstarben, waren fünf im Stadium I, zwei im Stadium II, neun im Stadium III und eine im Stadium IV. Die Überlebenszeit beträgt im Median für Stadium IV 8,7 Monate (95 % CI 0,0 - 20,6 Monate), für Stadium III 61,3 Monate (95 % CI: 32,5 - 90,2 Monate) und für Stadium I oder II noch signifikant länger. Die mittlere Überlebenszeit beträgt für Stadium IV 16,9 Monate (95 % CI: 5,7 - 28,2 Monate), für Stadium III 72,2 Monate (95 % CI: 54,3 - 90,0 Monate) und für Stadium I oder II 127,6 Monate (95 % CI: 97,3 - 158,1 Monate). Werden die FIGO-Stadien I und II zusammengefasst, zeigt sich, dass mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium III oder IV eine signifikant ( $p < 0,001$ ) geringere Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden ist (s. Abb. 37).



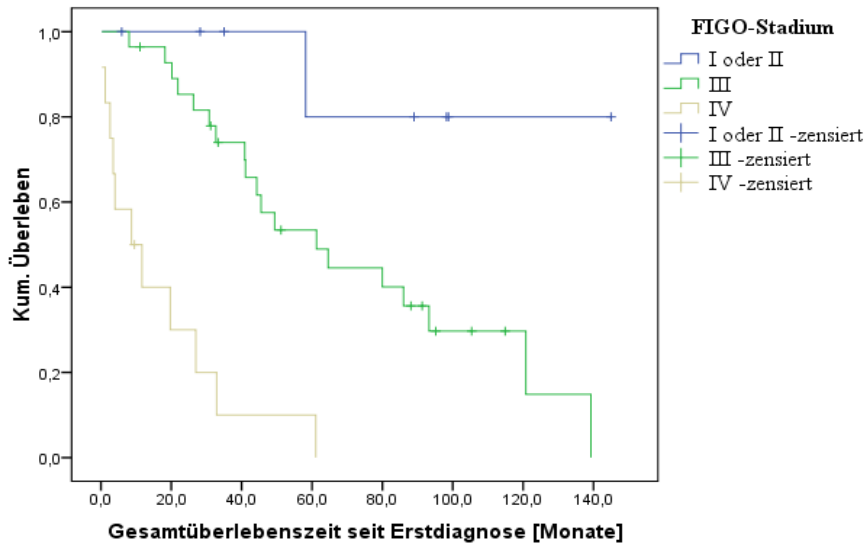


Abb. 37: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit FIGO-Stadium I und II (n =8) versus III (n =28) oder IV (n =12).

### Korrelation von postoperativem Tumorrest und postoperativem Überleben

Patientinnen mit makroskopischer Tumorfreiheit haben gegenüber Patientinnen mit postoperativem Tumorrest ein signifikant längeres medianes Überleben ( $p = 0,001$ ) von 86,0 Monaten versus 40,9 Monaten (95 % CI: 13,1 - 68,7 Monate). Die Überlebenszeit von Patientinnen mit einem Tumorrest  $\leq 1$  cm versus  $> 1$  cm unterscheidet sich nicht signifikant.

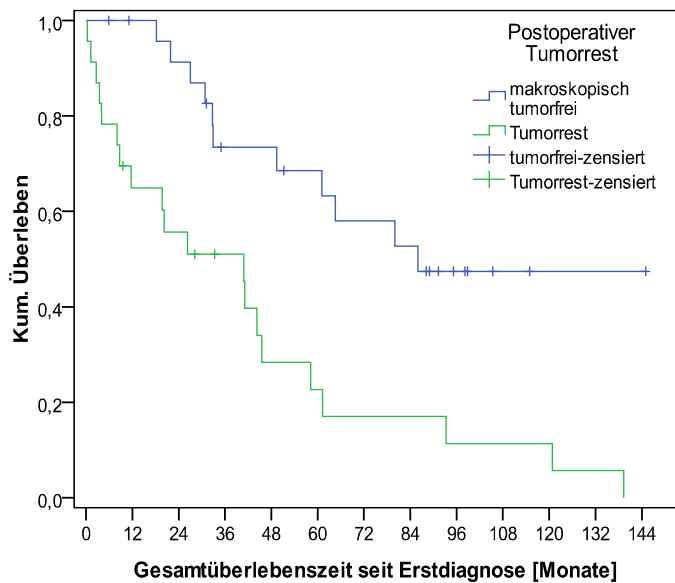


Abb. 38: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen ohne postoperativen Tumorrest (n = 25) versus mit postoperativem Tumorrest (n = 23).

### Korrelation von Aszites und postoperativem Überleben

Die mittlere Überlebenszeit beträgt für Patientinnen ohne Aszites 90,0 Monate (95 % CI: 69,0 - 10,9 Monate), für Patientinnen mit Aszites  $\leq 500$  ml 75,0 Monate (95 % CI: 50,8 - 99,1 Monate) und für Patientinnen mit Aszites  $> 500$  ml 25,9 Monate (95 % CI: 13,2 - 38,5 Monate). Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom, die ein Aszitesvolumen  $> 500$  ml haben, besitzen eine signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit gegenüber Patientinnen, die ein Volumen  $\leq 500$  ml ( $p = 0,006$ ) oder kein Aszites ( $p < 0,001$ ) haben.

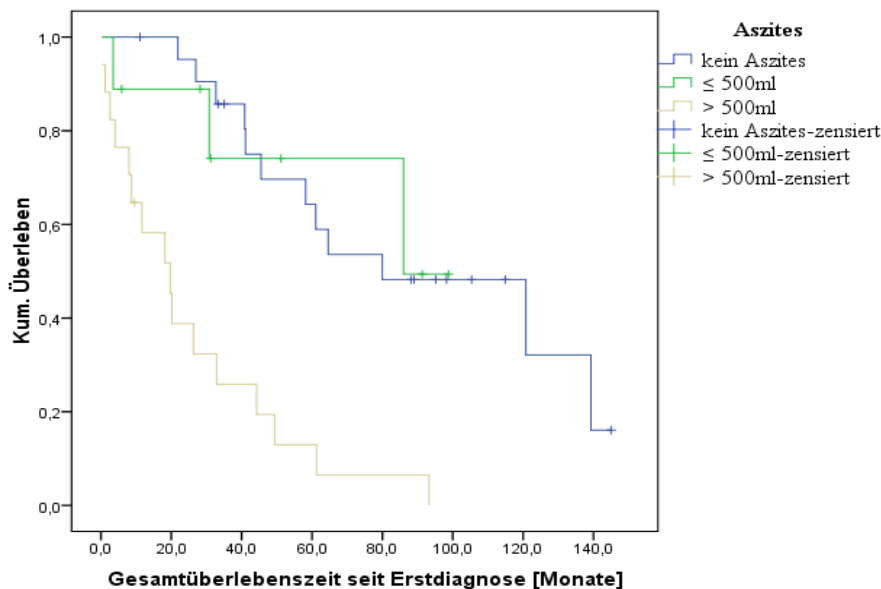


Abb. 39: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen ohne Aszites ( $n = 22$ ), mit  $\leq 500$ ml Aszites ( $n = 9$ ) oder mit  $> 500$ ml Aszites ( $n = 17$ ).

### Korrelation von Tumorstadium pT und postoperativem Überleben

Die mittlere Überlebenszeit beträgt für Patientinnen im Stadium pT1 123,3 Monate (95 % CI: 86,5 - 160,1 Monate), für Patientinnen im Stadium pT2 67,0 Monate (95 % CI: 16,2 - 117,9 Monate) und für Patientinnen im Stadium pT3 57,4 Monate (95 % CI: 42,0 - 72,9 Monate). Patientinnen im Stadium pT1 haben eine signifikant ( $p = 0,026$ ) längere Überlebenszeit gegenüber Patientinnen im Stadium pT3.

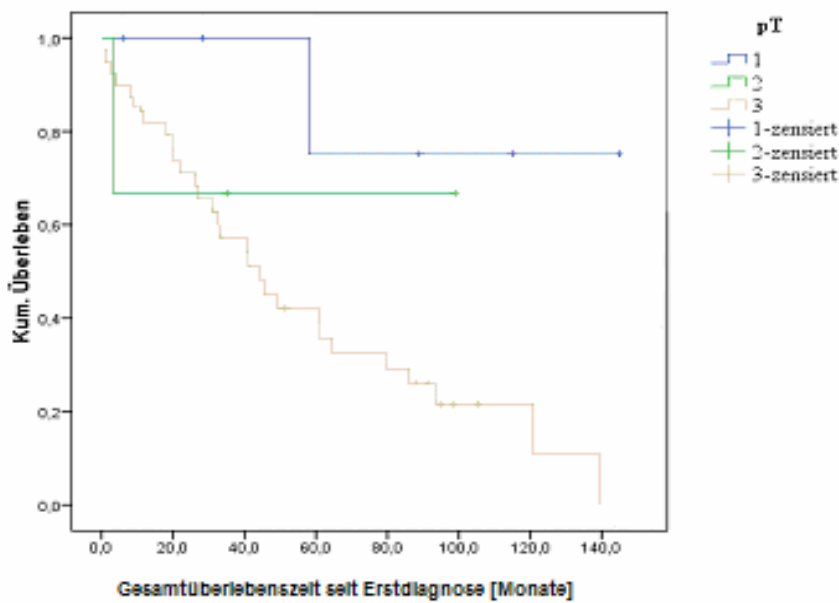


Abb. 40: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit Tumorstadium pT1 (n = 6), pT2 (n = 3) oder pT3 (n = 39).

### Korrelation von Metastasierungszustand pM und postoperativem Überleben

Die mittlere Überlebenszeit beträgt für Patientinnen mit Metastasen 25,6 Monate (95 % CI: 9,4 - 41,8 Monate), für Patientinnen ohne Metastasen 89,4 Monate (95 % CI: 61,3 - 117,6 Monate) und für Patientinnen mit unklarem Metastasierungszustand 76,4 Monate (95 % CI: 56,6 - 96,188 Monate). Patientinnen, die keine Metastasen haben bzw. bei denen der Metastasierungszustand nicht bekannt ist haben einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen mit Metastasen ( $p = 0,001$  bzw.  $p < 0,001$ ).

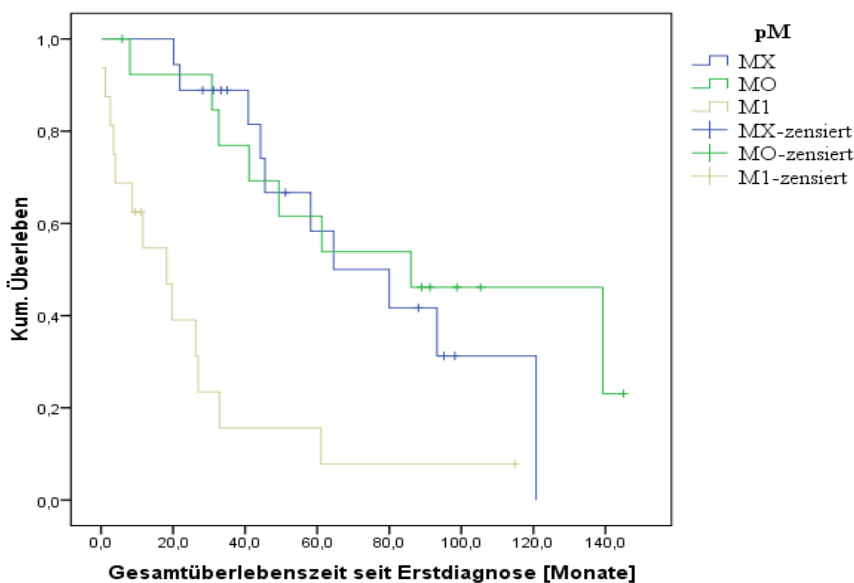


Abb. 41: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit einem Metastasierungszustand MX (n = 18), M0 (n = 14) oder M1 (n = 16).

### Korrelation von präoperativem CA 125-Wert und postoperativem Überleben

Die mittlere Überlebenszeit beträgt für Patientinnen mit einem CA 125-Wert  $< 100$  U/ml 85,5 Monate (95 % CI: 58,0 - 112,9 Monate), für Patientinnen mit eine CA 125-Wert zwischen 100 bis 1000 U/ml 67,4 Monate (95 % CI: 43,7 - 91,2 Monate) und für Patientinnen mit einem CA 125-Wert von  $\geq 1000$  U/ml 39,3 Monate (95 % CI: 16,7 - 61,9 Monate). Patientinnen mit einem CA 125-Wert  $< 100$  U/ml haben ein signifikant ( $p = 0,02$ ) längeres Überleben gegenüber Patientinnen mit einem CA 125-Wert von  $\geq 1000$  U/ml. Patientinnen mit eine CA 125-Wert zwischen 100 bis 1000 U/ml unterscheiden sich hinsichtlich ihres Überlebens nicht signifikant von Patientinnen mit Werten bis  $< 100$  U/ml.

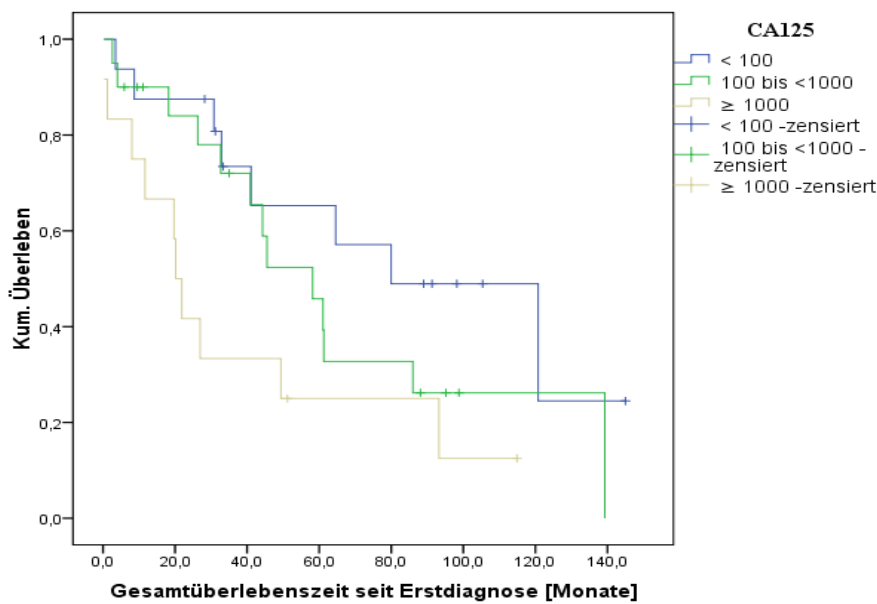


Abb. 42: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit einem präoperativen CA 125-Wert  $< 100$  U/ml ( $n = 16$ ), 100- $< 1000$  U/ml ( $n = 20$ ) oder  $\geq 1000$  U/ml ( $n = 12$ )

Tab. 8: Univariate Analyse zum Einfluss von Prognosefaktoren auf das postoperative Überleben bei Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom

<b>Variablen</b>	<b>Univariate Analyse</b> p-Wert
<b>Thymosin <math>\beta</math>-10-Expression:</b>	
<b>Epithel:</b> schwach vs. mäßig vs. stark	0,217
<b>Stroma:</b> negativ vs. schwach vs. mäßig vs. stark	0,716
<b>Endothel:</b> negativ vs. schwach vs. mäßig	0,120
<b>SPARC-Expression:</b>	
<b>Epithel:</b> negativ vs. schwach	0,587
<b>Stroma:</b> schwach vs. mäßig vs. stark	0,352
<b>Endothel:</b> negativ + schwach vs. mäßig vs. stark	0,246
<b>FIGO-Stadium:</b>	
I/II vs. III	<b>0,027</b>
I/II vs. IV	<b>&lt; 0,001</b>
III vs. IV	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Postoperativer Tumorrest:</b>	
makroskopisch tumorfrei vs. postoperativer Tumorrest	<b>0,001</b>
makroskopisch tumorfrei vs. postoperativer Tumorrest $\leq$ 1 cm	<b>0,007</b>
makroskopisch tumorfrei vs. postoperativer Tumorrest $>$ 1cm	<b>0,002</b>
Postoperativer Tumorrest $\leq$ 1 cm vs. $>$ 1 cm	0,841
<b>Histologie:</b>	
serös vs. muzinös	0,288
serös vs. endometroid	0,662
serös vs. gemischt (serös-muzinös)	0,323
muzinös vs. endometroid	0,954
muzinös vs. gemischt (serös-muzinös)	0,225
endometroid vs. gemischt (serös-muzinös)	0,223

<b>Differenzierungsgrad:</b>	
1 vs. 2	0,891
1 vs. 3	0,708
2 vs. 3	0,558
<b>Alter bei Erstdiagnose</b>	
< 50 Jahre vs. 50 bis < 65 Jahre	0,134
< 50 Jahre vs. $\geq$ 65 Jahre	0,262
50 bis < 65 Jahre vs. $\geq$ 65 Jahre	0,721
<b>Präoperativer CA 125-Wert:</b>	
< 100 U/ml vs. 100 bis < 1000 U/ml	0,256
< 100 U/ml vs. $\geq$ 1000 U/ml	<b>0,020</b>
100 bis < 1000 U/ml vs. $\geq$ 1000 U/ml	0,141
<b>Aszites:</b>	
kein Aszites vs. $\leq$ 500ml	0,962
kein Aszites vs. > 500ml	<b>&lt; 0,001</b>
$\leq$ 500ml vs. > 500ml	<b>0,006</b>
<b>pT:</b>	
pT1c vs. pT3b	<b>0,018</b>
pT1c vs. pT3c	<b>0,032</b>
pT1b/c vs. pT2a/c vs. pT3a	> 0,05
pT2a/c vs. pT3a/b/c	> 0,05
<b>pN:</b>	
Nx vs. N0	0,800
Nx vs. N1	0,836
N0 vs. N1	0,873
<b>pM:</b>	
Mx vs. M0	0,527
Mx vs. M1	<b>&lt; 0,001</b>
M0 vs. M1	<b>0,001</b>

#### 4.5.2 Multivariate Analyse zum Einfluss von Prognosefaktoren auf das postoperative Überleben

Hinsichtlich aller klinisch-histopathologischen Parameter und der Genexpression können nach Kontrolle für die Faktoren Alter, Tumor (Primär vs. Rezidiv), CA 125, FIGO-Stadium, postoperativer Tumorrest, Aszites und Metastasierungszustand pM folgende Faktoren mit einer unabhängigen prognostischen Signifikanz für das postoperative Überleben identifiziert werden (s. Tab. 12 - 17):

- Die SPARC-Expression in den Tumorzellen (HR von 0,245;  $p = 0,010$ ; 95 % CI: 0,084 - 0,716), d. h. Patientinnen mit einer schwachen SPARC-Expression in den Tumorzellen haben gegenüber Patientinnen ohne SPARC-Expression ein signifikant geringeres Sterberisiko (s. Abb. 43).

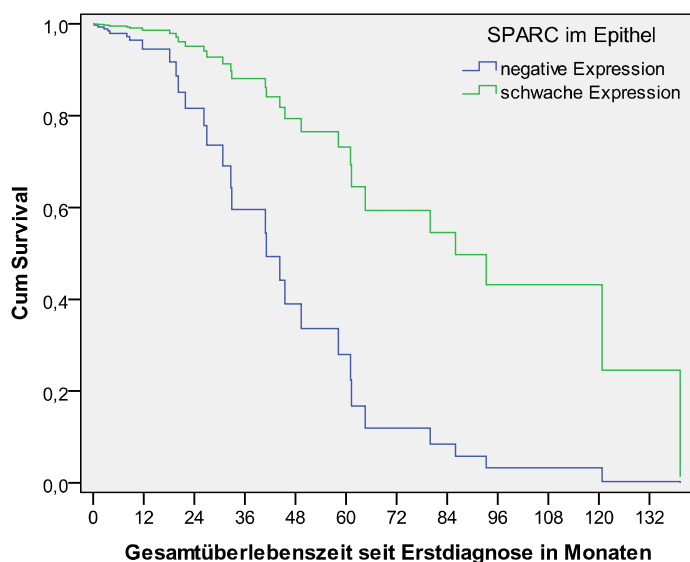


Abb. 43: Postoperatives Überleben von Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom bei negativer bzw. schwacher SPARC-Expression in den Tumorzellen.

- Die stromale SPARC-Expression (HR von 0,099;  $p = 0,016$ ; 95 % CI: 0,015 - 0,648), d. h. Patientinnen mit einer starken stromalen SPARC-Expression haben gegenüber Patientinnen mit einer schwachen stromalen SPARC-Expression ein signifikant geringeres Sterberisiko. Bei Patientinnen mit einer mäßigen stromalen SPARC-Expression gegenüber Patientinnen einer schwachen stromalen SPARC-Expression ist dieser Überlebensvorteil an der Signifikanzschwelle ( $p = 0,053$ ) liegend (s. Abb. 44).

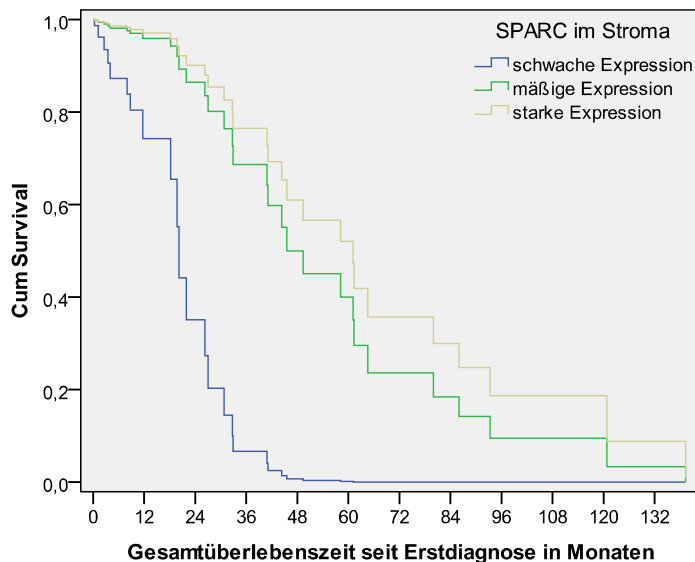


Abb. 44: Postoperatives Überleben von Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom bei schwacher, mäßiger oder starker SPARC-Expression im Tumorstroma. Patientinnen mit einer starken stromalen SPARC-Expression haben gegenüber Patientinnen mit einer schwachen stromalen SPARC-Expression eine signifikante Zunahme der Überlebenszeit ( $p = 0,016$ ).

- Die endotheliale SPARC-Expression (HR von 0,324;  $p = 0,028$ ; 95 % CI: 0,118 - 0,886), d. h. Patientinnen mit einer starken endothelialen SPARC-Expression haben gegenüber Patientinnen mit einer schwachen bis negativen endothelialen SPARC-Expression ein signifikant geringeres Sterberisiko (s. Abb. 45).

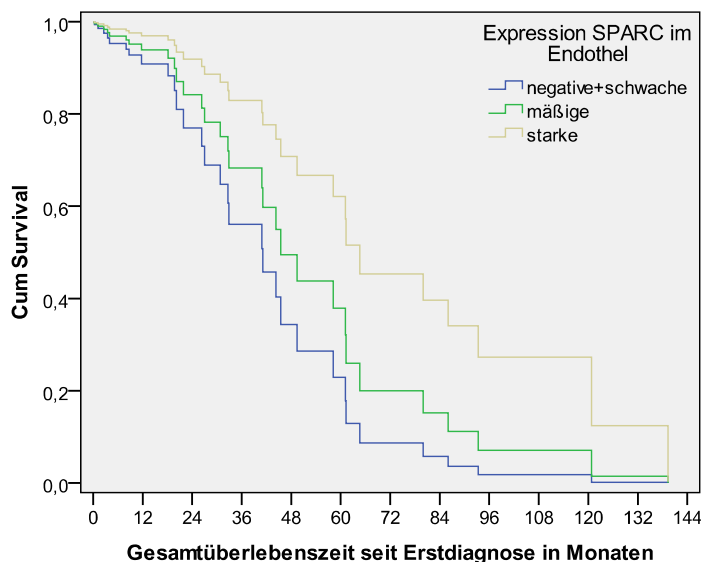


Abb. 45: Postoperatives Überleben von Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom bei schwacher bis negativer, mäßiger oder starker SPARC-Expression im Tumorendothel. Patientinnen mit einer starken endothelialen SPARC-Expression haben gegenüber Patientinnen mit einer schwachen bis negativen endothelialen SPARC-Expression eine Zunahme des Überlebens ( $p = 0,028$ ).



Mittels Cox-Regressionsmodellen wurden innerhalb der Kontrollvariablen folgende weitere unabhängige Prognosefaktoren identifiziert (s. Tab. 12-18):

- Das FIGO-Stadium IV (HR von ca. 22 - 85;  $p \leq 0,040$ ), d.h. Patientinnen im FIGO-Stadium IV haben gegenüber Patientinnen im FIGO-Stadium I/II ein signifikant höheres Sterberisiko. Weiterhin haben Patientinnen im FIGO-Stadium III gegenüber Patientinnen im FIGO-Stadium II ein ca. 4-fach erhöhtes aber nicht signifikantes Sterberisiko.
- Der postoperative Tumorrest (HR von ca. 2,7 - 5;  $p$  von 0,007 - 0,117), d. h. Patientinnen mit postoperativem Tumorrest haben gegenüber Patientinnen ohne postoperativen Tumorrest ein signifikant höheres Sterberisiko.

Patientinnen  $\geq 65$  Jahre haben ein eher geringeres, aber nicht immer signifikant erniedrigtes Sterberisiko gegenüber jüngeren Patientinnen (HR von ca. 0,2 - 0,3;  $p$  von 0,010 - 0,074). Die Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Epithel, Stroma und Endothel und die übrigen histopathologischen Faktoren sind in der multivariaten Analyse nicht signifikant mit dem Überleben verbunden.

Tab. 12: Variablen und deren Referenzkategorie in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse.

		Häufigkeit			Häufigkeit
Tumor	4 = Karzinom	32	Thymosin $\beta$ -10 im Epithel	1 = schwache Expression	16
	6 = Rezidiv	16		2 = mäßige Expression	24
Aszites	1 = kein Aszites	22		3 = starke Expression	8
	3 = > 500ml	9	Thymosin $\beta$ -10 im Stroma	0 = negative Expression	32
	3 = > 500ml	17		1 = schwache Expression	9
pM	0 = MX	18		2 = mäßige Expression	4
	1 = MO	14	3 = starke Expression	3	
	2 = M1	16	Thymosin $\beta$ -10 im Endothel	0 = negative Expression	23
Tumorrest	0 = tumorfrei	25		1 = schwache Expression	20
	1 = Tumorrest	23		2 = mäßige Expression	5
CA 125	1 = $\leq 100$	16	SPARC im Epithel	0 = negative Expression	38
	2 = 100 bis < 1000	20		1 = schwache Expression	10
	3 = $\geq 1000$	12	SPARC im Stroma	1 = schwache Expression	5
Alter bei ED	1 = < 50 Jahre	14		2 = mäßige Expression	14
	2 = 50 bis < 65 Jahre	23		3 = starke Expression	29
	3 = $\geq 65$ Jahre	11	SPARC im Endothel	1 = negative + schwache	17
FIGO-Stadium	1 = Stadium I oder II	8		2 = mäßige	7
	2 = Stadium III	28		3 = starke	24
	3 = Stadium IV	12			

Referenzkategorie

## Ergebnisse

Tab. 13: Multivariate Analyse der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Epithel.

	Signifikanz	Exp(B)	95% CI. für Exp(B)	
			Untere	Obere
Thymosin $\beta$ -10 im Epithel	,641			
mäßig	,401	,655	,244	1,760
stark	,935	1,062	,253	4,452
Alter	,196			
50 bis < 65 Jahre	,648	,779	,267	2,277
$\geq$ 65 Jahre	,072	,311	,087	1,111
Primäres Ovarialkarzinom	,742	1,208	,392	3,718
CA 125	,565			
100 - < 1000	,913	1,067	,330	3,452
$\geq$ 1000	,332	1,870	,527	6,631
FIGO	,084			
Stadium III	,350	2,851	,317	25,611
Stadium IV	<b>,040</b>	22,136	1,160	422,400
Aszites	,216			
< 500 ml	,207	2,903	,554	15,220
> 500 ml	,111	2,711	,795	9,244
pM	,844			
MX	,580	1,453	,387	5,461
M1	,678	1,672	,148	18,852
Tumorrest	<b>,045</b>	3,370	1,030	11,029

Tab. 14: Multivariate Analyse der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma.

	Signifikanz	Exp(B)	95% CI. für Exp(B)	
			Untere	Obere
Thymosin $\beta$ -10 im Stroma	,223			
schwach	<b>,041</b>	4,976	1,065	23,252
mäßig	,976	,968	,111	8,410
stark	,568	1,906	,209	17,385
Alter	,039			
50 bis < 65 Jahre	,275	,570	,208	1,562
$\geq$ 65 Jahre	<b>,016</b>	,160	,036	,710
Primäres Ovarialkarzinom	,264	2,183	,555	8,585
CA125	,781			
100 - < 1000	,603	1,325	,458	3,831
$\geq$ 1000	,498	1,542	,441	5,394
FIGO	<b>,038</b>			
Stadium III	,235	4,209	,393	45,040
Stadium IV	<b>,016</b>	58,643	2,168	1586,042
Aszites	,682			
< 500 ml	,494	1,910	,300	12,165
> 500 ml	,413	1,767	,452	6,913
pM	,977			
MX	,863	,888	,231	3,410
M1	,927	1,116	,107	11,682
Tumorrest	<b>,014</b>	4,531	1,354	15,161

## Ergebnisse

Tab. 15: Multivariate Analyse der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel

	Signifikanz	Exp(B)	95% CI. für Exp(B)	
			Untere	Obere
Thymosin $\beta$ -10 im Endothel	,658			
schwach	,612	1,337	,435	4,107
mäßig	,650	,668	,117	3,828
Alter	,175			
50 bis < 65 Jahre	,410	,661	,247	1,771
$\geq$ 65 Jahre	,074	,290	,074	1,129
Primäres Ovarialkarzinom	,513	1,490	,451	4,917
CA 125	,774			
100 - < 1000	,532	1,407	,483	4,096
$\geq$ 1000	,554	1,466	,413	5,197
FIGO	,076			
Stadium III	,233	3,757	,426	33,116
Stadium IV	<b>,032</b>	27,186	1,331	555,248
Aszites	,330			
< 500 ml	,383	2,288	,357	14,670
> 500 ml	,145	2,714	,709	10,385
pM	,797			
MX	,636	1,485	,289	7,616
M1	,524	2,019	,232	17,547
Tumorrest	,117	2,759	,777	9,797

Tab. 16: Multivariate Analyse der SPARC-Expression im Epithel.

	Signifikanz	Exp(B)	95% CI. für Exp(B)	
			Untere	Obere
SPARC im Epithel schwach	<b>,010</b>	,245	,084	,716
Alter	,070			
50 bis < 65 Jahre	,253	,543	,191	1,546
$\geq$ 65 Jahre	<b>,028</b>	,228	,061	,852
Primäres Ovarialkarzinom	,183	2,246	,683	7,383
CA 125	,687			
100 - < 1000	,544	1,387	,482	3,992
$\geq$ 1000	,396	1,704	,497	5,841
FIGO	<b>,012</b>			
Stadium III	,123	5,872	,620	55,603
Stadium IV	<b>,005</b>	82,120	3,671	1836,782
Aszites	,143			
< 500 ml	,151	3,124	,659	14,814
> 500 ml	,071	3,164	,904	11,069
pM	,973			
MX	,819	,864	,247	3,023
M1	,966	,957	,125	7,322
Tumorrest	<b>,010</b>	5,233	1,483	18,472

## Ergebnisse

Tab. 17: Multivariate Analyse der SPARC-Expression im Stroma.

	Signifikanz	Exp(B)	95% CI. für Exp(B)	
			Untere	Obere
SPARC im Stroma	,054			
mäßig	,053	,139	,019	1,027
stark	<b>,016</b>	,099	,015	,648
Alter	,143			
50 bis < 65 Jahre	,368	,639	,241	1,695
≥ 65 Jahre	,066	,293	,079	1,083
Primäres Ovarialkarzinom	,536	1,431	,460	4,454
CA 125	,488			
100 - < 1000	,483	1,473	,499	4,353
≥ 1000	,231	2,188	,607	7,885
FIGO	<b>,023</b>			
Stadium III	,080	9,383	,763	115,439
Stadium IV	<b>,009</b>	85,950	2,978	2480,630
Aszites	,179			
< 500 ml	,091	4,213	,796	22,307
> 500 ml	,202	2,238	,650	7,711
pM	,854			
MX	,766	1,196	,368	3,888
M1	,582	1,769	,232	13,479
Tumorrest	<b>,007</b>	5,394	1,570	18,529

Tab. 18: Multivariate Analyse der SPARC-Expression im Endothel.

	Signifikanz	Exp(B)	95% CI. für Exp(B)	
			Untere	Obere
SPARC im Endothel	,090			
mäßig	,720	,659	,067	6,459
stark	<b>,028</b>	,324	,118	,886
Alter	<b>,031</b>			
50 bis < 65 Jahre	,200	,508	,181	1,431
≥ 65 Jahre	<b>,010</b>	,164	,041	,651
Primäres Ovarialkarzinom	,765	1,199	,364	3,947
CA125	,427			
100 - < 1000	,369	1,615	,567	4,596
≥ 1000	,204	2,227	,647	7,672
FIGO	,067			
Stadium III	,096	6,649	,715	61,860
Stadium IV	<b>,020</b>	45,397	1,813	1136,445
Aszites	,219			
< 500 ml	,194	3,034	,569	16,190
> 500 ml	,117	2,642	,783	8,913
pM	,565			
MX	,308	1,830	,573	5,843
M1	,536	2,098	,201	21,917
Tumorrest	<b>,022</b>	3,968	1,220	12,902

## 5 Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht die Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression in Normalgewebe vom Ovar, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen. Es erfolgt die differenzierte Charakterisierung der Genexpression im Epithel, Stroma (Fibroblasten) und Endothel. Die etablierten Methoden des Northern-Blots und der RNA-in-situ-Hybridisierung wurden in dieser Studie angewendet. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die erhobenen Expressionsdaten untereinander verglichen, mit klinisch-histopathologischen Parametern und Prognosefaktoren korreliert und der Einfluss auf das Überleben univariat und multivariat dargestellt.

### 5.1 Epidemiologische Daten

#### Postoperativer Tumorrest

Mehrere Studien und Metaanalysen identifizieren den postoperativen Tumorrest als stärksten unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der Patientin mit Ovarialkarzinom [Bristow, 2002, Schmalfeldt, 2007]. Die Studiengruppe Ovar der AGO zeigt, dass Patientinnen mit postoperativem Tumorrest  $\leq 1$  cm einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen mit Tumorrest  $> 1$  cm haben, der deutlichste Vorteil aber für die makroskopisch tumorfrei operierten Patientinnen erreicht wird [Kommission Ovar der AG gynäkologische Onkologie, 2009]. Ein Tumorrest  $\leq 1$  cm kann bei 50–85 % der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erreicht werden [Bristow, 2002]. Ähnlich diesem Ergebnis erfolgte in unserem Studienkollektiv eine Tumorsektion mit makroskopischer Tumorfreiheit in 52 %, mit einem Tumorrest  $\leq 1$  cm in 12 % und mit einem Tumorrest  $> 1$  cm in 36 %. Auch in dieser Studie wird die prognostische Bedeutung der maximalen intraoperativen Tumorreduktion bestätigt. In der univariaten Analyse wird ein signifikanter Überlebensvorteil für Patientinnen, die makroskopisch tumorfrei operiert wurden, gegenüber Patientinnen mit einem postoperativen Tumorrest  $\leq 1$  cm ( $p = 0,007$ ) bzw.  $> 1$  cm ( $p = 0,002$ ) nachgewiesen. Patientinnen mit makroskopischer Tumorfreiheit haben gegenüber Patientinnen mit postoperativem Tumorrest ein signifikant längeres medianes Überleben ( $p = 0,001$ ) von 86 Monaten versus 41 Monaten (95 % CI: 13,1 – 68,7 Monate). Die Überlebenszeit von Patientinnen mit einem Tumorrest  $\leq 1$  cm versus  $> 1$  cm unterscheidet sich nicht. In der multivariaten Analyse wird der postoperative Tumorrest als unabhängiger Prognosefaktor bestätigt. Patientinnen mit makroskopischer Tumorfreiheit zeigen gegenüber Patientinnen mit postoperativem Tumorrest ein signifikant ( $p < 0,05$ ) längeres Überleben.

### **FIGO-Stadium**

Ein weiterer wesentlicher unabhängiger Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom ist das Tumorstadium. Es korreliert signifikant mit dem 5-Jahresüberleben. In dieser Studie liegt bei 89,8 % aller Patientinnen mit Ovarialkarzinom ein fortgeschrittenes Tumorstadium (FIGO III/IV) vor. Das Erkennen der Erkrankung in einem meist fortgeschrittenen Tumorstadium ist ähnlich auch in anderen Studien beobachtet worden, in denen 75 % der Frauen ein fortgeschrittenes Tumorstadium hatten [Heintz, 2006; Lichtenegger, 1998; Pfisterer 2002; Sehouli, 2003]. Patientinnen mit einem FIGO-Stadium I haben eine 5-JÜR von 86,4 %, im FIGO-Stadium II von 69 %, im FIGO-Stadium III von 40,2 % und im FIGO-Stadium IV von 18,6 % [Heintz, 2006; Lichtenegger, 1998; Schildkraut, 2000; Schmalfeldt, 2007]. In der vorliegenden Studie zeigt sich bei Zusammenfassung der FIGO-Stadien I und II in der univariaten Analyse, dass mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium III oder IV eine signifikant ( $p < 0,05$ ) geringere Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden ist. Die mittlere Überlebenszeit beträgt für Patientinnen im FIGO-Stadium IV 16,9 Monate (95 % CI: 5,7 - 28,2 Monate), im FIGO-Stadium III 72,2 Monate (95 % CI: 54,3 - 90,0 Monate) und im FIGO-Stadium I oder II 127,6 Monate (95 % CI: 97,3 - 158,1 Monate). In der multivariaten Analyse wird das FIGO-Stadium als unabhängiger Prognosefaktor bestätigt. Patientinnen im FIGO-Stadium IV haben gegenüber Patientinnen im FIGO-Stadium I/II ein signifikant höheres Sterberisiko. Weiterhin haben Patientinnen im FIGO-Stadium III gegenüber Patientinnen im FIGO-Stadium I/II ein ca. 4-fach aber nicht signifikant erhöhtes Sterberisiko.

### **Differenzierungsgrad**

Der Differenzierungsgrad wird beim Ovarialkarzinom nicht einheitlich als unabhängiger Prognosefaktor diskutiert. Einige Studien zeigen nur in den frühen FIGO-Stadien I bzw. II einen Einfluss des Differenzierungsgrads auf das Überleben, andere unabhängig vom Tumorstadium eine prognostische Relevanz des Differenzierungsgrads [Ferlay, 2007; Heintz, 2006; Kreienberg, 2009; Mayr, 2000]. In dieser Studie wird in der univariaten und multivariaten Analyse kein signifikanter Zusammenhang von Differenzierungsgrad und postoperativem Überleben ermittelt.

### **Histologie**

Die Histologie ist ein weiterer Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom [Schmalfeldt, 2007]. Sie nimmt allerdings nur einen begrenzten Stellenwert im Unterschied zum Tumorstadium und Tumorstadium ein [Holschneider, 2000]. Die histologische Klassifikation der Ovarialkarzinome erfolgt gemäß der WHO-Klassifikation (2003) [Schmalfeldt, 2007]. Von den epithelialen

Ovarialkarzinomen sind ca. 80 % serös-papillär, 10 % muzinös und 10 % endometroid [Heintz, 2006]. Seröse und endometroide Ovarialkarzinome weisen im Vergleich zu muzinösen oder klarzelligen Ovarialkarzinomen eine bessere Prognose auf, da sie besser auf eine konventionelle platinhaltige Chemotherapie ansprechen [Fujita, 2003]. Das muzinöse Ovarialkarzinom wird häufiger im Frühstadium erkannt und hat dann eine bessere Prognose, wird es allerdings erst spät erkannt hat es eine schlechtere Prognose als die anderen Subtypen [Kreienberg, 2009]. Die 5-JÜR für Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom im FIGO-Stadium I/II bzw. III/IV beträgt 83,9 % bzw. 31,9 %, für Patientinnen mit muzinösem Ovarialkarzinom 90 % bzw. 31 %, für Patientinnen mit endometroidem Ovarialkarzinom 86,5 % bzw. 37 % und für Patientinnen mit klarzelligem Ovarialkarzinom 81 % bzw. 23,9 % [Brun, 2000; Ferlay, 2007; Heintz, 2006; Lichtenegger, 1998]. In dieser Studie sind 74 % aller Ovarialkarzinome serös-papillär, 20 % endometroid und 6 % muzinös bzw. serös-muzinös. Damit sind die Ovarialkarzinome auch in diesem Patientinnenkollektiv histologisch normalverteilt. In der vorliegenden Studie wird weder univariat noch multivariat ein signifikanter Einfluss der Histologie auf das Überleben nachgewiesen.

### **Alter bei Erstdiagnose**

Entsprechend dem mittleren Erkrankungsalter der Patientinnen von 68 Jahren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines Ovarialkarzinoms betrifft diese Erkrankung hauptsächlich peri- und postmenopausale Frauen [Ferlay, 2007; Heintz, 2006; RKI, 2010]. In dieser Studie liegt das mediane Alter der Patientinnen mit einem primären Ovarialkarzinom zum Zeitpunkt der Operation bei 58,5 Jahren und bei Frauen, die wegen eines Ovarialkarzinomrezidivs operiert wurden, im Median bei 56 Jahren bei Erstdiagnose des primären Ovarialkarzinoms. In mehreren Studien wird der unabhängige prognostische Wert des Alters auf das Überleben bestätigt. Jüngere Patientinnen haben im Vergleich zu älteren eine deutlich günstigere Prognose beim Auftreten eines Ovarialkarzinoms, was möglicherweise auf die höhere Inzidenz von prognostisch günstigeren Ovarialkarzinomen im FIGO-Stadium I/II bei den jüngeren Patientinnen zurückzuführen ist [Friedrich, 2005; Pfisterer, 2002]. Im Alter von 40 - 49 Jahren liegt die 5-JÜR bei 62,1 %, im Alter von 50-59 Jahren bei 53,2 %, im Alter von 60 - 69 Jahren bei 44 %, bei Frauen zwischen 70 - 79 Jahren bei 33,3 % und bei den über 80-jährigen Frauen bei 23 % [Holschneider, 2000; Pfisterer, 2002, Schmalfeldt, 2007]. In der vorliegenden Studie zeigt sich univariat kein signifikanter Einfluss des Alters bei Erstdiagnose auf das Überleben. Multivariat haben Patientinnen  $\geq 65$  Jahre ein eher geringeres, aber nicht immer signifikantes Sterberisiko gegenüber jüngeren Patientinnen.

### **Aszites**

Der Aszitesnachweis scheint beim Ovarialkarzinom von prognostischer Bedeutung zu sein [Chi, 2001; Harter, 2006; Makar 1995; Sehouli, 2003]. Das Vorhandensein von Aszites bedeutet für die Patientinnen eine entscheidende Verschlechterung der 5-JÜR von ca. 80 % auf 25 % im FIGO-Stadium I und von 45 % auf 5 % im FIGO-Stadium III und IV [Brun 2000; Harter, 2006; Sehouli 2003]. Daten zeigen, dass es in etwa 50 % der Fälle aller Stadien zur Ausschwemmung von malignen Zellen in die Peritonealflüssigkeit und damit zum malignen Aszites kommt [Lichtenegger 1998; Sehouli, 2004]. In der vorliegenden Studie weisen Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom signifikant häufiger Aszites auf ( $p = 0,018$ ) als Patientinnen mit rezidiviertem Ovarialkarzinom. Vermutlich fallen Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom häufig erst durch die Aszitesbildung auf, während Patientinnen mit Ovarialkarzinomrezidiv durch ansteigende Tumormarker oder den sonografischen Nachweis eines Rezidivtumors auffallen. Die mittlere Überlebenszeit beträgt für Patientinnen ohne Aszites 90 Monate (95 % CI: 69,0 - 110,9 Monate), für Patientinnen mit Aszites  $\leq 500$  ml 75 Monate (95 % CI: 50,8 - 99,1 Monate) und für Patientinnen mit Aszites  $> 500$  ml 25,9 Monate (95 % CI: 13,2 - 38,5 Monate). In der univariaten Analyse zeigen Patientinnen, die ein Aszitesvolumen  $> 500$  ml hatten, eine signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patientinnen mit einem Aszitesvolumen  $\leq 500$  ml ( $p = 0,006$ ) oder ohne Aszites ( $p < 0,001$ ). Eine prognostisch bedeutsame Grenze für das Überleben liegt scheinbar bei 500 ml Aszites und wird auch durch diese Studie belegt [Harter, 2006; Sehouli, 2003]. In der multivariaten Analyse wird Aszites nicht als unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben ermittelt.

### **5.2 Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im elektronischen Northern**

Mittels bioinformatischem elektronischem Northern werden die Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC als in Ovarialkarzinomen gegenüber Normalgewebe vom Ovar überexprimiert identifiziert. Beide Genprodukte scheinen die Zellmotilität durch Verlagerung des Aktinäquilibrium hin zum globulären (G-) Aktin, zu erhöhen. Während Thymosin  $\beta$ -10 die Bildung von filamentösem (F-) Aktin durch direkte 1:1 Komplex-Bindung und Speicherung von G-Aktin inhibiert [Yu, 1993, Yu, 1994], scheint SPARC die Zellmorphologie über die Aktivierung von intrazellulären Proteasen mit konsekutiver Aktinreorganisation zu verändern [Goldblum, 1994]. SPARC beeinflusst weiterhin über proteolytische Enzyme wie Matrix-Metallo-Proteinasen die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix und besitzt antiadhäsive Eigenschaften und daher möglicherweise eine für die Metastasierung und Invasion von



Tumorzellen entscheidende Bedeutung. Beide Gene werden auch als Tumorsuppressor diskutiert [Hall, 1995; Lee SH, 2005; Mok, 1996].

Mittels elektronischem Northern und Northern-Blot wird die Heterogenität des normalen und neoplastischen Ovargewebes nicht beachtet. Daher ist das Ergebnis der Untersuchungen nur als Hinweis auf eine mögliche Überexpression von Thymosin  $\beta$ -10 bzw. SPARC in Ovarialkarzinomen im Vergleich zu Normalgeweben vom Ovar zu werten. Um die zelluläre Lokalisation der Expression zu untersuchen wird im Anschluss die Methode der RNA-in-situ-Hybridisierung durchgeführt.

### **5.2.1 Thymosin $\beta$ -10- und SPARC-Expression im MTN-Blot**

Die mit den MTN-Blots erhaltenen Expressions-Daten für die Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC bestätigen die in der Literatur beschriebenen Expressionsprofile im Normalgewebe verschiedener Organe [Holland, 1987; Lane, 1994 B; Lee SH, 2001]. Beide Transkripte erweisen sich erwartungsgemäß als ubiquitär exprimiert, also nicht ovarspezifisch. Der MTN-Blot von Thymosin  $\beta$ -10 zeigt im Ovar im Vergleich zu den anderen Geweben die höchste Expression. Dieses Ergebnis ist identisch mit den Beobachtungen von Lee et al. [Lee SH, 2001].

### **5.2.2 Thymosin $\beta$ -10-Expression im Dot-Blot und Cancer Profiling Array**

Seit ihrer Entdeckung werden Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC in der normalen Physiologie zunehmend als Wachstumsregulator diskutiert, aber auch in verschiedenen Tumoren wurden sie nachgewiesen. Die von Santelli et al. [Santelli, 1999] und weiteren Autoren [Califano, 1998; Hall, 1991 A; Hall, 1995; Ledda, 1997; Thomas, 2000; Vasile, 2001; Verghese-Nikolakaki, 1996; Weterman, 1993] beschriebene Überexpression von Thymosin  $\beta$ -10 in unterschiedlichen Tumoren und deren Zelllinien gegenüber dem Normalgewebe wird durch die erhaltenen Daten bestätigt. Im Dot-Blot bzw. CPA zeigen 31 Tumore (von  $n = 68$ ) bzw. 76 Tumore (von  $n = 241$ ) verschiedener Organe eine Überexpression von Thymosin  $\beta$ -10 gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe. In den Ovarproben zeigt Thymosin  $\beta$ -10 in zwei von drei (Dot-Blot) bzw. neun von 16 (CPA) Fällen eine Überexpression im korrespondierenden Ovarialkarzinom. Das Signal im Normalovar stammt vermutlich von der geringen Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma und in den steroidproduzierenden Zellen, während das im Ovarialkarzinom insgesamt stärkere Signal vermutlich durch die hohe Expression in den Tumorzellen bedingt ist (s. Kap. 4.4.1). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Santelli et al.

[Santelli, 1999] überein, die eine Überexpression von Thymosin  $\beta$ -10 in allen untersuchten Karzinomgeweben (u. a. Ovar) und Zelllinien gegenüber Normalgewebe festgestellt haben. Allerdings ist an deren Analysen zu bemängeln, dass nur eine Probe Normalgewebe vom Ovar als Vergleich zu 13 Proben Ovarialkarzinom diente und damit individuelle Expressionsunterschiede nicht berücksichtigt wurden. Lee et al. zeigt dagegen im cDNS-Array in vier von fünf Proben eine gegenüber dem Normalovar verminderte Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Karzinom [Lee SH, 2001]. Eine Erklärung für die von Lee et al. beobachtete geringe Expression im Tumor könnte ein nur relativ wenige Tumorzellen und damit viel Thymosin  $\beta$ -10-negatives Stroma enthaltendes Ovarialkarzinom sein oder aber ein an Stroma- und Steroide produzierenden Zellen reiches Normalgewebe des Ovars, da Tumorzellen bzw. Stroma in Normalgewebe und Steroide produzierende Zellen in unseren Untersuchungen eine starke bzw. mäßige und Tumorstroma nur selten eine Expression aufweist.

### **5.2.3 SPARC-Expression im Dot-Blot und Cancer Profiling Array**

Die von mehreren Autoren [Ledda, 1997; Porter, 1995; Thomas, 2000] beschriebene Überexpression von SPARC in Tumoren wird mittels Dot-Blot und Cancer Profiling Array z. T. bestätigt. 35 Tumore (von  $n = 68$ ) bzw. 97 Tumore (von  $n = 241$ ) zeigen eine Überexpression gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe. In den Ovarproben wird SPARC im Dot-Blot in zwei von drei Ovarialkarzinomen weniger exprimiert, im CPA in sieben von 16 Ovarialkarzinomen überexprimiert und in zwei Ovarialkarzinomen geringer exprimiert als im Normalgewebe vom Ovar. In den anderen Proben bestehen zwischen Normal- und Tumorgewebe kein Unterschied. Zumal im Normalgewebe vom Ovar nur geringe Mengen an SPARC vom Oberflächenepithel, das ohnehin nur einen sehr kleinen Teil am Gesamtovar einnimmt, synthetisiert werden, und auch im Stroma und den darin befindlichen Luteinzellen eine nur geringe Expression vorhanden ist, wäre durch die in der RNA-in-situ-Hybridisierung beobachtete starke Expression im Tumorstroma eine Überexpression im korrespondierenden Tumor zu erwarten. Tumorproben, welche SPARC im Vergleich zum Normalgewebe überexprimieren, können stromareich sein, und somit eine starke Expression aufweisen. Die Tumorproben, welche ähnliche oder niedrigere Level als im Normalovar aufwiesen, enthalten möglicherweise mehr Tumorzellen, und zeigen dementsprechend keine Überexpression im Tumor an, oder die Expression im Oberflächenepithel und in den Luteinzellen des Normalovars war möglicherweise höher als die Expression im Tumor. Zusammenfassend sind Northern-Blot-Analysen geeignet, Unterschiede in der Expression von Normal- und Tumorgewebe aufzuzeigen,

sie zeigen aber nicht die Zusammensetzung des untersuchten Gewebes, d. h. dessen Kontamination mit Bindegewebe, Endothelzellen und inflammatorischen Zellen sowie die zelluläre Lokalisation der Expression an.

### **5.3 Expressionsanalyse der Gene Thymosin $\beta$ -10 und SPARC mittels RNA-in-situ-Hybridisierung**

Die Methode der RNA-in-situ-Hybridisierung ist geeignet, Expressionsunterschiede auf zellulärer Ebene darzustellen. Über die Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression in Normalgewebe vom Ovar, benignen Ovarialtumoren und Ovarialkarzinomen gibt es wenig Literatur mit widersprüchlichen Angaben [Bagavandoss, 1998; Brown, 1999; Goldblum, 1994; Hall, 1991 A; Lee SH, 2001; Lee, S-H 2005; Mok, 1996; Porter, 1995; Rho, 2004; Santelli, 1999; Smith, 1996]. Es stellt sich daher die Frage, wie sich die Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Ovar und in benigne und maligne transformierten Ovarien darstellt und wie sich die Expressionsunterschiede auf klinisch-histopathologische Parameter, Prognosefaktoren und das Überleben der Patientinnen auswirken. Unter diesem Aspekt wurde die Expression von Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC mittels RNA-in-situ-Hybridisierung auf mRNA-Ebene in neun Normalgeweben des Ovars, drei benignen Ovarialtumoren, 34 primären und 16 rezidierten Ovarialkarzinomen untersucht. Die Beurteilung der Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression erfolgte in Anlehnung an den Immunreaktiven Score nach Remmele (IRS), der sich aus der prozentualen Positivität, d. h. dem Anteil positiver Zellen, und dem Intensitätsgrad der Genexpression zusammensetzt. Dabei muss bedacht werden, dass die Ergebnisse nur den Zustand darstellen, der zur Zeit der Operation der Patientinnen im Gewebe herrschte. Es ist unklar, ob die Operation selbst diesen Zustand beeinflusst hat.

### 5.3.1 Thymosin $\beta$ -10-Expression im Epithel

In der vorliegenden Studie exprimiert das Oberflächenepithel vom Ovar in 22 % der Fälle schwach Thymosin  $\beta$ -10. Die höchste Expression weisen Granulosazellen auf. Hall et al. berichten über eine konstitutionelle Thymosin  $\beta$ -10-mRNA-Expression im Normalgewebe vom Ovar, mit einer vor allem auf die Granulosazellen, Oozyten und die umgebenden Cumuluszellen beschränkten Expression [Aten, 1991; Hall, 1991 B; Salhab, 2010]. In der vorliegenden Studie nimmt die Häufigkeit der epithelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression zu den benignen Ovarialtumoren hin leicht zu, gefolgt von einem signifikant ( $p < 0,05$ ) stärkeren Signal im Tumorepithel der primären und rezidierten Ovarialkarzinome. Untersuchungen an Keratinozyten belegen die Ergebnisse dieser Arbeit insofern, dass in den normalen Keratinozyten-Zelllinien keine Thymosin  $\beta$ -10-Expression nachgewiesen wird, sich im Karzinogen-induzierten Papillom-Stadium eine intermediäre Expression zeigt, und ein weiterer Anstieg auf der Stufe des Karzinoms erfolgt [Santelli, 1999]. Die Thymosin  $\beta$ -10-Expression korreliert in diesem Fall sogar mit dem Progression-Step der Karzinogenese. Andere Autoren liefern ähnliche Ergebnisse an unterschiedlichen Geweben [Califano, 1998; Hall, 1991 A; Santelli, 1999; Takano, 2002; Vergheese-Nikolakaki, 1996].

Frühere Studien haben ergeben, dass Thrombozyten und neutrophile Granulozyten ausreichend Thymosin  $\beta$ -10 enthalten, um alle globulären Aktinmoleküle zu besetzen [Lodish, 1996]. Sie sind damit vermutlich sehr beweglich und anpassungsfähig, was für deren Aufgaben als Immunzellen auch sinnvoll scheint. Eine hohe Zellmobilität ist scheinbar mit einer starken Thymosin  $\beta$ -10-Expression assoziiert. Aktinfilamente sorgen für einen festen Zusammenhalt der Zellen. Daher erscheint es plausibel, dass es bei einer Verminderung dieser Zellbestandteile, u. a. durch eine hohe Thymosin  $\beta$ -10-Expression, zu einer Reduktion der Stabilität zugunsten der Mobilität kommen könnte. Folglich könnte die bei der malignen Transformation des Ovars beobachtete Zunahme der epithelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression mit einer erhöhten Zelldynamik einhergehen, die eine effizientere Anpassung an das Umgebungsmilieu ermöglicht und für die Invasivität der Tumorzellen vermutlich von Vorteil ist, die schließlich zur Metastasierung führen kann. Plasmid-vermittelte Überexpression von Thymosin  $\beta$ -10 führt in humanen ovarialen Tumorzelllinien zu einer DNS-Fragmentation, einem Verlust zentraler Aktinfilamente, einer Abnahme fokaler Adhäsionen, und einer erhöhten Apoptoserate. In diesem Zusammenhang wird Thymosin  $\beta$ -10 auch als Tumorsuppressor diskutiert [Hall, 1995; Lee SH, 2001; Yu, 1994]. Exogen zugeführtes Thymosin  $\beta$ -10 vermindert in Mäusen nach Injektion von

Ovarialkarzinomzellen Tumorwachstum und Vaskularisation. Andererseits reduziert ein durch Antisense-mRNA hergestellter Knock-out ähnlicher Zustand das Wachstum von Schilddrüsenkarzinomzelllinien [Santelli, 2002] und führt zu einer Hemmung der Apoptose mit verstärktem F-Aktinzusammenbau [Hall, 1995]. Möglicherweise wird das erhöhte Apoptoserisiko von den stark Thymosin  $\beta$ -10 exprimierenden Tumorzellen für die erleichterte Zellmigration und damit Invasivität in Kauf genommen.

### **5.3.1.1 Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Epithel mit klinisch-histopathologischen Faktoren**

Ovarialkarzinome, die eine hohe Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Tumorepithel aufweisen, haben signifikant ( $p < 0,001$ ) häufiger metastasiert, als Ovarialkarzinome mit geringer Expression im Tumorepithel. Eine hohe Thymosin  $\beta$ -10-Expression der Tumorzellen führt möglicherweise über die Depolymerisation von intrazellulärem filamentösem Aktin zu einer erhöhten Zelldynamik und erleichtert darüber die Metastasierung. Diese Vermutung wird in den Untersuchungen von Zachary et al. unterstützt, bei denen an verschiedenen Karzinomen gezeigt wurde, dass eine quantitative Reduktion der Aktinfilamente mit einer erhöhten Invasivität der Tumorzellen einhergeht [Zachary, 1986] und umgekehrt.

Es existiert keine Literatur über einen Zusammenhang zwischen Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Tumorepithel von Ovarialkarzinomen und metastatischem Potenzial. Allerdings ist in der Untersuchung von Liu et al. an Karzinomzelllinien der Haut, der Brust und der Lunge eine hohe Thymosin  $\beta$ -10-Expression mit einem Verlust an filamentösem Aktin, einer Zunahme von schwach organisiertem Aktinskelett und mit einem erhöhten metastatischen Potenzial assoziiert [Liu, 2004]. Auch in der Studie von Gu et al. war eine Zunahme der Thymosin  $\beta$ -10-Expression beim Bronchialkarzinom mit dem Auftreten von Metastasen, einer zunehmenden Entdifferenzierung und einem kürzeren Überleben assoziiert [Gu, 2009].

### **5.3.1.2 Prognostische Bedeutung der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Epithel**

Es zeigt sich weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse ein signifikanter Einfluss der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Epithel auf das Überleben. Vergleichbare Studien zur prognostischen Bedeutung von Thymosin  $\beta$ -10 im Epithel von Ovarialkarzinomen liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor.

### **5.3.2 Thymosin $\beta$ -10-Expression im Stroma**

Die stromale Thymosin  $\beta$ -10-Expression von Normalgewebe des Ovars ist signifikant stärker als von primären ( $p = 0,004$ ) und rezidierten Ovarialkarzinomen ( $p < 0,001$ ). Dieser mit beginnender Malignität auftretende Rückgang der stromalen Thymosin  $\beta$ -10-Expression stellt möglicherweise eine protektive Reaktion des Stromas auf die Invasion durch Tumorzellen dar. Denn mit abnehmender Thymosin  $\beta$ -10-Expression sinkt möglicherweise auch die Verformbarkeit der Fibroblasten der EZM und damit wird eine für Invasion weniger attraktive Umgebung geschaffen.

#### **5.3.2.1 Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Stroma mit klinisch-histopathologischen Faktoren**

Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom werden bei positiver stromaler Thymosin  $\beta$ -10-Expression signifikant häufiger ( $p = 0,024$ ) makroskopisch tumorfrei operiert. Gegenüber einer negativen stromalen Expression besteht bei positiver Thymosin  $\beta$ -10-Expression die vierfache Chance tumorfrei operiert zu werden (OR 4,3; 95 % CI: 1,14 - 16,07). Dieser Zusammenhang ist auch nach der Korrektur für die übrigen histopathologischen Faktoren signifikant ( $p = 0,039$ ). Möglicherweise hemmt das mutmaßlich unflexiblere Stroma bei Patientinnen mit einer fehlenden stromalen Thymosin  $\beta$ -10-Expression die tiefe Infiltration durch Tumorzellen, die dann oberflächlich zu einer ausgedehnteren, schlechter operablen Peritonealkarzinose führen.

#### **5.3.2.2 Prognostische Bedeutung der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Stroma**

Es zeigt sich weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma und postoperativem Überleben. Vergleichbare Studien zur prognostischen Bedeutung von Thymosin  $\beta$ -10 im Stroma von Ovarialkarzinomen liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor.

### **5.3.3 Thymosin $\beta$ -10-Expression im Endothel**

Die endotheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression ist, unabhängig von der Dignität des Ovargewebes, auf eine schwache bis mäßige Färbung des angiogenetisch aktiven Endothels beschränkt. Es

existiert kein signifikanter Unterschied in der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel zwischen Normalgewebe vom Ovar, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.

Santelli et al. [Santelli, 1999] weisen in Normalgewebe vom Ovar ein starkes Signal für das Thymosin  $\beta$ -10-Protein in Gefäßen nach. Andere Studien an Kolongewebe zeigen eine intensive Thymosin  $\beta$ -10-Expression in proliferierenden Blutgefäßen, und zwar sowohl in Endothelzellen innerhalb eines Tumors, als auch im Endothel des benachbarten nicht-malignen Gewebes. Die daraus resultierende veränderte Regulation der Aktinpolymerisierung könnte zu einer verstärkten Verformbarkeit der Endothelzellen beitragen [Vasile, 2001].

### **5.3.3.1 Korrelation der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Endothel mit klinisch-histopathologischen Faktoren**

In dieser Arbeit kommt es bei Zunahme der endothelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression signifikant ( $p = 0,005$  bei Ausschluss von MX) häufiger zum Auftreten von Metastasen und zu einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium ( $p = 0,036$ ). Möglicherweise führt die verstärkte endotheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression zu einer verstärkten Verformbarkeit der Endothelzellen, wie sie für die Angiogenese bei Tumorwachstum und Metastasierung benötigt werden. Andererseits reduziert Thymosin  $\beta$ -10, vermutlich über die Hemmung der VEGF-Synthese, die Endothelzellmigration, Gefäßformation und Aszitesbildung [Lee, 2005; Mu, 2006; Zhang, 2009], weshalb möglicherweise Patientinnen mit mäßiger endothelialer Thymosin  $\beta$ -10-Expression erst in fortgeschrittenen Tumorstadien entdeckt werden. Allerdings konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen endothelialer Thymosin  $\beta$ -10-Expression und Aszitesbildung festgestellt werden.

### **5.3.3.2 Prognostische Bedeutung der Thymosin $\beta$ -10-Expression im Endothel**

Sowohl in der univariaten als auch multivariaten Analyse ist die Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel nicht signifikant mit dem Überleben verbunden. Vergleichbare Studien zur prognostischen Bedeutung von Thymosin  $\beta$ -10 im Endothel von Ovarialkarzinomen liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor.

### 5.3.4 SPARC-Expression im Epithel

Im Ovar wird SPARC-mRNA im Oberflächenepithel in 56 % schwach exprimiert. In prämenopausalen Ovarien wird es zusätzlich in den Granulosa- und Thekazellen der Follikel exprimiert, mit geringer Expression in den Granulosazellen und einer stärkeren Expression in den Thekazellen und in den lutealen Zellen des Corpus luteum. Auch andere Autoren zeigen eine starke SPARC-Expression auf mRNA- bzw. auf Proteinebene in Granulosa- und Thekazellen prälutealer Follikel und im Corpus luteum [Bagavandoss, 1998; Brown, 1999; Holland, 1987; Paley, 2000; Smith, 1996]. Das Oberflächenepithel rupturiert während der Ovulation und muss anschließend wieder repariert werden. Möglicherweise limitiert SPARC dabei die Proliferationsrate der beteiligten Zellen. Bekannt ist, dass SPARC in vitro die Proliferation hemmt [Funk, 1993; Motamed, 1998]. Auch könnte seine an Zellkulturen nachgewiesene antiadhäsive Funktion dazu beitragen, die für die Follikelexpansion nötige Umverteilung der Zellen mit der Ausbildung eines Antrum folliculi zu ermöglichen [Bagavandoss, 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass SPARC in vitro die Permeabilität in Blutgefäßen erhöht [Goldblum, 1994]. Eine weitere Hypothese besagt daher, dass SPARC von den Steroide produzierenden Zellen des Gelbkörpers exprimiert und vermutlich sezerniert wird, um die Permeabilität des Endothels zu erhöhen, und damit die Passage von Steroidhormonen und anderen Molekülen von/zum Corpus Luteum hin zu ermöglichen [Bagavandoss, 1998; Goldblum, 1994; Smith, 1996]. Vergleicht man die Expression vom Oberflächenepithel von Ovarien mit der von Tumorzellen in benignen und malignen Ovarialtumoren, so zeigen nur 23,5 % bzw. 12,5 % der primären bzw. rezidierten Ovarialkarzinome eine schwache epitheliale Expression gegenüber 33 % der benignen Ovarialtumoren und 55,6 % des Normalgewebes des Ovars. Dieser Unterschied ist statistisch aber nicht signifikant.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind ähnlich denen von Mok et al. [Mok, 1996], die eine SPARC-Expression im Oberflächenepithel nachweisen. Allerdings wiesen Mok et al. in Zelllinien vom Oberflächenepithel des Ovars eine meist starke SPARC-mRNA-Expression und zeigen in Ovarialkarzinomzelllinien eine nur schwache SPARC-mRNA-Expression. Weiterhin wird in deren Studie mittels Immunhistochemie in einer normalen Ovargewebeprobe eine starke SPARC-Proteinexpression im Oberflächenepithel und in der darunter liegenden Tunica albuginea gezeigt. In diesem Zusammenhang wird SPARC auch als Tumorsuppressor diskutiert. [Mok, 1996]. Auch Socha et al. weisen eine in Ovarialkarzinomzelllinien gegenüber Zelllinien vom Oberflächenepithel erniedrigte oder fehlende SPARC-Expression nach [Socha, 2009]. Da Zelllinien auf molekularer Ebene noch nicht ausreichend charakterisiert wurden, und ihre



Genexpression möglicherweise eine Adaptation an die Kulturbedingungen widerspiegelt, besitzen deren Ergebnisse eine nur begrenzte Gültigkeit.

Yiu et al. berichten über eine vom verwendeten Antikörper abhängige geringe bis starke SPARC-Protein-Expression im Oberflächenepithel von Normalgewebeproben des Ovars und im Tumorepithel von benignen Ovarialtumoren und, mit Ausnahme einzelner Tumorzellen, keinen Nachweis von SPARC-Protein in den Tumorzellen der Ovarialkarzinome [Yiu, 2001].

Der Nachweis von SPARC-mRNA in den Tumorzellen eines Teils der Ovarialkarzinome in der vorliegenden Studie passt auch zu dem Nachweis des Proteins in den Tumorzellen, wie er in der Arbeit von Brown und Paley et al. [Brown, 1999, Paley, 2000] erfolgte. Die Arbeitsgruppe um Brown konnte weder im Oberflächenepithel noch in den Tumorzellen SPARC-mRNA nachweisen [Brown, 1999], aber SPARC-Protein im Oberflächenepithel und in den Tumorzellen von Ovarialkarzinomen. Brown et al. postulieren, dass das SPARC-Protein vom Stroma produziert und sezerniert wird, und von den Tumorzellen aufgenommen wird. Die Arbeitsgruppe um Paley [Paley, 2000] untersuchte die SPARC-Protein-Expression in Ovarialkarzinomen und Normalgeweben vom Ovar mittels Immunhistochemie. Eine schwache SPARC-Expression konnte nur im Oberflächenepithel von einem Normalgewebe vom Ovar und innerhalb der Tumorzellen in einigen Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie ist das benigne Tumorepithel in 33,3 % der Fälle schwach positiv. Dagegen finden Brown et al. in den Zystadenomzellen keine SPARC-mRNA. Yiu et al. berichteten über eine starke SPARC-Protein-Expression im Tumorepithel von benignen Ovarialtumoren [Brown, 1999; Yiu, 2001].

In der Literatur finden sich Hinweise, dass es mit maligner Transformation in Abhängigkeit vom Gewebe sowohl zu einem Abfall als auch zu einem Anstieg der SPARC-Expression im Epithel kommt [Bellahcene, 1995; Dhanesuan, 2002; Le Bail, 1999; Ledda, 1997; Porte, 1998; Porter, 1995; Rempel, 1999; Thomas, 2000; Wewer, 1988]. Demzufolge zeigt SPARC mit fortschreitender maligner Transformation des Epithels scheinbar kein einheitliches Muster der Deregulation, sondern eine für jedes Organ spezifische Expression.

### **5.3.4.1 Korrelation der SPARC-Expression im Epithel mit klinisch-histopathologischen Faktoren**

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom kommt es bei einer schwachen SPARC-Expression gegenüber einer fehlenden Expression in den Tumorzellen zu einer signifikanten ( $p = 0,023$ ) Zunahme des Auftretens und der Menge von Aszites und zu einer signifikanten ( $p = 0,013$ ) Zunahme an fortgeschrittenen Tumorstadien. Möglicherweise

führt die Zunahme des Auftretens und der Menge von Aszites zu erleichterter Tumorausbreitung und damit zu einer Diagnose der Erkrankung in einem eher fortgeschrittenen Tumorstadium. Im Gegensatz dazu zeigt eine aktuelle Studie, dass SPARC, vermutlich über die Hemmung der VEGF-MMP-Achse, die Aszitesbildung reduziert und die Zusammensetzung verändert [Said, 2011]. In der Studie von Socha et al. kommt es bei Abnahme von SPARC-Protein in den Tumorzellen von Ovarialkarzinomen zu einer zunehmenden Entdifferenzierung [Socha, 2009]. In der Arbeit von Massi et al. [Massi, 1999] über maligne Melanome korreliert eine starke SPARC-Protein-Expression signifikant mit der Inzidenz von Fernmetastasen und negativ mit dem Überleben.

### **5.3.4.2 Prognostische Bedeutung der SPARC-Expression im Epithel**

Die SPARC-Expression im Epithel ist univariat nicht signifikant mit dem Überleben verbunden. In der multivariaten Analyse haben Patientinnen mit einer schwachen SPARC-Expression in den Tumorzellen gegenüber Patientinnen ohne Expression ein signifikant längeres Überleben ( $p = 0,010$ ). SPARC werden in verschiedenen Studien antiproliferative, antiangiogenetische und tumorsuppressorische Eigenschaften zugeschrieben [Mok, 1996; Phelps, 2009; Said, 2005]. Auch wurde beschrieben, dass SPARC über eine Reduktion der Integrinexpression die Fähigkeit der Tumorzellen zur Adhäsion und Invasion reduziert [Said, 2007], was möglicherweise die längere Überlebenszeit von Patientinnen mit SPARC-exprimierenden Tumorzellen erklärt. Vergleichbare Studien zur prognostischen Bedeutung von SPARC im Tumorepithel von Ovarialkarzinomen liegen aktuell nicht vor. Im Tierversuch führt die Überexpression von SPARC mittels SPARC-Vektor in hepatozellulären Karzinomen zu einem längeren Überleben der Tiere [Atorrasagasti, 2009]. Dagegen bestehen beim Mammakarzinom [Watkins, 2005] und malignem Melanom [Massi, 1999] eine negative Korrelation zwischen der SPARC-Expression und dem Überleben.

### **5.3.5 SPARC-Expression im Stroma**

Das Stroma von Normalgewebe des Ovars zeigt in 55 % der Fälle eine schwache SPARC-Expression, in einem Fall keine Expression und in wenigen Fällen eine mäßige bis starke stromale Expression. Möglicherweise unterliegt die stromale SPARC-Expression zyklischen Veränderungen, zumal es v. a. in den Fibroblasten der Rindenzone exprimiert wird, in der die Follikelreifung stattfindet, während das darunterliegende Bindegewebe selten gefärbt ist. Auch

Oksjoki et al. [Oksjoki, 1999] beobachten eine zyklische Änderung der Zusammensetzung der EZM, als Korrelat einer normalen ovariellen Funktion. Brown et al. weisen dagegen mittels RNA-in-situ-Hybridisierung in allen acht Normalgeweben vom Ovar keine SPARC-mRNA im Stroma nach und Mok et al. beobachten SPARC-Protein in der Tunica albuginea [Brown, 1999; Mok, 1996] und vermuten, dass SPARC im Oberflächenepithel produziert und anschließend sezerniert wird. Paley et al. hingegen weisen auf Proteinebene in 29 % der 14 untersuchten Normalgewebe vom Ovar eine Protein-Expression im Tumorstroma nach [Paley, 2000]. Normalgewebe zeigen gegenüber primären Ovarialkarzinomen ( $p < 0,001$ ) und Ovarialkarzinomrezidiven ( $p < 0,001$ ) eine signifikant geringere SPARC-Expression im Stroma. Die stärkste SPARC-Expression ist im Bereich der Tumor-Stroma-Grenze nachzuweisen. Neu an den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist, dass das Stroma in Ovarialkarzinomrezidiven noch signifikant häufiger ( $p = 0,027$ ) eine intensive Färbung zeigt als das der primären Ovarialkarzinome. Der Unterschied zwischen der SPARC-Expression im Normal- und Tumorstroma wurde bereits von mehreren Autoren auf mRNA- und Protein-Ebene beschrieben und war in der Studie von Paley et al. auch statistisch signifikant [Brown, 1999; Paley, 2000; Porter, 1995; Yiu, 2001]. Auch in Karzinomen anderer Gewebe, wie z. B. der Brust und der erfolgt auf Proteinebene ein signifikanter Anstieg der stromalen SPARC-Expression bei der malignen Transformation [Porter, 1995]. SPARC ist ein u. a. extrazellulär regulatorisch wirkendes Glykoprotein, das Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt [Yan, 1999]. Es wurde gezeigt, dass SPARC die Aktivität von Gewebe modellierenden Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) moduliert [Motamed, 1999; Said, 2007]. MMPs degradieren sowohl die Basalmembran als auch weitere EZM und wurde erleichtert die Tumorzellproliferation und -invasion [Alexander, 1991; Murthi, 2004; Young, 1996]. In Ovarialkarzinomen ist die Überexpression der MMP-2 und MMP-9 mit Invasion, Metastasierung und einer schlechten Prognose assoziiert [Harefuah, 2003; Piura, 2003]. In vitro wurde gezeigt, dass SPARC über die Hemmung der VEGF-MMP-Achse eine auf Tumorzellen wachstumshemmende Wirkung hat, die Bildung eines nicht permissiven Stromas fördert, die Angiogenese hemmt und die Apoptoserate der Tumorzellen fördert [Chlenski, 2007; Said, 2011]. Möglicherweise stellt daher die in der vorliegenden Studie nachgewiesene starke stromale SPARC-Expression auch einen Schutzmechanismus des reaktiven Stromas vor Invasion dar, indem es VEGF bindet und deaktiviert, der Proteolyse der EZM entgegenwirkt und es zu einer verstärkten Tumorabgrenzung kommt. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass in SPARC-Knock-out Mäusen eingepflanzte Tumore schneller wachsen als im Wildtyp. Einige Studien zeigen, dass PDGF in Ovarialkarzinomen von Tumorzellen verstärkt sezerniert wird [Raines, 1992]. Stromazellen, die

durch PDGF aktiviert werden, unterstützen Tumorzellwachstum und induzieren die Tumorkonversion von normalen Keratinozyten [Skobe, 1998]. SPARC könnte über die Bindung von PDGF deren Verfügbarkeit und Assoziation mit seinem Rezeptor vermindern [Bonner, 1994] und damit die Wirkung des von den Tumorzellen sezernierten PDGF reduzieren.

Andererseits sezernieren Tumorzellen möglicherweise Botenstoffe, die im Stroma die Erhöhung des Antiadhäsins SPARC bewirken, das über eine veränderte EZM eine permissive Umgebung für die Tumorzellinvasion und Metastasierung schafft [Brekken, 2003]. Die Fähigkeit von Tumorzellen zu überleben, zur Migration, zur Invasion und evt. zur Kolonisation an sekundären Stellen ist abhängig von ihren Interaktionen mit der EZM und der Fähigkeit diese Umgebung entweder über die Bildung extrazellulärer Proteine oder deren Degradation über MMPs zu modifizieren. So ist nachvollziehbar, dass Tumorzellen im Ovarialkarzinomrezidiv ein stärker permissives Stroma herbeiführen müssen als primäre Ovarialkarzinome, um sich an diesem sekundären Ort „festsetzen“ zu können. Diese Hypothese könnte die in den Ergebnissen der vorliegenden Studie beobachtete signifikant stärkere SPARC-Expression im Stroma von Ovarialkarzinomezidiven begründen.

### **5.3.5.1 Korrelation der SPARC-Expression im Stroma mit klinisch-histopathologischen Faktoren**

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom kommt es mit zunehmender stromaler SPARC-Expression zum signifikanten Anstieg von CA 125 ( $p = 0,049$ ). Möglicherweise ist der Anstieg der stromalen SPARC-Expression als Reaktion auf eine zunehmende Tumorzellmasse und -invasion zu deuten, die sich in einem erhöhten CA 125 widerspiegelt. SPARC hemmt in der Studie von Said et al. [2011] die Fähigkeit von Tumorzellen zur Adhäsion, Invasion und Proliferation. Paley et al. [Paley, 2000] finden auf Proteinebene keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der stromalen SPARC-Expression in Ovarialkarzinomen und klinisch-histopathologischen Parametern. Es existiert keine Literatur zur Korrelation der SPARC-mRNA-Expression im Stroma von Ovarialkarzinomen mit klinisch-histopathologischen Parametern.

### **5.3.5.2 Prognostische Bedeutung der SPARC-Expression im Stroma**

Die SPARC-Expression im Stroma ist univariat nicht signifikant mit dem Überleben verbunden. In der multivariaten Analyse zeigen Patientinnen mit einer starken stromalen SPARC-Expression

gegenüber Patientinnen mit einer schwachen stromalen SPARC-Expression eine signifikante Zunahme der Überlebenszeit ( $p = 0,016$ ). Said et al. zeigen, dass SPARC auf Transkriptionsebene die VEGF-MMP-Expression hemmt und darüber möglicherweise die Fähigkeit der Tumorzellen zur Proliferation und Invasion einschränkt [Said, 2007], was das längere Überleben von Patientinnen mit starker stromaler SPARC-Expression erklären könnte. Weiterhin werden SPARC in verschiedenen Studien [Mok, 1996; Phelps, 2009; Said, 2005] antiproliferative, antiangiogenetische und tumorsuppressorische Eigenschaften zugeschrieben. Vergleichbare Studien zur prognostischen Bedeutung der stromalen SPARC-Expression von Ovarialkarzinomen liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor. Meyer et al. zeigen an Patientinnen mit B-Zell-Lymphom einen positiven Zusammenhang zwischen stromaler SPARC-Protein-Expression und rezidivfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben [Meyer, 2011]. Dagegen zeigen Koukourakis et al. an Patienten mit Bronchialkarzinomen eine negative Korrelation von stromaler SPARC-Protein-Expression und Überleben [Koukourakis, 2003].

### **5.3.6 SPARC-Expression im Endothel**

In der vorliegenden Studie wird SPARC-mRNA im Endothel von Kapillaren und Venolen exprimiert. Normalgewebe zeigen gegenüber primären Ovarialkarzinomen ( $p = 0,002$ ) und Ovarialkarzinomrezidiven ( $p = 0,002$ ) eine signifikant schwächere Expression im Endothel. In erwachsenen Säugetieren erfolgt das Auswachsen neuer Gefäße meist in pathologischen Prozessen wie Wundheilung, Entzündung oder Tumorwachstum. Eine Ausnahme bilden Uterus und Ovar in der reproduktiven Phase. In Normalgewebe vom Ovar wird SPARC in den unreifen Gefäßen des Corpus luteum nachgewiesen. Auch Bagavanoss et al. beobachteten, dass die Neovaskularisation im entstehenden Gelbkörper im Vergleich zum reifen Corpus Luteum mit einer stärkeren SPARC-Expression verbunden ist [Bagavandoss, 1998]. Der Nachweis von SPARC in angiogenetisch aktiven Gefäßen auf mRNA- und auf Proteinebene wurde bereits von mehreren Autoren in vivo und in vitro erbracht. In größeren Gefäßen wurde SPARC nicht nachgewiesen [Bagavandoss, 1998; Brown, 1999; Iruela-Arispe, 1991; Koukourakis, 2003; Lane, 1994 B; Reed, 1993]. Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit weisen mehrere Autoren auf Proteinebene in Endothelzellen verschiedener Normalgewebe eine schwache SPARC-Expression auf, während es zu einer verstärkten Expression in Endothelzellen maligner Tumoren, so auch vom Ovar, kommt [Brown, 1999; Kato, 2001; Porter, 1995; van Beijnum, 2009]. Bekannt ist, dass SPARC sowohl angio- als auch antiangiogenetische Eigenschaften aufweist [Lane, 1994 A]. Es unterbricht fokale Adhäsionen und erhöht in vitro die Permeabilität

vom Endothel. Der Verlust fokaler Kontakte führt zu F-Aktin abhängiger Zellabrundung, einhergehend mit dem Auftreten interzellulärer Lücken, die einen parazellulären Weg für Makromoleküle schaffen [Brekken, 2003; Goldblum, 1994; Kupprion, 1998; Lengyel, 2001; Motamed, 1998; Sage EH, 1992]. Dies könnte bedeuten, dass die erhöhte Expression von SPARC im Endothel von Ovarialkarzinomen über eine Permeabilitätserhöhung die Versorgung der Tumorzellen verbessert und die Metastasierung erleichtert und daher möglicherweise von den Tumorzellen induziert wird. Wird SPARC anschließend sezerniert und mittels Proteasen gespalten, könnten die entstehenden angiogenetisch wirkenden K(GHK)-Fragmente das Tumorstadium fördern [Iruela-Arispe, 1995; Lane, 1994 A; Sage EH, 2003]. Andererseits hemmt intaktes SPARC die VEGF-induzierte Proliferation der Endothelzellen [Brekken, 2003]. Es bindet direkt VEGF, einen potenten Stimulator der Angiogenese und unterbindet damit die Assoziation mit seinem Rezeptor. VEGF wird in Tumorzellen überexprimiert [Paley, 2000] und korreliert bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit einem kürzeren Gesamtüberleben [Chen, 1999]. Vermutlich wird SPARC nach seiner Synthese sezerniert und moduliert Adhäsion, Proliferation und Matrixdeposition. In undynamischen Geweben könnte intaktes SPARC über die Bindung von VEGF die Angiogenese hemmen, aber durch die Freisetzung von Proteasen, die in sich verändernden Geweben stark exprimiert werden, wird SPARC vermutlich gespalten. Diese Spaltprodukte führen möglicherweise zur Angiogenese und fördern damit das Tumorstadium.

### **5.3.6.1 Korrelation der SPARC-Expression im Endothel mit klinisch-histopathologischen Faktoren**

Im Kollektiv der Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom zeigt sich bei Zusammenfassung der FIGO-Stadien I und II, ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,003$ ) zwischen niedriger endothelialer SPARC-Expression und frühem FIGO-Stadium bzw. starker Expression und fortgeschrittenem Stadium III oder IV. Weiterhin kommt es mit zunehmender SPARC-Expression im Endothel zu einer signifikanten ( $p = 0,014$ ) Zunahme an entdifferenzierten Ovarialkarzinomen. Es existiert ein in der Signifikanzschwelle liegender Zusammenhang ( $p = 0,050$ ) zwischen dem Tumorstadium pT und der endothelialen SPARC-Expression. Mit Zunahme der SPARC-Expression im Endothel kommt es häufiger zum Vorhandensein eines fortgeschrittenen Tumorstadiums. Angiogenese ist die Voraussetzung für das Wachstum eines Karzinoms, je weniger ein Karzinom differenziert ist, desto schneller wächst es, so dass die in undifferenzierten und fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen erhöhte

endotheliale SPARC-Expression entweder im Sinne der Tumorzellen die Angiogenese fördert oder aber die angiogenetische Wirkung von VEGF vermindert und damit eine Schutzreaktion des Endothels darstellt.

### **5.3.6.2 Prognostische Bedeutung der SPARC-Expression im Endothel**

Die SPARC-Expression im Endothel von Ovarialkarzinomen ist univariat nicht signifikant mit dem Überleben verbunden, da mehr Patientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium waren. In der multivariaten Analyse haben Patientinnen mit einer starken endothelialen SPARC-Expression gegenüber Patientinnen mit einer schwachen bis negativen endothelialen Expression ein signifikant längeres Überleben ( $p = 0,028$ ). Möglicherweise führt die erhöhte endotheliale SPARC-Expression über die Hemmung von VEGF und damit die Hemmung der Endothelzellproliferation und -migration zu einer verminderten Vaskularisation und einem längeren Überleben. VEGF wird in Tumorzellen überexprimiert [Paley, 2000] und korreliert bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit einem kürzeren Gesamtüberleben [Chen, 1994]. Vergleichbare Studien zur prognostischen Bedeutung von SPARC im Endothel von Ovarialkarzinomen liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor.

## 5.4 Ausblick

Ovarialkarzinome bestehen aus heterogenen Zelltypen mit verschiedenen biologischen Eigenschaften. Epitheliale Zellen grenzen an Fibroblasten, Endothelzellen und extrazelluläre Matrix und bilden ein dynamisches Gewebgleichgewicht. Diese Gewebshomöostase unterscheidet sich auch bei Patientinnen mit histopathologisch sehr ähnlichen Karzinomen. Es ist daher wichtig, neben den morphologischen Eigenschaften eines Ovarialkarzinoms auch den genetischen Hintergrund zu erforschen. Einige in der Arbeit angesprochene Karzinomparameter sind in der Lage, begleitende Aussagen zum Krankheitsverlauf zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Expression der Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC während der malignen Transformation des Ovars verändert, und darüber entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung, das Tumorstadium, das Auftreten von Aszites und Fernmetastasen und zum Teil auch die Prognose der Patientin hat. So besteht bei Patientinnen mit positiver stromaler Thymosin  $\beta$ -10-Expression gegenüber Patientinnen ohne stromale Thymosin  $\beta$ -10-Expression eine vierfache Chance tumorfrei operiert zu werden. Mittels Expressionsanalysen zahlreicher Gene bei jeder Patientin mit Ovarialkarzinom sollte es künftig möglich sein, ein für jedes Ovarialkarzinom spezifisches Expressionsprofil zu erstellen, mit dem Rückschlüsse auf Ansprechbarkeit, Therapie und Prognose gezogen werden können. Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse der RNA-in-situ-Hybridisierung bestehen allerdings in der Tatsache, dass bei gleich bleibender RNA-Menge Mechanismen der Regulation des Proteins bestehen. Daher stellen immunhistochemische Untersuchungen eine sinnvolle methodische Ergänzung dar, um eine differenzielle Expression auch auf Protein-Ebene nachzuweisen. Um die Ergebnisse nachfolgender Studien besser miteinander vergleichen und auch die Sensitivität der verschiedenen Methoden beurteilen zu können, müsste bei sämtlichen Methoden (Northern-Blot, RNA-in-situ-Hybridisierung, Immunhistochemie) vom selben Patientengut ausgegangen werden. Zukünftig könnte auch die extrazelluläre Matrix in den Vordergrund einer medikamentösen Therapie rücken, denn die Fähigkeit von Tumorzellen zu überleben, zur Migration, zur Invasion und zur Metastasierung ist abhängig von der Interaktion mit der EZM und der Fähigkeit, diese entsprechend zu modifizieren. So wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Patientinnen mit starker stromaler SPARC-Expression gegenüber Patientinnen mit schwacher stromaler SPARC-Expression eine signifikante Zunahme der Überlebenszeit haben. Gelingt es künftig, die stromale SPARC-Expression therapeutisch zu beeinflussen, wäre eine Verlängerung des Überlebens denkbar.



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit zeigen die Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC im elektronischen Northern eine differenzielle Expression in Normalgewebe vom Ovar und Ovarialkarzinomen. Im MTN-Blot weisen beide Gene eine ubiquitäre Expression auf, was auf eine elementare Funktion in der Zelle hinweisen könnte. Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC sind an der Regulation des Aktinfilamentsystems beteiligt und beeinflussen darüber hinaus Apoptose und Angiogenese [Hall, 1995; Lee SH, 2005; Mok, 1996; Phelps, 2009; Said, 2005]. Sie haben wesentlichen Einfluss auf Zellmotilität und Proliferation und damit auf Tumorsuppression, Tumorentstehung und Tumorprogression. Im Dot-Blot und CPA wird die in normalen Ovarien und Ovarialkarzinomen differenzielle Expression teilweise bestätigt. Zur Bestimmung der zellulären Lokalisation der Genexpression erfolgt im Anschluss die RNA-in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten von Normalgeweben des Ovars, benignen Ovarialtumoren, primären und rezidierten Ovarialkarzinomen. Die Genexpression wird im Epithel, Stroma (Fibroblasten) und Endothel differenziert beschrieben. Die Bewertung der Genexpression erfolgt anhand eines Scores, kurz IRS genannt, der sich aus der prozentualen Positivität und der Intensität Thymosin  $\beta$ -10- bzw. SPARC-exprimierender Zellen zusammensetzt. Im Rahmen der statistischen Auswertung werden die erhobenen Expressionsdaten untereinander verglichen, mit klinisch-histopathologischen Parametern und unabhängigen Prognosefaktoren korreliert, und es wird der Einfluss auf das Überleben univariat und multivariat dargestellt.

Die mediane Nachbeobachtungszeit der Patientinnen mit einem primären Ovarialkarzinom betrug 29,7 Monate (Range 0,3 - 144,9 Monate) und mit einem rezidierten Ovarialkarzinom 61,2 Monate (Range 20,2 - 139,1 Monate). Innerhalb der Nachbeobachtungszeit verstarben 47 % aller Patientinnen mit einem primären und 94 % aller Patientinnen mit einem rezidierten Ovarialkarzinom. In der univariaten Analyse zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil für Patientinnen im FIGO-Stadium I/II gegenüber Patientinnen im FIGO-Stadium III oder IV ( $p < 0,001$ ), für Patientinnen mit makroskopischer Tumorfreiheit gegenüber Patientinnen mit postoperativen Tumorrest ( $p = 0,001$ ), für Patientinnen mit einem Aszitesvolumen  $\leq 500$  ml ( $p = 0,006$ ) oder ohne Aszites ( $p < 0,001$ ) gegenüber Patientinnen mit einem Aszitesvolumen  $> 500$  ml, für Patientinnen im Stadium pT1 ( $p = 0,026$ ) gegenüber Patientinnen im Stadium pT3, für Patientinnen ohne Metastasen ( $p = 0,001$ ) bzw. bei denen der Metastasierungsstatus nicht bekannt ist ( $p < 0,001$ ) gegenüber Patientinnen mit Metastasen, und für Patientinnen mit einem CA 125-Wert  $< 100$  U/ml ( $p = 0,02$ ) gegenüber Patientinnen mit einem CA 125-Wert von  $\geq 1000$  U/ml. Multivariat werden das FIGO-Stadium und der postoperative Tumorrest als

unabhängige Prognosefaktoren bestätigt. Patientinnen im FIGO-Stadium IV haben gegenüber Patientinnen im FIGO-Stadium I/II ein signifikant höheres Sterberisiko ( $p \leq 0,040$ ) und Patientinnen mit postoperativem Tumorrest haben gegenüber Patientinnen ohne postoperativen Tumorrest ein signifikant höheres Sterberisiko ( $p$  von 0,007 - 0,117).

### **Thymosin $\beta$ -10**

Normalgewebe des Ovars zeigen in 22 % der Fälle eine schwache Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Oberflächenepithel, und durchgängig eine starke Expression in Granulosa- und Thekazellen. Die epitheliale Expression nimmt bei den benignen Ovarialtumoren leicht zu, gefolgt von einer signifikant stärkeren Expression ( $p < 0,001$ ) in den Tumorzellen primärer und rezidivierter Ovarialkarzinome. Patientinnen mit Ovarialkarzinom und starker Thymosin  $\beta$ -10- Expression im Tumorepithel haben signifikant häufiger Metastasen, als Patientinnen mit geringer Expression ( $p = 0,015$ ; bei Ausschluss von MX ist  $p < 0,001$ ). Möglicherweise geht die bei der malignen Transformation des Ovars beobachtete Zunahme der epithelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression mit einer erhöhten Zelldynamik einher, die vermutlich für die Invasivität der Tumorzellen von Vorteil ist und schließlich zur Metastasierung führen kann.

Die stromale Thymosin  $\beta$ -10-Expression in Normalgewebe des Ovars ist signifikant stärker als in primären ( $p = 0,004$ ) und rezidivierten Ovarialkarzinomen ( $p < 0,001$ ). Der mit beginnender Malignität auftretende Rückgang der Stromalen Thymosin  $\beta$ -10-Expression stellt möglicherweise eine protektive Reaktion des Stromas auf die Invasion durch Tumorzellen dar, zumal mit abnehmender Thymosin  $\beta$ -10-Expression vermutlich die Verformbarkeit der Fibroblasten der EZM sinkt und damit eine für Invasion weniger attraktive Umgebung geschaffen wird.

Die Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel ist, unabhängig von der Dignität des Ovargewebes, auf eine schwache bis mäßige Färbung des angiogenetisch aktiven Endothels beschränkt. Patientinnen mit Ovarialkarzinom und mäßiger Thymosin  $\beta$ -10-Expression haben gegenüber Patientinnen mit einer schwachen oder fehlenden Expression signifikant häufiger Metastasen ( $p = 0,005$  bei Ausschluss von MX) und ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium ( $p = 0,036$ ). Möglicherweise führt die verstärkte endotheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression zu einer verstärkten Verformbarkeit der Endothelzellen, wie sie für die Angiogenese bei Tumorwachstum und Metastasierung benötigt werden.

Weder in der univariaten, noch in der multivariaten Analyse zeigt sich ein Einfluss der epithelialen, Stromalen oder endothelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression auf das Überleben.

### **SPARC**

Unabhängig von der Dignität des Ovargewebes ist die SPARC-Expression im Epithel schwach bis negativ. In prämenopausalen Ovarien wird es außerdem von den Granulosa- und Thekazellen der Follikel gebildet. SPARC werden in verschiedenen Studien antiproliferative, antiangiogenetische und tumorsuppressorische Eigenschaften zugeschrieben [Mok, 1996; Phelps, 2009; Said, 2005]. In der multivariaten Analyse haben Patientinnen mit einer schwachen SPARC-Expression in den Tumorzellen gegenüber einer fehlenden Expression ein signifikant geringeres Sterberisiko ( $p = 0,010$ ). Andererseits werden Patientinnen mit Ovarialkarzinom und einer schwachen SPARC-Expression in den Tumorzellen signifikant häufiger erst in fortgeschrittenen Tumorstadien ( $p = 0,013$ ) und mit größeren Aszitesmengen entdeckt ( $p = 0,023$ ).

Das Stroma im Normalgewebe des Ovars zeigt in 55 % der Fälle eine schwache SPARC-Expression. Die stromale SPARC-Expression nimmt zu den benignen Ovarialtumoren hin zu, gefolgt von einem signifikanten Anstieg ( $p < 0,001$ ) in primären und rezidierten Ovarialkarzinomen. In rezidierten Ovarialkarzinomen ist die stromale SPARC-Expression signifikant häufiger stark als in primären Ovarialkarzinomen ( $p = 0,027$ ). Die stärkste SPARC-Expression ist im Bereich der Tumor-Stroma-Grenze nachzuweisen. Patientinnen mit Ovarialkarzinom haben bei zunehmender stromaler SPARC-Expression einen signifikanten Anstieg von CA 125 ( $p = 0,049$ ). In der multivariaten Analyse zeigen Patientinnen mit einer starken gegenüber Patientinnen mit einer schwachen stromalen SPARC-Expression eine signifikante Zunahme der Überlebenszeit ( $p = 0,016$ ). Die Rolle der EZM bei der Invasivität und Metastasierung eines Tumors ist weitgehend unbekannt. Es wurde gezeigt, dass SPARC die Aktivität von Gewebe modellierenden Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) beeinflusst [Said, 2007]. Möglicherweise stellt die in der vorliegenden Studie nachgewiesene starke stromale SPARC-Expression einen Schutzmechanismus des reaktiven Stromas vor Invasion dar, indem es zu einer verstärkten Tumorabgrenzung kommt. Das könnte auch die Zunahme der SPARC-Expression bei ansteigendem CA 125, stellvertretend für eine Zunahme der Tumormasse, erklären.

Im Endothel wird SPARC von Kapillaren und Venolen exprimiert. Dabei ist die Expression im Endothel von Normalgewebe des Ovars in 78 % schwach, nimmt zu den benignen Ovarialtumoren hin leicht zu, gefolgt von einer signifikanten Zunahme bei primären ( $p = 0,002$ ) und rezidierten Ovarialkarzinomen ( $p = 0,002$ ). Patientinnen mit Ovarialkarzinom und starker endothelialer SPARC-Expression haben gegenüber Patientinnen mit schwacher Expression bei Zusammenfassung der FIGO-Stadien I und II signifikant häufiger ein fortgeschrittenes FIGO-

Stadium III oder IV ( $p = 0,003$ ) und entdifferenzierte Ovarialkarzinome ( $p = 0,014$ ). In der multivariaten Analyse haben Patientinnen mit einer starken endothelialen SPARC-Expression gegenüber Patientinnen mit einer schwachen bis negativen Expression ein signifikant längeres Überleben ( $p = 0,028$ ). Angiogenese ist die Voraussetzung für das Wachstum eines Karzinoms, je geringer ein Karzinom differenziert ist, desto schneller wächst es vermutlich, so dass die in undifferenzierten und fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen erhöhte endotheliale SPARC-Expression entweder im Sinne der Tumorzellen die Angiogenese fördert oder aber die angiogenetische Wirkung von VEGF vermindert wird und damit eine Schutzreaktion des Endothels darstellt. Möglicherweise führt die Hemmung von VEGF und damit die Hemmung der Vaskularisation auch zu dem längeren Überleben der Patientinnen mit starker endothelialer SPARC-Expression [Kupprion, 1999, Lane, 1994 Said, 2007].

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
blast	" <b>B</b> asic <b>L</b> ocal <b>A</b> lignment <b>S</b> earch <b>T</b> ool"
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
cDNS	complementary DNS (komplementäre Desoxyribonucleinsäure)
Contig	"Contiguous sequence"
CPA	Cancer Profiling Array
cpm	counts per minute
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-Triphosphat
ddNTP	2', 3'-Dideoxy-nucleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag
EZ	Endothelzelle
EZM	extrazelluläre Matrix
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HR	hazard ratio
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	demineralisiertes Wasser
i. G.	im Gegensatz
in silico	virtuell, per Computer generiert
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
K(GHK)	N-Glycyl-L-histidyl-L-Lysin-OH
Lsg.	Lösung
LB	Luria-Bertoni

min	Minute
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MOPS	3- (Morpholino) propansulfonsäure
mRNS	messenger RNS (Boten-Ribonukleinsäure)
MTN	Multi Tissue Northern
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOS	no other specification
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	platelet derived growth factor
pH	pondus hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
Poly A+ RNS	polyadenylierte Ribonukleinsäure
r. E.	relatives Expressionslevel
RNase A	Ribonuklease A
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPARC	secreted protein, acidic, rich in cystein
SSC	Saline Sodium Chloride
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylglycin
U	Einheit (enzymatische Aktivität)
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
5-JÜR	5-Jahresüberleben

## 8 Literaturverzeichnis

**AGO** (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie), Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. 2007;2.

**Alldinger I**, Dittert D, Peiper M et al. Gene expression analysis of pancreatic cell lines reveals genes overexpressed in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2005;5(4-5):370-9.

**Arnold N**, Hagele L, Walz L et al. Overrepresentation of 3q and 8q material and loss of 18q material are recurrent findings in advanced human ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16(1):46-54.

**Arnold S**, Mira E, Muneer S et al. Forced expression of MMP9 rescues the loss of angiogenesis and abrogates metastasis of pancreatic tumors triggered by the absence of host SPARC. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008 Jul;233(7):860-73.

**Atorrasagasti C**, Malvicini M, Aquino JB et al. Overexpression of SPARC obliterates the in vivo tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2009 Oct 14.

**Bagavandoss P**, Sage EH, Vernon RB et al. Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) and Thrombospondin in the Developing Follicle and Corpus Luteum of the Rat. *J Histochem Cytochem*, 1998;46(9):1043-9.

**Bellahcene A**, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol* 1995;146(1):95-100.

**Berek JS**, Bertelsen K, du Bois A et al. Advanced epithelial ovarian cancer: 1998 consensus statements. *Ann oncol* 10 (suppl 1)1999;87-92.

**Bonfield JK**, Smith K, Staden R et al. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res* 1995 Dec 25;23(24):4992-9.

**Bonner JC**. Regulation of platelet-derived growth factor (PDGF) and alveolar-macrophage-derived PDGF by alpha 2-macroglobulin. *Ann N Y Acad Sci* 1994;737:324-38.

**Bradshaw AD**, Francki A, Motamed K et al. Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Molec Biol Cell* 1999;10:1569-79.

**Brekken RA**, Puolakkainen P, Graves DC et al. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 2003;111(4):487-95.

**Bristow RE**, Tomacruz RS, Armstrong DK et al. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002;20(5):1248-59.

- Brown TJ**, D Ph, Shaw PA et al. Activation of SPARC Expression in Reactive Stroma Associated with Human Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology* 1999;75:25-33.
- Brun JL**, Feyler A, Chêne G et al. Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000;78(1):21-7.
- Busch E**, Hohenester E, Timpl R et al. Calcium Affinity, Cooperativity, and Domain Interactions of Extracellular EF-hands Present in BM-40. *J Biol Chem* 2000;275(33):25508-15.
- Califano D**, Monaco C, Santelli G et al. Thymosin  $\beta$ -10 Gene Overexpression Correlated with the Highly Malignant Neoplastic Phenotype of Transformed Thyroid Cells in Vivo and in Vitro. *Cancer Research* 1998;58:823-8.
- Carlson J**, Roh MH, Chang MC et al. Recent advances in the understanding of the pathogenesis of serous carcinoma: the concept of low- and high-grade disease and the role of the fallopian tube. *Diagn Histopathol (Oxf)*. 2008 Aug;14(8):352-365.
- Carpintero P**, del Amo FF, Anadon R et al. Thymosin  $\beta$ -10 mRNA expression during early postimplantation mouse development. *FEBS Letters* 1996;394:103-6.
- Chen CA**, Cheng WF, Lee CN et al. Serum Vascular Endothelial Growth Factor in Epithelial Ovarian neoplasms: Correlation with Patient Survival. *Gynecol Oncol* 1999;74(2):235-40.
- Chi DS**, Liao JB, Leon LF et al. Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;82(3):532-7.
- Chlenski A**, Guerrero LJ, Yang Q et al. SPARC enhances tumor stroma formation and prevents fibroblast activation. *Oncogene* 2007 Jul 5;26(31):4513-22.
- Chouaib S**, Kieda C, Benlalam H et al. Endothelial cells as key determinants of the tumor microenvironment: interaction with tumor cells, extracellular matrix and immune killer cells. *Crit Rev Immunol*, 2010;30(6):529-45.
- Cramer DW**, Libermann RF, Titus-Ernstoff L et al. Genital talc exposure and risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* 1999;81(3):351-6.
- Dhanesuan N**, Sharp JA, Blick T et al. Doxycycline-inducible expression of SPARC/Osteonectin/ BM-40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition. *Breast Cancer Res Treat* 2002;75(1):73-85.
- Ferlay J**, Autier P, Boniol M et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18(3):581-92.
- Francki A**, Bradshaw AD, Bassuk JA et al. SPARC Regulates the Expression of Collagen Type I and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Mesangial Cells. *J Biol Chem* 1999;274(45):32145-52.



- Friedrich M.** Manual Gynäkologische Onkologie. In: K. Diedrich, ed. 1st ed. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2005.
- Fujita M,** Enomoto T, Murata Y et al. Genetic alterations in ovarian carcinoma: with specific reference to histological subtypes. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202:97-99.
- Funk SE,** Sage EH. Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993;154:53-63.
- Giannios J,** Ioannidou-Mouzaka L. Molecular aspects of breast and ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 1997;18(5):387-93.
- Giatromanolaki A,** Sivrididis E, Koukourakis MI et al. The pathology of tumor stromatogenesis. *Cancer Biol Ther* 2007;Jun 26,6(6).
- Goldblum SE,** Ding X, Funk SE et al. SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) regulates endothelial cell shape and barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3448-52.
- Gooden MD,** Vernon RB, Bassuk JA et al. Cell-cycle dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 1999;74(2):152-67.
- Gu Y,** Wang C, Wang Y et al. Expression of thymosin beta-10 and its role in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2009 Jan;40(1):117-24.
- Hall AK.** Differential expression of thymosin genes in human tumors and in the developing human kidney. *Int J Cancer* 1991 A;48(5):672-7.
- Hall AK,** Aten R, Behrman HR et al. Thymosin gene expression is modulated by pregnant mare's serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and prostaglandin F2 alpha in the immature rat ovary. *Endocrinology* 1991 B;128(2):951-7.
- Hall AK.** Influence of cyclic AMP and serum factors upon expression of a retinoid-responsive gene in neuroblastoma cells. *J Mol Neurosci* 1992;3:155-63.
- Hall AK.** Thymosin beta-10 accelerates apoptosis. *Cell Mol Biol Res* 1995;41(3):167-80.
- Hall AK.** Liarozole amplifies retinoid-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Anticancer Drugs* 1996;7(3):312-20.
- Harter P,** du Bois A, Hahmann M et al. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) Deskto Ovar trial. *Ann Surg Oncol* 2006;13(12):1702-10.
- Hasselaar P,** Loskutoff DJ, Sawdey M et al.: SPARC induces the expression of of type 1 plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic cells. *J Biol Chem* 1991;266:13178-84.
- Hasselaar P,** Sage EH. SPARC antagonizes the effect of bFGF on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* 1992;49:272-83.

- Heintz AP**, Odicino F, Maisonneuve P et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;95:161-92.
- Holland PW**, Harper SJ, Mc Vey JH et al.: In vivo expression of mRNA for the Ca<sup>++</sup>-binding protein SPARC (osteonectin) revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 1987;105:473-82.
- Holschneider CH**, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors, *Semin Surg Oncol* 2000;19(1):3-10.
- Höltke H-J**, Kessler C. Nonradioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin; hybridization and ELISA-based detection. *Nucleic Acid Res* 1990;18:5843-51.
- Iguchi K**, Hamatake M, Ishida R et al. Induction of necrosis by zinc in prostate carcinoma cells and identification of proteins increased in association with this induction. *Eur J Biochem* 1998; 253(3):766-70.
- Iruela-Arispe ML**, Hasselaar P, Sage H et al. Differential expression of extracellular proteins is correlated with angiogenesis in vitro. *Lab Investig* 1991;64:174-86.
- Iruela-Arispe ML**, Lane TF, Redmond D et al. Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis in vitro. *Mol Biol Cell* 1995;6:327-43.
- Iruela-Arispe ML**, Vernon RB, Wu H. Type-I-collagen deficient mov 13 mice do NOT retain sparc in the extracellular matrix: implication for fibroblast function. *Dev Dyn* 1996;207:171-83.
- Iwabuchi H**, Sakamoto M, Sakunaga H et al. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* 1995;55(24):6172-80.
- Kato Y**, Lewalle J-M, Baba Y et al. Induction of SPARC by VEGF in Human Vascular Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res* 2001;287:422-6.
- Kaufmann M**, Costa SD, Scharl A et al. Ausbreitungsformen des Ovarialkarzinoms. *die Gynäkologie* 2006; 2. Auflage, Kapitel 26:421.
- Kiechle M**, Epidemiologie, Genetik und Prävention des Ovarialkarzinoms. *der Onkologe*, 2002;1142-1148.
- Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie**. Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren, 2010.
- Koukourakis MI**, Giatromanolaki A, Brekken RA et al. Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis. *Cancer Res* 2003;63(17):5376-80.
- Kreienberg R**, du Bois A, Schmalfeldt B et al. Management des Ovarialkarzinoms: interdisziplinäres Vorgehen. 2009;6:54.

- Krtolica A**, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(11):1401-14.
- Kuhn W**, Schmalfeldt B, Reuning U et al. Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer* 1999; 79:1746-51.
- Kupprion C**, Motamed K, Sage HE et al. SPARC (BM-40, Osteonectin) Inhibits the Mitogenic Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Microvascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* 1998;273(45):29635-40.
- Lane TF**, Iruela-Arispe ML, Sage EH et al. Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro: changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 1992;267:16736-45.
- Lane TF**, Iruela-Arispe ML, Johnson RS et al. SPARC Is a Source of Copper-binding Peptides that Stimulate Angiogenesis. *J Cell Biol* 1994 A;125(4):929-43.
- Lane TF**, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 1994 B;8:163-73.
- La Vecchia C**, Decarli A, Negri E et al. Dietary factors and the risk of epithelial ovarian cancer. *J Nat Cancer Inst* 1987;70:663-9.
- Le Bail B**, Faouzi S, Boussari L et al. Osteonectin/SPARC is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 1999;189:46-52.
- Ledda F**, Bravo AI, Adris S et al. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1997;108(2):210-4.
- Lee SH**, Zang W, Choi JJ et al. Overexpression of the thymosin  $\beta$ -10 gene in human ovarian cancer cells disrupts F-Actin stress fibers and leads to apoptosis. *Oncogene* 2001;20:6700-6.
- Lee SH**, Son MJ, Oh SH et al. Thymosin  $\beta$ -10 inhibits angiogenesis and tumor growth by interfering with ras function. *Cancer Res* 2005;65:137-147.
- Lee SW**, Tomasetto C, Sager R et al. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2825-2829.
- Lengyel E**, Schmalfeldt B, Konik E et al. Expression of latent matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001 Aug;82(2):291-8.
- Levanon K**, Crum C et al. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact, *J Clin Oncol* 2008;26(32):5284-93.
- Liaw L**, Crawford HC. Functions of the extracellular matrix and matrix degrading proteases during tumor progression. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(7):805-12.

- Lichtenegger W**, Sehouli J, Buchmann E et al. Operative results after primary and secondary debulking-operations in advanced ovarian cancer (AOC). *J Obstet Gynaecol Res* 1998; 24(6):447-51.
- Liotta LA**, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411(6835):375-9.
- Liu CR**, Ma CS, Ning JY et al. Differential thymosin beta 10 expression levels and actin filament organization in tumor cell lines with different metastatic potential. *Chin Med J* 2004 Feb;117(2):213-8.
- Lodish H**, Baltimore D, Berk A et al. in: *Molekulare Zellbiologie*, de Gruyter, 2. Aufl., Berlin 1996.
- Macchiarini P**, Fontanini G, Hardin MJ et al. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992;340:145-6.
- Maeda K**, Chung YS, Takatsuka S et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995;13:477-81.
- Maelan AE**, Rasmussen TK, Larsson LI. Localization of thymosin beta10 in breast cancer cells: relationship to actin cytoskeletal remodeling and cell motility. *Histochem Cell Biol* 2007 Jan; 127(1):109-13.
- Makar APH**, Baekelandt M, Trope CG et al. The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO Stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1995;56:175-80.
- Massi D**, Franchi A, Borgognoni L et al. Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol* 1999;30(3):339-44.
- Maurer P**, Mayer U, Bruch M et al. High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDA basement membrane glycoprotein (BM-40/SOARC/osteonectin). *Eur J Biochem* 1992;205:233-40.
- Maurer P**, Hohenadl C, Hohenester E et al. The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously-folding and crystallizable domain that binds calcium and collagen IV. *J Mol Biol* 1995;253:347-57.
- Mayr D**, Diebold J. Grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2000 oct;19(4):348-53.
- McClung HM**, Thomas SL, Osenkowski P et al. SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neuroscience Letters* 2007 May; 29(2):172-7.

- Meyer PN**, Fu K, Greiner T et al. The stromal cell marker SPARC predicts for survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Am J Clin Pathol* 2011 Jan; 135(1):54-61.
- Mok SC**, Chan WY, Wong KK et al. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene* 1996;12:1895-901.
- Morch LS**, Lokkegaard E, Andreasen AH et al. Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA*. 2009;302(3):298-305.
- Motamed K**, Sage EH. SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *J Cell Biochem* 1998;70:543-52.
- Motamed K**. SPARC (osteonectin/BM-40). *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1363-6.
- Mu H**, Ohashi R, Yang H et al. Thymosin beta10 inhibits cell migration and capillary-like tube formation of human coronary artery endothelial cells. *Cell Motil Cytoskelet* 2006 Apr; 63(4):222-30
- Murthi P**, Barker G, Nowell CJ et al. Plasminogen fragmentation and increased production of extracellular matrix-degrading proteinases are associated with serous epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol* 2004,92(1):80-8.
- Narod SA**, Feunteun J, Lynch HT et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* 1991;338:82-3.
- Narod SA**, Risch J, Moslehi R et al. Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. *N Engl J Med* 1998;339:424-8.
- Ng KW**, Manji SS, Young MF et al. Opposing influences of glucocorticoid and retinoid acid on transcriptional control of pre-osteoblasts. *Mol endocrinol* 1989;3:2079-85.
- Nomura S**, Hashmi S, Mc Vey JH et al. Evidence for positive and negative regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the mouse SPARC (osteonectin) gene. *J Biol Chem* 1989;264: 12201-7.
- Oksjoki S**, Sallinen S, Vuorio E et al. Cyclic expression of mRNA transcripts for connective tissue components in the mouse ovary. *Mol Hum Repro* 1999;5(9):803-8.
- Olivarez D**, Ulbright T, De Riese W et al. Neovascularization in clinical stage A testicular germ cell tumor - prediction of metastatic disease. *Cancer Res* 1994;54:2300-2.
- Omura GA**, Brady MF, Homesley HD et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the gynaecologic oncology group experience. *J Clin Oncol* 1991 Jul;9(7):1138-50.
- Otto AM**, Müller CS, Huff T et al. Chemotherapeutic drugs change actin skeleton organization and the expression of beta-thymosins in human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002 May;128(5):247-56.

- Paley PJ**, Staskus KA, Gebhard K et al. Vascular endothelial growth factor expression on early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;80:98-106.
- Paley PJ**, Goff BA, Gown AM et al. Alterations in SPARC and VEGF Immunoreactivity in Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology* 2000;78:336-41.
- Pfisterer J**, du Bois A. Das Ovarialkarzinom: therapeutische Standards - klinische Empfehlungen. 1st ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag, 2002.
- Piura B**, Rabinovich A, Huleihel M et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in malignancies of the female genital tract. *Harefuah* 2003;142(11):786-91.
- Porte H**, Triboulet JP, Kotelevets L et al. Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Clin Cancer Res* 1998; 4(6):1375-82.
- Porter PL**, Sage EH, Lane TF et al. Distribution of SPARC in normal and neoplastic tissue. *J Histochem Cytochem* 1995;43(8):791-800.
- Puls LE**, Duniho T, Hunter JE et al. The prognostic implication of ascites in advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1996;61(1):109-12.
- Purdie D**, Green A, Bain C et al. Reproductive and other factors and risk of epithelial ovarian cancer: an Australian case-control study. *Int J Cancer* 1995;62:678-84.
- Quaranta V**, Giannelli G. Cancer invasion: watch your neighbourhood! *Tumori* 2003; 89(4),343-8.
- Raines EW**, Lane TF, Iruela-Arispe ML et al. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1281-5.
- Reed MJ**, Puolakkainen P, Lane TF et al. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1467-77.
- Remmele W**, Stegner HE: Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 1987 May; 8(3):138-40.
- Rempel SA**, Ge S, Gutierrez JA et al. SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res* 1999;5(2):237-41.
- RKI 2010**, Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends, 7. Ausgabe Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Runnebaum IB**, Stickeler E. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127(2):73-9.

- Sage EH**, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin and thrombospondin. *J Biol Chem* 1991;266:14832-4.
- Sage EH**. Secretion of SPARC by endothelial cells transformed by polyoma middle T oncogene inhibits the growth of normal endothelial cells in vitro. *Biochem Cell Biol* 1992;70:579-92.
- Sage EH**, Reed M, Funk SE et al. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. *J Biol Chem* 2003 Sep;278(39):37849-57.
- Sage EH**, Vernon RB, Funk SE et al. SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca<sup>2+</sup>-depending binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989;109:341-56.
- Said N**, Socha MJ, Olearczyk JJ et al. Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* 2007 Oct;5(10):1015-30.
- Salhab M**, Papillier P, Perreau C et al. Thymosin  $\beta$ -4 and  $\beta$ -10 are expressed in bovine ovarian follicles and upregulated in cumulus cells during meiotic maturation. *Reprod Fertile Dev* 2010; 22(8):1206-21.
- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992;24:104-8.
- Santelli G**, Califano D, Chiappetta G et al. Thymosin  $\beta$ -10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999;155:799-804.
- Santelli G**, Bartoli PC, Giuliano A et al. Thymosin  $\beta$ -10 protein synthesis suppression reduces the growth of human thyroid carcinoma cells in semisolid medium. *Thyroid* 2002;12(9):765-72.
- Saretzki G**, Hoffmann U, Rohlke P et al. Identification of allelic losses in benign, borderline, and invasive epithelial ovarian tumors and correlation with clinical outcome. *Cancer* 1997; 80(7):1241-9.
- Schildkraut JM**, Halabi S, Bastos E et al. Prognostic factors in early-onset epithelial ovarian cancer: a population-based study. *Obstet Gynecol* 2000;95(1):119-27.
- Schmalfeldt B**, Pfisterer J. Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. K.O.d.A.G.O. e.V. ed. 1ed. W. Zuckschwerdt Verlag, 2007.
- Schmidt D**. Ovarialtumoren. *Der Pathologe* 2007;28:178-179.
- Schmitt AO**, Specht T, Dahl E et al. Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues. *Nucleic Acids Res* 1999;27(21):4251-60.
- Scully RE**, Young RH, Clement PhB et al. Atlas of tumor pathology: Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament. AFIP, Washington D. C. 1998.

- Scully RE**, Sobin LH et al. International histological classification of tumours. Histological typing of ovarian tumours, World Health Organization (WHO), Springer, Heidelberg 1999.
- Sehoul J**, Könsgen D, Mustea A et al. "IMO"- intraoperative mapping of ovarian cancer. *Zentralbl Gynakol* 2003;125(3-4):129-35.
- Sehoul J**, Mustea A, Könsgen D et al. Conventional and experimental prognostic factors in ovarian cancer. *Zentralbl Gynakol* 2004;126(5):315-22.
- Skobe M**, Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1050-5.
- Smith GW**, Gentry PC, Long DK et al. Differential gene expression within the ovine corpus luteum: identification of secreted protein acidic and rich in cysteine as a major product of small but not large luteal cells. *Endocrinology* 1996;137(2):755-62.
- Socha MJ**, Said N, Dai Y et al. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia* 2009;11(2):126-135.
- Southern EM**. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-17.
- Stournaras C**, Stiakaki E, Koukouritaki SB et al. Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B. *Biochem Pharmacol* 1996 Nov 8;52(9):1339-46.
- Takano T**, Hasegawa Y, Miyauchi A et al. Quantitative Analysis of Thymosin beta-10 Messenger RNA in Thyroid Carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32(7):229-32.
- Termine JD**, Kleinman HK, Whitson SW et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26 1981;99-105.
- Thomas R**, True LD, Bassuk JA et al. Differential Expression of Osteonectin/SPARC during Human Prostate Cancer Progression. *Clin Cancer Res* 2000;6:1140-49.
- Tremble PM**, Lane TF, Sage EH et al. SPARC, a Secreted Protein Associated with Morphogenesis and Tissue Remodeling, Induces Expression of Metalloproteinases in Fibroblasts Through a Novel Extracellular Matrix-dependant Pathway. *J Cell Biol* 1993;121:1433-44.
- Tuhkanen H**, Anttila M, Kosma VM et al. Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int J Cancer* 2004;109(2):247-52.
- Van Beijnum JR**, Petersen K, Griffioen AW. Tumor endothelium is characterized by a matrix remodeling signature. *Front Biosci* 2009 Jun 1;1:216-225.



- Vasile E**, Tomita Y, Brown LF et al. Differential expression of thymosin  $\beta$ -10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J* 2001;15:458-66.
- Vassiliadou I**, Leondiadis L, Ferderigos N et al. Investigation of the epitopic structure of thymosin beta 10 by epitope mapping experiments. *Peptides* 1999;20(3):411-4.
- Verghese-Nikolakaki S**, Apostolikas N, Livaniou E et al. Preliminary findings on the expression of thymosin beta-10 in human breast cancer. *Br J Cancer* 1996;74(9):1441-4.
- Viglietto G**, Califano D, Bruni P et al. Regulation of thymosin beta10 expression by TSH and other mitogenic signals in the thyroid gland and in cultured thyrocytes. *Eur J Endocrinol* 1999; 140(6):597-607.
- Wang J**, Pelling AE. Cell sheet integrity and nanomechanical breakdown during programmed cell death. *Med Biol Eng Comput* 2010;48(10):1015-22.
- Warrington JA**, Bengtsson U. High-resolution physical mapping of human 5q31-q33 using three methods: radiation hybrid mapping, interphase fluorescence in situ hybridization, and pulsed-field gel electrophoresis. *Genomics* 1994;24(2):395-8.
- Watkins G**, Douglas-Jones A, Bryce R et al. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005 Apr; 72:267-272.
- Weidner N**, Carrol PR, Flax J et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401-9.
- Weterman MA**, van Muijen GN, Ruiter DJ et al. Thymosin beta-10 expression in melanoma cell lines and melanocytic lesions: a new progression marker for human cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1993;53(2):278-84.
- Wewer UM**, Albrechtsen R, Fisher LW et al. Osteonectin/SPARC/BM-40 in human decidua and carcinoma, tissues characterized by de novo formation basement membrane. *Am J Pathol* 1988; 132:345-55.
- Workman G**, Sage EH. Identification of a sequence in the matricellular protein SPARC that interacts with the scavenger receptor stabilin-1. *J Cell Biochem* 2011;112(4):1003-8.
- Wrana JL**, Overall CM, Sodek J et al. Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. *Eur J Biochem* 1991;197:519-28.
- Yan Q**, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999;47(12):1495-506.

- Yiu GK**, Chan WY, Ng SW et al. SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian Cancer Cells. *Am J Pathol* 2001;159:609-22.
- Yoneda J**, Kuniyasu H, Crispens MA et al. Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(6):447-54.
- Yost JC**, Sage EH. Specific interaction of SPARC with endothelial cells is mediated through a carboxyl-terminal sequence containing a calcium-binding EF hand, *J Biol Chem* 1993, 268(34):25790-6.
- Young TN**, Rodriguez GC, Rinehart AR et al. Characterization of gelatinases linked to extracellular matrix invasion in ovarian adenocarcinoma: purification of matrix metalloproteinase 2. *Gynecol Oncol* 1996;62(1):89-99.
- Yu FX**, Lin SC, Morrison-Bogorad M et al. Effects of thymosin beta 4 and thymosin beta 10 on actin structures in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994;27(1):13-25.
- Yu FX**, Lin SC, Morrison-Bogorad M et al. Thymosin beta 10 and thymosin beta 4 are both actin monomer sequestering proteins. *J Biol Chem* 1993;268:502-9.
- Zachary JM**, Cleveland G, Kwock L et al. Actin filament organization of the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma system: correlation with metastatic potential. *Cancer Res* 1986; 46(2):926-32.
- Zhang T**, Li X, Yu W et al. Overexpression of thymosin beta-10 inhibits VEGF mRNA expression, autocrine VEGF protein production, and tube formation in hypoxia-induced monkey choroid-retinal endothelial cells. *Ophthalmic Res* 2009;41(1):36-43.

## 9 Anhang

### 9.1 Puffer und Lösungen und Medien

**LB (Luria Bertoni)-Flüssigmedium:** 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefe-Extrakt, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O auf pH 7,5 einstellen

**LB-Agar-Platten:** 10 g, Bacto-Trypton, 10 g, NaCl, 5 g Hefe-Extrakt, 15 g Bacto-Agar, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O auf pH 7,5 einstellen

Nach Bedarf wurde dem Medium nach Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

**Agaroselösung für DNS-Gele:** 0,8-2 % (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer

**RNS-Gel:** 0,7 g Agarose in 61,25 ml H<sub>2</sub>O aufkochen, abkühlen lassen, 7 ml 10x MOPS zugeben, wenn die Gellsg. auf 50 °C abgekühlt ist, 1,75 ml Formaldehyd zugeben kurz bevor Gel fest wird, sofort gießen und 1 h härten lassen

**RNS-Laufpuffer:** 350 ml 1x MOPS-Puffer

**RNS-Ladepuffer:** 50 % Glycerin, 1,0 mM EDTA, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanol

**MOPS-Puffer 10x:** 200 mM 3 (N-Morpholono)-Propansulfonsäure, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, mit 10 N NaOH pH 7,0 einstellen, Flasche in Alufolie wickeln und 1 h autoklavieren

**DNS Gel-Ladepuffer 6 x:** 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerol in 1x TBE-Puffer

**Ethidiumbromidlösung:** 10 mg/ml Stocklsg. in H<sub>2</sub>O, dann 3µl pro Gel

**10 x TBS:** 25ml Tris-HCl (pH 7,4), 80g NaCl, 2g KCl, H<sub>2</sub>O ad 1000 ml, pH-Wert ca. 7,4, filtrieren, 1h autoklavieren

**1 M Phosphatpuffer (pH 7,2):** 60,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 21,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

**PBS/Tween 20:** 1000 ml PBS, 6 ml 10 % (v/v) Tween 20

**50 x TAE-Puffer:** 2 M Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0 (eingestellt mit HCl)

**10 x PBS:** 160 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 M NaCl, pH 7,5

**20 x SSC:** 3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat, pH 7,0 H<sub>2</sub>O ad 500 ml

**10 x TE-Puffer:** 100 mM Tris (pH 7,5), 10 ml 1 mM EDTA (pH 8,0), auf 1 l mit H<sub>2</sub>O

**10 x TBE:** 54,45 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O

**Qiagen Puffer:** P1 (plus RNase A, 100mg/ml), P2 (keine weiteren Angaben), P3 (keine weiteren Angaben), PE(keine weiteren Angaben), EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5)

**Hybridisierungspuffer:** 25 ml Formamid (USB 75828, low conductivity) bei -20 °C, 7,5 ml 5M NaCl (USB 21618), 5,0 ml PE 10x 0,5 ml 10 mg/ml tRNS (Sigma R 8759), 0,25 ml 10% (v/v) Heparin (Sigma H 5765), 0,5 ml 10 % (w/v) BSA (Sigma 4378), 2,5 ml 20 % (w/v) SDS (USB 75832), DEPC-H<sub>2</sub>O ad 50 ml

## 9.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### **Tabelle:**

- 1: Histologische Klassifikation epithelialer Ovarialtumoren.
- 2: Klinisch-histopathologische Daten zu den Ovarproben des Cancer Profiling Arrays (CPA).
- 3: cDNA-Klone von Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC.
- 4: Beurteilung der hybridisierten Schnitte nach prozentualer Positivität und Intensitätsgrad der Färbung
- 5: Allgemeine Charakteristika des Gesamtkollektivs.
- 6: Präoperativer CA125-Wert im Median bei Patientinnen mit Normalgewebe des Ovars, benignen Ovarialtumoren, primären oder rezidierten Ovarialkarzinomen.
- 7 A: Relative Häufigkeit der Thymosin- $\beta$  10-Expression in Normal- (N) und Tumorgeweben (T) und deren Verhältnisse zueinander.
- 7 B: Relative Häufigkeit der SPARC-Expression in Normal- (N) und Tumorgeweben (T) und deren Verhältnisse zueinander.
- 8: Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Dot-Blot.
- 9: Verhältnis der Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression von Normalgewebe und korrespondierendem Tumor verschiedener Organe.
- 10: Thymosin  $\beta$ -10- und SPARC-Expression im Cancer Profiling Array und klinische Daten.
- 11: Univariate Analyse zum Einfluss von Prognosefaktoren auf das postoperative Überleben bei Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom.
- 12: Variablen und Referenzkategorie in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse.
- 13: Multivariate Analyse der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Epithel.
- 14: Multivariate Analyse der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma.
- 15: Multivariate Analyse der Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel.
- 16: Multivariate Analyse der SPARC-Expression im Epithel.
- 17: Multivariate Analyse der SPARC-Expression im Stroma.
- 18: Multivariate Analyse der SPARC-Expression im Endothel.

### **Abbildung:**

- 1: Operationssitus einer Patientin mit serös-papillärem Ovarialkarzinom, Charité Berlin 2001 und histologischer Schnitt.
- 2: Beispiel für eine erfolgreiche RNA-in-situ Hybridisierung.

- 3: Altersverteilung der Patientinnen bei Erstdiagnose Normalgewebe des Ovars, benigner Ovarialtumor, primäres oder rezidiertes Ovarialkarzinomen.
- 4: Häufigkeitsverteilung der Histologie bei primären und rezidierten Ovarialkarzinomen.
- 5: Häufigkeitsverteilung der Patientinnen mit makroskopischer Tumorfreiheit oder mit postoperativem Tumorrest  $\leq 1\text{cm}$  und  $> 1\text{cm}$ .
- 6: Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien nach FIGO der Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom.
- 7: Häufigkeitsverteilung der Tumorklassifikation nach TNM.
- 8: Häufigkeit des Auftretens und der Menge von Aszites bei Patientinnen mit primärem oder rezidiertem Ovarialkarzinom.
- 9 A: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Multi-Tissue-Northern-Blot.
- 9 B: SPARC-Expression im Multi-Tissue-Northern-Blot.
- 10 A: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Dot-Blot.
- 10 B: SPARC- Expression im Dot-Blot.
- 11 A: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Cancer Profiling Array.
- 11 B: Expression von SPARC im Cancer Profiling Array.
- 12: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Normalovar einer 63-jährigen Frau.
- 13: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im muzinösen Zystadenofibrom einer 73-jährigen Frau.
- 14: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im serös-papillären Ovarialkarzinom einer 47-jährigen Frau.
- 15: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Rezidiv eines serösen Ovarialkarzinoms einer 73-jährigen Frau.
- 16: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Epithel in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.
- 17: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Tumorepithel in Abhängigkeit vom Metastasierungszustand.
- 18: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.
- 19: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Stroma in Abhängigkeit vom postoperativen Tumorrest.
- 20: Thymosin  $\beta$ -10-Expression im Endothel in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.
- 21: Endotheliale Thymosin  $\beta$ -10-Expression in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium.
- 22: Metastasierungszustand in Abhängigkeit von der endothelialen Thymosin  $\beta$ -10-Expression.
- 23: SPARC-Expression im Normalovar einer 63-jährigen Frau.
- 24: SPARC-Expression im muzinösen Zystadenofibrom einer 73-jährigen Frau.
- 25: SPARC-Expression im serös-papillären Ovarialkarzinom einer 47-jährigen Frau.
- 26: SPARC-Expression im Rezidiv eines serösen Ovarialkarzinoms einer 73-jährigen Frau.
- 27: SPARC-Expression im Epithel in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.

- 28: Aszites in Abhängigkeit von der epithelialen SPARC-Expression bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom.
- 29: Tumorstadium pT in Abhängigkeit von der epithelialen SPARC-Expression.
- 30: SPARC-Expression im Stroma in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.
- 31: Präoperativer CA125-Wert in Abhängigkeit von der Stromalen SPARC-Expression bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom.
- 32: SPARC-Expression im Endothel in Abhängigkeit von der Dignität des Ovargewebes.
- 33: Differenzierungsgrad in Abhängigkeit von der endothelialen SPARC-Expression.
- 34: FIGO-Stadium in Abhängigkeit von der endothelialen SPARC-Expression.
- 35: Tumorstadium pT in Abhängigkeit von der endothelialen SPARC-Expression.
- 36: Gesamtüberleben der Patientinnen mit primärem (n = 32) versus rezidiviertem Ovarialkarzinom (n = 16).
- 37: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit FIGO-Stadium I und II (n = 8), III (n = 28) oder IV (n = 12).
- 38: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen ohne postoperativen Tumorrest (n = 25) versus mit postoperativem Tumorrest (n = 23).
- 39: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen ohne Aszites (n= 22), mit  $\leq 500$ ml Aszites ( n = 9) oder mit  $> 500$ ml Aszites (n= 17).
- 40: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit Tumorstadium pT1 (n= 6), pT2 (n = 3) oder pT3 (n = 39).
- 41: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit einem Metastasierungszustand MX (n= 18), M0 (n= 14) oder M1 (n= 16).
- 42: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit einem präoperativen CA125-Wert  $< 100$  U/ml (n= 16),  $100- < 1000$  U/ml (n= 20) oder  $\geq 1000$  U/ml (n= 12).
- 43: Postoperatives Überleben bei Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom und negativer bzw. schwacher SPARC-Expression im Tumorepithel.
- 44: Postoperatives Überleben bei Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom und schwacher, mäßiger oder starker SPARC-Expression im Tumorstroma.
- 45: Postoperatives Überleben bei Patientinnen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom und negativer bzw. schwacher SPARC-Expression im Tumorendothel.
- 46: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen mit FIGO-Stadium I und II (n= 8), III (n= 28) oder IV (n= 12).
- 47: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier der Patientinnen ohne postoperativen Tumorrest (n= 25) versus mit postoperativem Tumorrest (n= 23).

### 9.3 Danksagung

Ich danke all denen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, besonders

Herrn Prof. Dr. med. Jalid Sehouli, der mir zum rechten Zeitpunkt hilfreiche und kritische Anregungen und entscheidende Impulse für Verbesserungen gab, Herrn Dr. med. Radoslav Chekerov und Frau Dr. med. Dominique Könsgen für die engagierte Betreuung und die wertvollen Hilfestellungen von Seiten der Charité Berlin.

Herrn Dr. rer. nat. Edgar Dahl für seine kompetente firmenseitige Betreuung, die Bereitstellung der umfangreichen Materialien und nicht zuletzt die Wahl des Themas. Frau Dr. med. Irina Klamann, die stets geduldig und hilfsbereit war. Herrn Dr. rer. nat. Detlev Mennerich herzlich für seine exzellente Einarbeitung in die Grundlagen der molekularbiologischen Techniken, Frau Nicole Creutzburg für die Bereitstellung ihres Erfahrungsschatzes als "Meisterin" der RNA-in-situ-Hybridisierung und meiner hier gewonnenen Freundin Marina Chorovicer für die vielen Gespräche während unserer gemeinsamen Zeit. Allen Mitarbeitern der Firma metaGen für die kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre, keine meiner schier unendlichen Fragen musste unbeantwortet bleiben, zumal jeder bereit war, mir sein Wissen mit der größten Geduld zu vermitteln.

Zuletzt, obgleich für mich am Wichtigsten, gilt mein Dank meiner großen Familie:

Meinem Ehemann Jens & meinen Kindern, meinen Schwestern Inga & Anja, meinen Brüdern Lars & Jens, meiner Schwägerin Jenny, meinem baldigen Schwager Stephan und meinen Eltern Dagmar & Jürgen, die mich alle zu jedem Zeitpunkt ertragen und in jeder Hinsicht ermutigt haben. Ihr seid die beste Familie, die ich mir wünschen kann.

Ich widme diese Arbeit meiner Familie.

#### **9.4 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht veröffentlicht.



### **9.5 Erklärung**

Ich, Anja Leib, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Molekulargenetische Charakterisierung der Gene Thymosin  $\beta$ -10 und SPARC in Normalgewebe des Ovars, benigne und maligne transformierten Ovarien“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“ Ich habe keinen Promotionsversuch an einer anderen Universität unternommen und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Berlin, den 07.11.2011

Anja Leib