

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

DISSERTATION

Differenzielle Expression von
Topoisomerase II alpha (TOP2A) in
Tumorzellen und tumor-assoziierte Stromazellen
von malignen Ovarialtumoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Radoslav Iordanov Chekerov

aus Sofia

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Sehouli
2. Prof. Dr. med. F. Jänicke
3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Denkert

Datum der Promotion: 10.11.2008

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung.....	5
A.1	Allgemeine Charakteristika von malignen Ovarialtumoren.....	5
A.1.1	Epidemiologie.....	5
A.1.2	Ätiologie.....	5
A.1.2.1	Molekulargenetische Faktoren.....	6
A.1.2.2	Familiäre (hereditäre) Ovarialkarzinome.....	7
A.1.2.3	Ernährungs- und Umweltfaktoren.....	8
A.1.3	Klassische Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom	9
A.1.3.1	Postoperativer Tumorrest.....	9
A.1.3.2	Tumorstadium (FIGO-Staging).....	9
A.1.3.3	Histopathologisches Grading.....	10
A.1.3.4	Histologische Typisierung.....	10
A.1.3.5	Maligner Aszites.....	10
A.1.3.6	Alter bei Erstdiagnose.....	11
A.1.4	Neue potentielle Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom.....	11
A.1.5	Zelluläre Heterogenität des Ovarialkarzinomgewebes.....	12
A.2	Allgemeine Charakteristika von Topoisomerase II α (TOP2A).....	13
A.2.1	Kurze Übersicht über topologische Aspekte und Klassifikation.....	13
A.2.2	Besonderheiten der TypII-DNA-Topoisomerasen auf Gen- und Proteinlevel.....	15
A.2.2.1	Strukturelle Organisation des TOP2A-Gens.....	15
A.2.2.2	Proteinstruktur des TOP2A-Enzyms und katalytischer Zyklus	16
A.2.3	Physiologische Funktion der TOP2A.....	17
A.2.4	Gewebespezifische TOP2A-Expression.....	18
A.2.5	TOP2A im Hinblick auf den Zellzyklus.....	20
A.2.6	DNA-Topoisomerasen als Zielmoleküle von Chemotherapeutika.....	20
A. 3	Zielsetzungen in dieser Studie.....	22
B.	Material und Methoden.....	23
B.1	Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Studie.....	23
B.2	Patientenkollektiv und klinische Daten.....	25
B.2.1	Patientinnen und Untersuchungsmaterial.....	25
B.2.2	Erhebung der klinischen Daten.....	25

B.3	Auswahl, Präparation und Bestätigung von cDNA-Klonen für TOP2A	27
B.3.1	Herkunft der IMAGE cDNA-Klone für TOP2A.....	27
B.3.2	Präparation der Plasmid-DNA für die Sequenzanalyse.....	28
B.3.2.1	Kultivierung der Einzelkolonien.....	28
B.3.2.2	Minipräparation der Plasmid-DNA.....	29
B.3.2.3	Kontrollrestriktionsverdau der Plasmid-DNA.....	29
B.3.3	Sequenzierung der TOP2A cDNA-Inserts.....	30
B.3.4	Maxipräparation der Plasmid-DNA.....	32
B.3.4.1	Inkubation einer Vorkultur.....	33
B.3.4.2	Maxipräparation.....	33
B.4	Nichtradioaktive RNA <i>in - situ</i> Hybridisierung.....	34
B.4.1	Gewebeproben.....	35
B.4.2	Präparation der RNA-Sonden.....	35
B.4.2.1	Linearisierung der Plasmid-DNA.....	35
B.4.2.2	<i>In vitro</i> Transkription der linearisierten cDNA.....	36
B.4.3	Nichtradioaktive <i>in-situ</i> Hybridisierung.....	37
B.4.3.1	Vorhybridisierung und Hybridisierung.....	37
B.4.3.2	Post-Hybridisierung und Antikörper-Inkubation.....	38
B.4.3.3	Antikörper-Nachweis und Gegenfärbung.....	39
B.5	Laser gestützte Mikrodisektion.....	39
B.5.1	Herkunft des Gewebes.....	40
B.5.2	Vorbereitung der Kryoschnitte.....	40
B.5.3	Durchführung der lasergestützten Mikrodisektion.....	40
B.6	RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative TaqMan RT-PCR..	41
B.6.1	Kommerzielle mRNA-Kontrollprobe.....	41
B.6.2	Isolierung der Gesamt-RNA aus mikrodissezierten Geweben.....	42
B.6.3	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	42
B.6.4	Reverse Transkription.....	43
B.6.5	Quantitative Real-time Reverse Transkriptase-PCR (TaqMan-PCR)...	43
B.7	Immunhistochemie.....	45
B.7.1	Gewebeproben.....	46
B.7.2	Immunhistologische Charakterisierung des Gewebesets.....	46
B.7.3	Verwendete Antikörper und Reagenzien.....	46
B.7.4	Inkubation nach der indirekten Streptavidin - Biotin Methode.....	47

B.8	Semiquantitative Auswertung über den Immunreaktiven Score IRS...	48
B.9	Statistik.....	49
C.	Ergebnisse.....	51
C.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	51
C.1.1	Altersstruktur.....	51
C.1.2	Histologie.....	53
C.1.3	Tumorstadium.....	54
C.1.4	Differenzierungsgrad	54
C.1.5	Postoperativer Tumorrest.....	55
C.1.6	Aszites.....	55
C.1.7	Kontrollgruppe für die <i>in-situ</i> und immunhistochemischen Analysen...	56
C.2	Nichtradioaktive <i>in-situ</i> Hybridisierung bestätigt eine differentielle Expression der <i>TOP2A</i> -mRNA in Tumor und Stromazellen.....	57
C.3	Bestätigung der differentiellen Expression von <i>TOP2A</i> in Tumor- und Stromazellen beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom.....	62
C.3.1	Quantitativer Nachweis der zellulären <i>TOP2A</i> mRNA Amplifikation in mikrodisssezierten Karzinomproben.....	62
C.3.2	Immunhistochemischer Nachweis der zellulären <i>TOP2A</i> Überexpression.....	67
C.3.2.1	Unterscheidung der Tumorzellen von den Stromazellen über CK 7....	68
C.3.2.2	<i>TOP2A</i> Enzymexpression in Tumorzellen und Stromazellen.....	70
C.4	Überlebenszeitanalysen.....	73
C.4.1	Tumorrest und Überleben.....	74
C.4.2	FIGO-Stadium und Überleben.....	75
C.4.3	Grading und Überleben.....	76
C.4.4	Histologie und Überleben.....	77
C.4.5	Aszites und Überleben.....	78
C.4.6	Alter und Überleben.....	79
C.4.7	<i>TOP2A</i> -Genamplifikation in Tumor und Stroma vs. Überlebenszeit...	80
C.4.8	<i>TOP2A</i> -Expression in Tumor und Stroma vs. Überlebenszeit.....	81
C.5	Prognostische Bedeutung der klinischen und experimentellen Ergebnisse.....	81
D.	Diskussion.....	84
D.1	Einleitung zur Diskussion.....	84

D.2	Diskussion der epidemiologischen Daten.....	85
D.3	Intrazellulärer Nachweis der <i>TOP2A</i> -mRNA beim Ovarialkarzinom....	88
D.4	Differentielle <i>TOP2A</i> -Genamplifikation in Tumor und Stromazellen....	90
D.5	Differentielle <i>TOP2A</i> -Proteinexpression in Tumor und Stromazellen..	93
D.6	Interpretation der zellulären Differentialexpression von <i>TOP2A</i> beim Ovarialkarzinom.....	94
D.7	Interpretation der klinischen und experimentellen Daten hinsichtlich des Überlebens.....	97
E.	Zusammenfassung.....	99
F.	Literaturverzeichnis.....	102
G.	Anhang.....	112
G.1	Verwendete Lösungen und Reagenzien.....	112
G.2	Abkürzungen.....	114
	Danksagung.....	115
	Eigenständigkeitserklärung.....	116
	Lebenslauf.....	117

A. Einleitung

A.1 Das Ovarialkarzinom

A.1.1 Epidemiologie, Inzidenz und Mortalität

Das Ovarialkarzinom ist mit 41.900 Neuerkrankungen das zweithäufigste Genitalkarzinom der Frau [1]. In Deutschland erkranken jährlich 8.000 Frauen an einem malignen Eierstocktumor und etwa 6.200 Frauen versterben an den Folgen der Erkrankung [2]. Das Ovarialkarzinom ist somit in Relation zur Anzahl der Erkrankten die führende Todesursache unter den gynäkologischen Tumoren [1, 3].

Das mittlere Erkrankungsalter beträgt ca. 58 Jahre. Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, wächst mit steigendem Alter [2]. Die Erkrankung beginnt asymptomatisch und breitet sich früh im ganzen Peritonealraum aus [3, 4], sodass mehr als 75% der Frauen im fortgeschrittenen Stadium FIGO III und IV diagnostiziert werden [5, 6]. Die multiviszzerale Operation ist der Grundpfeiler in der Primärtherapie [5, 7]. Die Kombinationschemotherapie aus Carboplatin und Paclitaxel ist der gegenwärtige Standard in der zytostatischen Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms [3]. Trotz anfangs hoher Ansprechraten rezidivieren mehr als 60% der Frauen in den ersten zwei Jahren nach Primärtherapie. Die platinresistente Erkrankung hat eine sehr ungünstige Prognose und hohe Mortalitätsrate [2, 3]. Trotz einer Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit in den letzten Jahren um 12-20 Monate liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Stadien bei 30% bis 49,7% [1-3, 6]. Die schlechte Prognose ist auch von der fehlenden Spezifität der verfügbaren diagnostischen Verfahren abhängig [8].

A.1.2 Ätiologie

Die Entstehung des Ovarialkarzinoms ist ätiologisch weitgehend ungeklärt. Risikofaktoren sind molekulargenetische, endokrinologische und Umweltfaktoren. Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, wird mit hohem sozialen Status, früher Menarche, später Menopause, primärer Sterilität und später Erstgravidität (>35 Jahre) assoziiert [8]. Protektiv wirken sich Multiparität, Laktationsdauer, langjährige Einnahme oraler Kontrazeptiva [9, 10].

Drei Hypothesen zur Ätiologie des Ovarialkarzinoms wurden postuliert: die Ovulations-, die Gonadotropin- und die Kontaminationshypothese. Die Ovulationshypothese basiert auf der Beobachtung, dass über 90% der Ovarialtumoren epithelialen Ursprungs sind und auf der häufig gleichzeitigen Nulliparität der Patientinnen. Diese haben mehr Ovulationszyklen. Wiederholte Rupturen des Oberflächenepithels in der Ovulation und die damit einhergehenden Reparaturprozesse erleichtern die Entstehung spontaner Mutationen und erhöhen damit das Risiko einer Karzinomentwicklung [8]. Die Gonadotropinhypothese setzt das erhöhte Risiko für ein Ovarialkarzinom in Zusammenhang mit einem ständig erhöhten Serumspiegel von Androstendion und besonders von Dehydroepiandrosteron (DHEA) [9, 11]. Die Hypothese steht im Einklang mit dem protektiven Effekt der Schwangerschaft bzw. der Einnahme oraler Kontrazeptiva, beide einhergehend mit Suppression der Gonadotropinproduktion. Die Kontaminationshypothese geht von einer aszendierenden Kontamination des kleinen Beckens durch exogene chemische Stoffe, wie z. B. Umwelttoxine, aus [10, 12].

A. 1.2.1 Molekulargenetische Faktoren

Die Entstehung des Ovarialkarzinoms ist molekulargenetisch ungeklärt. Histologisch kommen im Eierstock mehrere Zellarten, neben dem Oberflächenepithel und dem Stroma, vor. Jeder Zelltyp besitzt potentielle Fähigkeit zur malignen Entartung [6, 13]. Das Ovarialkarzinom entsteht in über 90% der Fälle als sporadische Erkrankung des Oberflächenepithels ohne einen nachweisbaren autosomal-dominanten Erbgang [14]. Somatische Mutationen in mehreren Genen sind beschrieben [10, 15].

An der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms sind diverse molekulare Veränderungen beteiligt: Aktivierung von Tyrosinkinase- und Protoonkogenen, Mutationen in Tumorsuppressorgenen, Enzymveränderungen [14]. Die häufigsten Mutationen beim Ovarialkarzinom sind am p53 Gen (17p13.1) [15, 16]. Das Tumorsuppressorgen kodiert das Kernprotein p53, ein Eiweiß, das DNA-Reparaturmechanismen reguliert. Bei 50% aller Karzinome zeigen sich Alterationen am p53-Gen, wobei der vollständige Allelverlust (LOH) und die Spontanmutation am häufigsten beschrieben sind [15, 17]. Diese Ereignisse scheinen eine prognostische Bedeutung zu haben [17, 18].

Molekulargenetisch sind neben p53 weitere tumorrelevante Gene auf dem Chromosom 17 lokalisiert: BRCA1, ERBB2 (HER-2/neu), TOP2A (Abb. 1) [14, 15, 19]. Das Tumorsuppressorgen BRCA1 (17q21) ist vor allem in Mamma-, Ovar- und Hodengewebe

exprimiert [10, 14, 15, 20]. Keimbahnmutationen des BRCA1-Gens sind mit der Entwicklung von hereditären Mamma- und Ovarialkarzinomen assoziiert [20]. Das ERBB2-Gen (auch HER2/neu) kodiert für einen Transmembranrezeptor der EGFR-Rezeptorfamilie [21]. Diese vermitteln über extrazelluläre Ligandenbindung die intrazelluläre Signaltransduktion über die Regulation der Tyrosinkinase-Aktivität [21, 22].

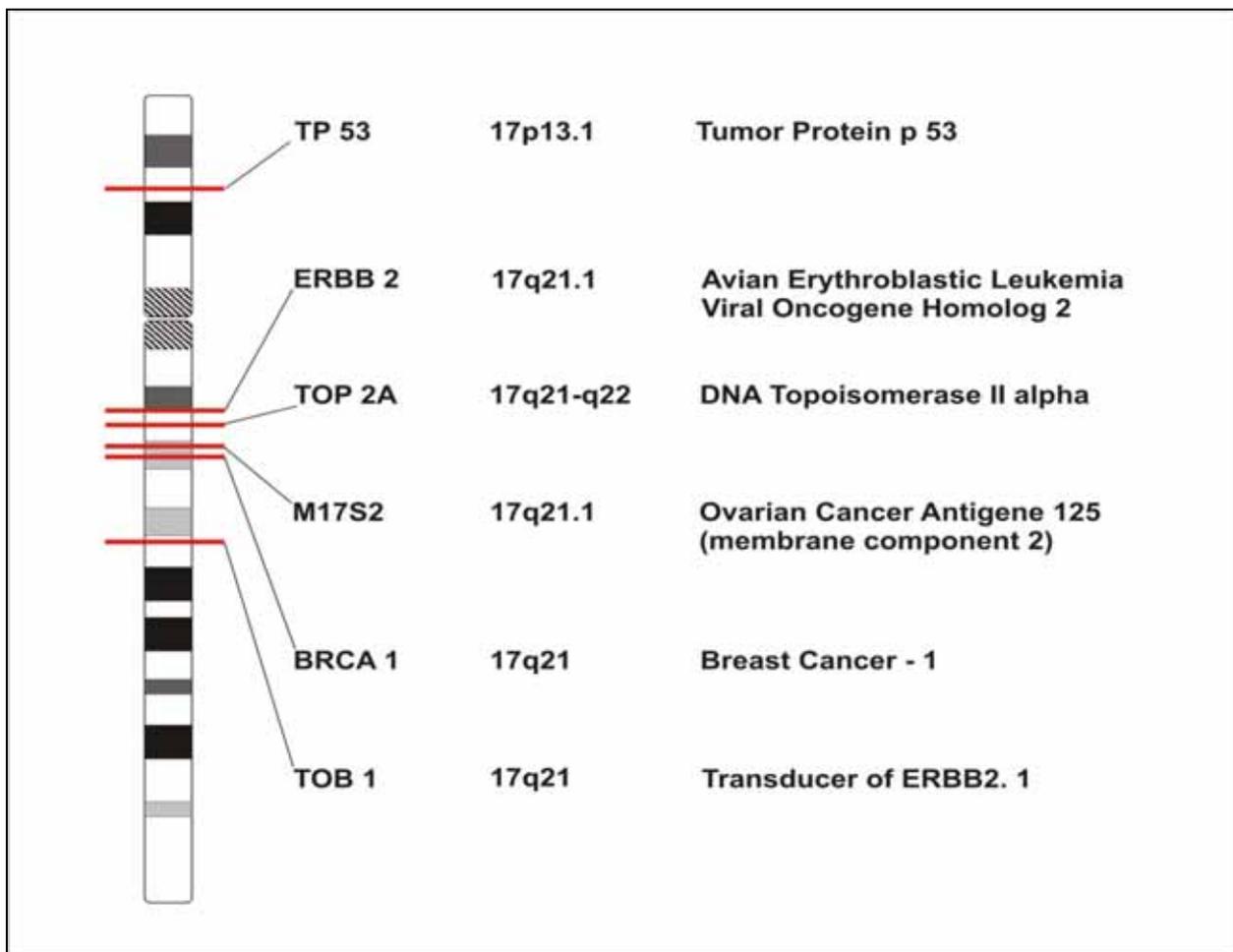


Abb. 1: Wichtige Gene lokalisiert auf dem langen Arm von Chromosom 17

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps>)

A. 1.2.2 Familiäre (hereditäre) Ovarialkarzinome

Man geht davon aus, dass 5-10% der Ovarialkarzinome auf einer genetischen Disposition beruhen. Das Lebenszeitrisiko an einem Ovarialmalignom zu erkranken, erhöht sich um mehr als das 3fache, wenn bei einer Verwandten 1. Grades ein Ovarialkarzinom aufgetreten ist [2]. Besonders betroffen sind Frauen aus Familien, in denen mehrere Malignome der Mamma oder des Ovars diagnostiziert wurden. Von hereditärem Ovarialkarzinom spricht man, wenn mindestens 2 Verwandte 1. Grades erkrankt sind. Familiäre

Ovarialkarzinome treten im Mittel 10 Jahre früher auf als sporadische Ovarialkarzinome [14].

Zwei Phänotypen sind mit der Entstehung hereditärer Ovarialmalignome assoziiert [14]. Im Rahmen des Brust- und Ovarialkarzinom-Syndroms (*hereditary breast and ovarian cancer syndrome* (HBOC)) treten 85-90% aller erblich bedingten Erkrankungen auf. HBOC ist mit Keimbahnmutationen von BRCA1 (hohe Penetranz) oder BRCA2 (niedrige Penetranz) assoziiert [10, 14]. Durch den Ausfall von DNA-Reparaturmechanismen wird die maligne Entartung gefördert. BRCA1 Mutationen finden sich bei ca. 5% der sporadischen Ovarialkarzinome [20]. Frauen mit BRCA1-Mutation haben bis zu 80% Erkrankungsrisiko für Mammakarzinom und bis zu 40% Risiko für Ovarialkarzinom. Das Risiko bei BRCA2-Mutationsträgerinnen an Mamma- oder Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt 84% bzw. 27% [10].

Der zweite Phänotyp des familiären Ovarialkarzinoms entwickelt sich im Rahmen des hereditären nichtpolypösen Kolorektalkarzinom-Syndrom (HNPCC). Das HNPCC, auch Lynch II-Syndrom genannt, zeichnet sich durch Auftreten von autosomal dominanten Kolorektalkarzinomen aus und ist mit erhöhtem Risiko für die Entstehung von Gastrointestinal-, Ovarial- oder Endometriumkarzinomen assoziiert [10, 14]. Ovarialkarzinome treten bei 5-10% der HNPCC-Patientinnen auf. Ursache hierfür sind Funktionsverluste in DNA „*mismatch-repair*-Gene“ [23]. Patientinnen mit dieser Genominstabilität haben ein 3,5fach erhöhtes Risiko an Ovarialkarzinom zu erkranken [10].

A. 1.2.3 Ernährungs- und Umweltfaktoren

Fleisch und tierische Fette in der Nahrung werden als Risikofaktor für die Karzinogenese diskutiert. Adipositas scheint die Entstehung eines Ovarialkarzinoms zu begünstigen und ist prognostisch ungünstig, möglicherweise bedingt durch die erhöhte periphere Östrogensynthese [14, 24]. Ein erhöhter Konsum von Milch- und Milchprodukten gilt ebenfalls als Risikofaktor.

Auch Umwelttoxene (Asbest, Talkum) sind bei der Entstehung von Ovarialmalignomen als auslösende Faktoren bekannt [12]. Ätiologisch wird die retrograde Kontamination des Peritoneums und der Ovaroberfläche durch diese Umweltstoffe als Induktionsmechanismus postuliert.

A. 1.3 Klassische Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom

Klinisch-pathologische Prognosefaktoren sind wesentlicher Bestandteil bei der Einteilung von Niedrig- und Hochrisikopatientinnen mit Ovarialkarzinom [6, 25]. Hierzu zählen: postoperativer Tumorrest, FIGO-Stadium, Histologie, Grading, Alter, Aszites [6, 10].

A. 1.3.1 Postoperativer Tumorrest

Mehrere Studien mit einer Langzeitnachbeobachtung von mehr als 9 Jahren, sowie einige Metaanalysen identifizieren den postoperativen Tumorrest als stärksten unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der Patientinnen mit Ovarialkarzinom [26]. Metaanalysen konnten den Einfluss der kompletten Tumorsektion auf das Gesamtüberleben zeigen [7]. Die maximale Tumorreduktion korreliert signifikant mit der medianen Überlebenszeit. Ein Anstieg der Zytoreduktion um 10% ist mit 5% Verlängerung des Gesamtüberlebens assoziiert. Bei vergleichbaren Charakteristika zeigten Patientenkohorten mit maximaler Tumorreduktion von 25% ein medianes Überleben von 22,7 Monaten, während eine Tumorreduktion von 75% zu einem 50%igen Anstieg der Überlebenszeit auf 33,9 Monate führte. Neuere Daten zeigen eine 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) von 63,5% bei mikroskopischer Tumorfreiheit, 62,1% bei makroskopisch negativem Tumorrest, 32,9% bei < 2cm Tumorrest und lediglich 24,8% 5-JÜR bei ≥ 2cm [6].

A. 1.3.2 Tumorstadium (FIGO-Staging)

Nach Diagnosesicherung erfolgt die Stadieneinteilung durch die intraoperative Beurteilung des Tumorbefalls und den histopathologischen Endbefund. Nach Kapseldurchbruch erfolgt die primäre Tumorausbreitung über die Peritonealflüssigkeit zur rechten parakolischen Rinne und ermöglicht die Metastasierung bis zum Zwerchfell, der Leberkapsel und dem Omentum minus. Die lymphogene Ausbreitung erfolgt über das Lig. Infundibulopelvicum zu den retroperitonealen Lymphknoten entlang der Aorta und der V. cava, sowie über Lig. latum und die Parametrien zur Beckenwand mit Befall der iliakalen, hypogastrischen und obturatorischen Lymphknoten. Fernmetastasen treten am häufigsten in der Pleura, im Leberparenchym und in den Lungen auf [5].

Ein exaktes, systematisches intraoperatives Staging ist Grundvoraussetzung für eine adäquate Therapie des Ovarialkarzinoms [3, 5, 26]. Die Stadieneinteilung erfolgt nach den Kriterien der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO). Das 5-Jahresüberleben (5-JÜR) ist signifikant vom Tumorstadium abhängig und hat unabhängige prognostische Bedeutung [5, 26, 27]. FIGO I Stadium zeigt eine 5-JÜR von 86,4%, FIGO II von 69%, FIGO III von 40,2% und FIGO IV von 18,6% [6].

A. 1.3.3 Histopathologisches Grading

Die histologische Beurteilung ist wichtiger Bestandteil der klinisch-pathologischen Charakterisierung des Ovarialkarzinoms [25, 26]. Die Einteilung erfolgt in drei Stufen, wobei G1 gut, G2 mäßig, G3 schlecht oder entdifferenziert bedeutet [6]. Der Differenzierungsgrad korreliert signifikant mit der Prognose. G1-Tumore zeigen 5-JÜR von 73,8%, G2 von 55,4%, bei schlecht differenzierten G3-Tumoren liegt die 5-JÜR bei 51,8% [1, 6].

A. 1.3.4 Histologische Typisierung

Die histologische Einteilung des Ovarialkarzinoms ist auch prognostisch relevant [1, 6, 26]. Bei nicht einheitlicher Datenlage wird von verschiedenen Arbeitsgruppen eine vergleichsweise bessere Prognose für muzinöse und endometrioiden Tumore und eine schlechtere für seröse und insbesondere für entdifferenzierte Karzinome beschrieben [5, 6, 25].

Die 5-JÜR beträgt für seröse Ovarialkarzinome FIGO I/II 83,9% und 31,9% für FIGO III/IV, für muzinöse 90% und 31%, für endometrioiden 86,5% und 37% und für klarzellige Karzinome FIGO I/II 81% sowie 23,9% bei FIGO III/IV [6].

A. 1.3.5 Maligner Aszites

Aszites ist die vermehrte Ansammlung von Peritonealflüssigkeit in der Bauchhöhle und entsteht bei Herz-Kreislauf-, Lebererkrankungen oder bei Malignomen. Beim Ovarialkarzinom ist der maligne Aszites vom nicht-entzündlichen und hämorrhagischen Typ durch die großflächige Peritonealkarzinose bedingt. Durch die Abschilferung von oberflächlichen malignen Zellen aus den Ovarien, sowie durch lokale Druckunterschiede im Bauchraum kommt es zur disseminierten Aussaat neoplastischer Zellen in anatomisch

begünstigte Spalträume z. B. im Douglas oder subdiaphragmal [5, 28]. Das Metastasenwachstum führt zur Behinderung des Lymphabflusses und fördert die Aszitesbildung. Der Aszitesnachweis scheint beim Ovarialkarzinom von prognostischer Bedeutung [4, 29].

A. 1.3.6 Alter bei Erstdiagnose

Das Alter ist ebenfalls ein unabhängiger Prognosefaktor [1, 2, 6]. Ältere Patientinnen mit Ovarialkarzinom haben im Vergleich zu jüngeren eine deutlich ungünstigere Prognose [2, 26]. Die 5-JÜR liegt bei Frauen im Alter 40 - 49 Jahren bei 62,1%, zwischen 50 - 59 Jahren bei 53,2%, zwischen 60 - 69 Jahren bei 44%, bei Frauen zwischen 70 - 79 Jahren bei 33,3% und bei den über 80-jährigen bei 23% [6].

A. 1.4 Neue potentielle Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom

Das bessere Verständnis der Molekularbiologie ermöglicht die Identifikation und Charakterisierung von neuen Targets für Diagnostik und Therapie [13]. Aktuell werden Tumorsuppressorgene (p53, p16 pRB), Onkogene (*ERBB2*, *p21*), *drug sensitivity* Marker (Pgp, GST, LRP, MRP, BAX), Proliferationsfaktoren (Ki-67, TOP2A), Angiogenesemarker (VEGF), Apoptosefaktoren (MMP, PAI-1) und Zytokine (IL-6, IL-10, IL-12) als potentielle Targets in der gynäkologischen Onkologie untersucht [15, 16, 30, 31]. In präklinischen und klinischen Studien werden zielgerichtete Therapiansätze zur Hemmung und Modulation der selektiven Rezeptorblockade, intrazellulären Signaltransduktion, Neoangiogenese, Zellproliferation und Apoptose getestet [3, 30, 31].

Heute ist Topoisomerase II α (TOP2A) einer der vielversprechenden Molekularmarker in der Onkologie. TOP2A ist prognostisch wichtig als Zellproliferationsfaktor [32, 33]. Als Targetmolekül von klinisch bedeutenden Zytostatika wie Etoposid und Doxorubicin hat TOP2A ebenfalls eine therapeutische Bedeutung [34, 35]. Durch Veränderungen der Enzymaktivität ist TOP2A auch an der *multi drug* Resistenzentwicklung beteiligt [30, 36, 37]. Insgesamt wenige Studien befassen sich mit der Expression von TOP2A beim Ovarialkarzinom. Einige Daten weisen auf die negative prognostische Bedeutung der Überexpression in soliden Tumoren [38, 39]. Die Expression von TOP2A im fortgeschrittenen Tumorstadium ist häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert [33].

Ein weiteres Target, das ERBB2 Proto-Onkogen, auch HER-2/neu/c-erbB-2 genannt, ist essentiell für Tumorwachstum und Proliferation [21]. ERBB2 ist das am häufigsten über-

exprimierte Onkogen beim Mammakarzinom [40]. Hier ist ERBB2 ein wichtiger Bestandteil von zielgerichteten Therapien, wie der rekombinante Antikörper Trastuzumab®. Ovarialkarzinome weisen eine ERBB2-Expression in 2-76% auf [22, 41, 42], wobei die prognostische Bedeutung nicht eindeutig geklärt ist [22, 42].

Klinisch bedeutsam scheint der prädiktive Stellenwert der Koexpression von TOP2A mit ERBB2 (HER-2/neu) für die Effektivität von anthrazyklinhaltigen Therapieregimen [40, 43]. ERBB2 und TOP2A zeigen in soliden Tumoren eine signifikante Koexpression, stärkeres Metastasierungspotential und scheinen mit einer schlechteren Prognose assoziiert [38, 44-46]. Wie erwähnt ist das *TOP2A*-Gen räumlich nah dem *ERBB2*-Gen auf Chromosom 17 lokalisiert [19] und wird häufig überexprimiert oder deletiert in einer Mehrzahl der ERBB2-positiven Karzinomen (Abb. 1). Neue Expressionsdaten zeigen, dass über die Amplifikation (oder Deletion) von TOP2A die Sensitivität (oder Resistenz) zu dem klinisch relevanten TOP2A-Inhibitoren wie Doxorubicin modulierbar sind. [40]. Hier scheint die therapeutische Relevanz von TOP2A v. a. für die Rezidivsituation beim Ovarialkarzinom von klinischer Bedeutung, doch bisher fehlen große multizentrische Expressionsstudien auf diesem Gebiet. Weitere Studien zu der Expression von TOP2A beim Ovarialkarzinom sind aufgrund der Komplexität der zellulären Interaktionen wichtig und aufgrund der klinischen Bedeutung dringend notwendig.

A.1.5 Zelluläre Heterogenität des Ovarialkarzinomgewebes

Auch in malignen Ovarialtumoren ist die Gewebshomöostase durch dynamische Wechselwirkungen zwischen epithelialen Zellen und ihrer Mikroumgebung gekennzeichnet. Für die Tumorprogression und Metastasierung spielen Wechselwirkungen zwischen neoplastischen Zellen, Normalzellen, wie Stromafibroblasten und Endothelium, sowie deren Mikroumgebung eine große Bedeutung [13]. Die Karzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess, meist beginnend mit genetischen Veränderungen in der Zelle. Die zelluläre Gewebearchitektur ist hier ein wesentlicher biologischer Faktor [47].

Epitheliale Karzinome der Ovarien weisen phänotypisch eine große zelluläre Heterogenität auf. Das Eierstockgewebe enthält mehrere Zelltypen, mit stromalen und epidermalen Ursprung [13]. Jeder Zelltyp kann maligne Transformationen initiieren, meist aus Spontanmutationen. Gegenwärtig nimmt man an, dass etwa 90% aller malignen Ovarialtumore vom Oberflächenepithelium entstammen [2, 11, 13]. Das Ovarialstroma wird als der weitgehend passivere Protagonist betrachtet.

Die Bedeutung der Epithel-Stroma-Interaktionen für die Tumorigenese und Progression wird kontrovers diskutiert [48]. Die Aktivierung der Tumor-Stroma-Mikroumgebung scheint essentiell für die Karzinogenese. Externe Einflüsse wie ionisierende Strahlen, Defekte in der extrazellulären Matrix, z. B. durch TNF- β 1, MMP's, oder gehäufte LOH-Aberrationen aktivieren die Stromafibroblasten und damit die stromale Umgebung [49-52]. Das reaktive Stroma besitzt hoch tumorigenes Potenzial [53]. Daten zur Bedeutung des reaktiven Stromas beim Ovarialkarzinom sind stark limitiert [54]. Um ihre potentiell prognostische Bedeutung zu analysieren, wurden verschiedene Modelle zur Beschreibung der Wechselwirkungen in der Stromaumgebung postuliert [55-57]. Das Ovarialstroma scheint auch an den Wechselwirkungen der Resistenzentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen [53, 58].

Daten zur zellulären TOP2A-Expression im Stroma sind stark limitiert. Beim Ovarialkarzinom wird meist die Auswertung der Expression auf die Tumorzellen begrenzt, ein Vergleich zu Normalgewebe ist methodisch schwierig. Deshalb wurde häufig das tumorfreie Ovargewebe als Vergleichsreferenz für die Targetexpression benutzt [15, 59, 60]. Die Analyse der stromalen Expression von TOP2A und der Vergleich zu den Tumorzellen scheinen aus biologischer Sicht vielversprechend und können neue therapeutische Ansätze wesentlich beeinflussen.

A.2 Allgemeine Charakteristika von Topoisomerase II α (TOP2A)

A.2.1 Kurze Übersicht über topologische Aspekte und Klassifikation

Topoisomerasen sind Enzyme, welche die DNA-Topologie ändern und damit für zelluläre Prozesse wie Replikation und Transkription essentiell sind [61, 62]. Die räumliche Struktur der Nukleinsäuren verursacht ständig Schwierigkeiten beim Ablauf dieser Vorgänge [63].

In den 1960er Jahren wurde die 3D-Struktur der DNA bekannt. Das Erbmateriale ist in einer komplexen Form im Zellkern organisiert. Physiologisch nehmen Überstrukturen und Isomerbildung der DNA-Doppelhelix verschiedene geometrische Konformationen an. In vivo überwiegt die rechtsgängige B-Schraube, auch Formen mit entgegengesetzter Drehung, sind bekannt. Die zelluläre DNA unterliegt ständigen topologischen Änderungen. In mehreren Spiralisierungs- und Faltungsschritten wird sie zusammen mit Proteinen zu komplexen Knoten und Schleifen „verpackt“. Es entstehen Topoisomere.

Einzelne DNA-Abschnitte werden zu einer Superhelix (*supercoil*) verdrillt. Benachbarte „ringförmige“ DNA-Schleifen verknoten zu „verknüpften Kettengliedern“ (*catenanes*) (Abb. 2). Alle topologischen Umwandlungen bedürfen aus biochemischer Sicht der Spaltung von DNA-Einzel- und Doppelsträngen [63, 64].

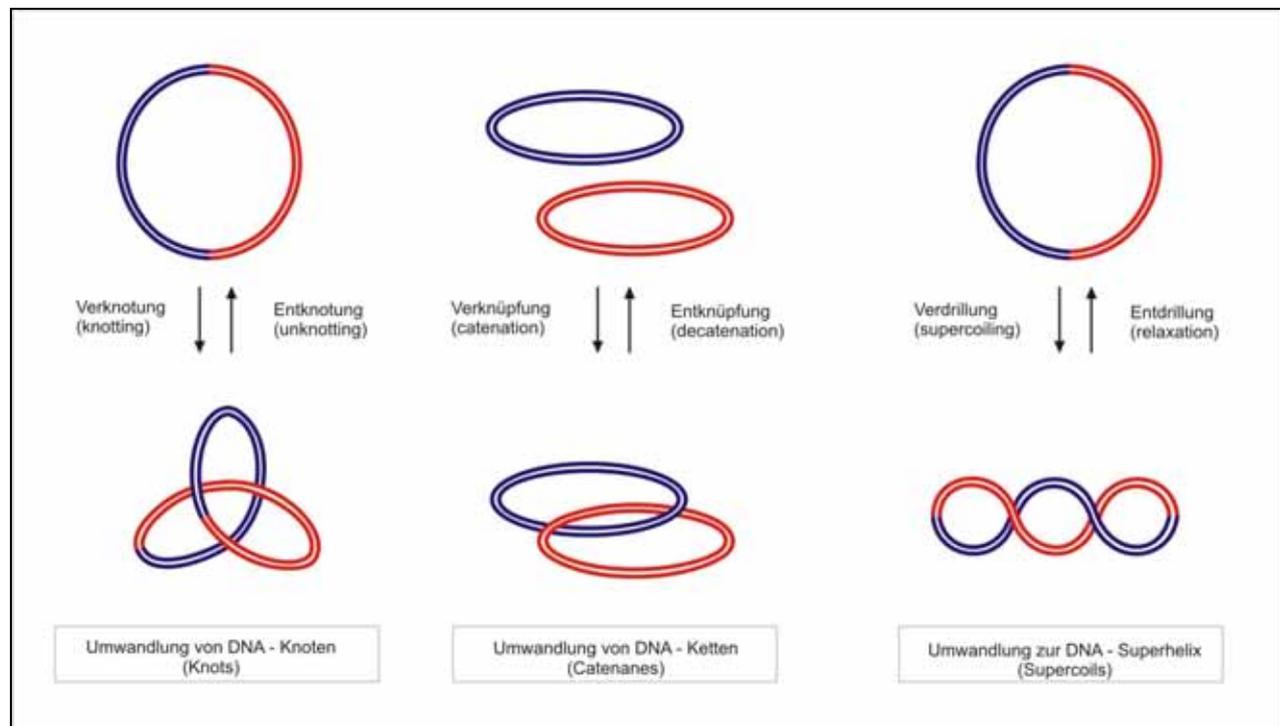


Abb. 2 Topoisomerasen ändern die DNA-Topologie durch Bildung/Relaxation komplexer geometrischer Formen, wie DNA-Knoten, Ketten oder Superspiralen. Durch Spaltung der DNA (hier als schwarzer Strich) wird mechanische Spannung reduziert und das Ablesen und Duplizieren der genetischen Informationen erleichtert [61, 63]. Zur besseren Darstellung sind die DNA-Schleifen als blaurote Ringe dargestellt.

Alle molekularbiologischen Prozesse führen zu ständigen Konformationsänderungen im Genom. Die Zunahme der Torsionsspannung in der DNA-Helix generiert stärkere Knotenbildung und Isomerisation. Für die DNA-Topologie ist wichtig, inwieweit stark verdrillte Abschnitte (energetisch ungünstig, *positive supercoils* genannt) über „relaxierte“ Konformationen (energetisch günstig, *negative supercoils*) dominieren. Ausbildung und Umwandlung von topologischen DNA-Strukturen (Chromatin) hat essentielle Bedeutung für die Umsetzung der Erbinformation [63, 64]. Die Entspiralisierung der Doppelhelix während der Transkription erfordert optimale räumliche Organisation zur Vermeidung von Verknotungen der neusynthetisierten RNA-Kette um die DNA-Helix [63]. Die Replikation kann ohne eine vorübergehende Trennung der doppelsträngigen Helix in zwei DNA-Einzelstränge nicht ablaufen. Alle diese Vorgänge können nur enzymatisch gelöst werden, behauptete Wang bereits 1971 und beschrieb eine Gruppe von Enzymen, die eine vorübergehende Spaltung des Zucker-Phosphat-Rückgrats und die Um-

wandlung der dreidimensionalen DNA-Struktur katalysieren. Da die Desoxyribonukleinsäuren nur räumlich, nicht aber chemisch verändert werden, nannte man die Enzyme DNA-Topoisomerasen [65].

Der katalytische Vorgang erfolgt als Dreistufen-Reaktion [63]. Zu Beginn wird ein Einzel- oder Doppelstrang gespalten. Es folgt die Überführung vom zweiten DNA-Fragment (Einzelstrang oder Doppelhelix) durch die geöffnete Bruchstelle (gap) und endet mit der Wiederverknüpfung des DNA-Rückgrates. Biochemisch handelt es sich um Transesterifikation mit Formierung von kovalentem DNA-Enzym-Zwischenkomplex [63]. Zwei Wirkungsweisen lassen sich unterscheiden: DNA-Topoisomerasen vom Typ I spalten nur einen DNA-Strang, während beim Typ II Doppelstrangbrüche in der DNA-Helix generiert werden. Strukturell unterscheidet man vier Enzym-Unterfamilien [61, 63] (Tab.1).

Tabelle 1

Klassifikation der DNA-Topoisomerasen
Genlokalisierung, Proteinstruktur und Größe der wichtigsten Enzymsubfamilien beim Menschen.

Unterfamilie	Vertreter (Genname)	Chromosom	Struktur	Proteingröße
IA	human DNA topoisomerase III α (TOP3A)	17p12-11.2	Monomer	1001 (aa)
IA	human DNA topoisomerase III β (TOP3B)	22q11.22	Monomer	862 (aa)
IB	human DNA topoisomerase I (TOP1)	20q12-q13.1	Monomer	765 (aa)
IIA	human DNA topoisomerase II α (TOP2A)	17q21-q22	Homodimer	1531 (aa)
IIA	human DNA topoisomerase II β (TOP2B)	3p24	Homodimer	1626 (aa)

A.2.2 Besonderheiten der TypII-DNA-Topoisomerasen auf Gen- und Proteinlevel

Zu der IIA-Unterfamilie gehören Topoisomerase II α (TOP2A) und Topoisomerase II β (TOP2B). Durch Sequenzanalysen wurde die Existenz der zwei Isoenzyme belegt. In Southern- und Northern-Blot Untersuchungen erfolgte die Lokalisierung der kodierenden Genabschnitte und nach Immunhistochemie wurden zwei Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht identifiziert [66].

A.2.2.1 Strukturelle Organisation des TOP2A-Gens

Das TOP2A-Gen wurde mittels in-situ Hybridisierung auf dem langen Arm von Chromosom 17q21-22 lokalisiert [67]. Das Gen für die II β -Isoform liegt auf dem Chromosom 3p24. Die TOP2A und TOP2B-Gene haben eine mittlere Größe von jeweils 30kb und 49kb [68]. Das TOP2A-Gen enthält 35 Exone, TOP2B 36 Exone. Der hohe

Grad an Konservierung - beide Isoformen zeigen eine große strukturelle Ähnlichkeit bei der Intron/Exon Analyse - lässt auf einen gemeinsamen Ursprung vermuten. Beide Isoformen sollen aus einer Genduplikation hervorgegangen sein [68].

A.2.2.2 Proteinstruktur des TOP2A-Enzyms und katalytischer Zyklus

Die Genkodierung auf zwei Chromosomen erlaubt eine differentielle Regulation auf dem Transkriptions- bzw. Proteinlevel. Das TOP2A-Enzym besteht aus 1531 Aminosäuren mit Molekulargewicht von 172 kDa. Die β -Isoform (TOP2B) ist mit 1621 Aminosäuren und 180 kDa etwas größer. Der Vergleich der Aminosäureabfolge von TOP2A und TOP2B zeigt 70% Sequenzübereinstimmung, ein Hinweis für den gemeinsamen genetischen Ursprung [68].

Kristallographisch sind beide Enzyme Homodimer-Moleküle. Jedes Monomer ist aus drei funktionellen Einheiten aufgebaut. Die proximale NH_2 -Domäne hat ATPase-Funktion. Die zentrale Domäne enthält als Bindungsstelle den aktiven Tyrosinrest. Hier erfolgt die Spaltung und Wiedervereinigung der DNA-Helix. Die proximale COOH -Domäne ist für die Isoenzym-spezifische Funktion zuständig [62].

Die phylogenetische Entwicklung von zwei Isoformen bedingt die funktionellen Unterschiede, wie biochemische, pharmakologische, Zellzyklus- und Gewebe-spezifischen Studien zeigen [69]. Klinisch relevant ist die Isoenzym-spezifische Entwicklung von atypischer Drug-Resistance bei TOP2. TyplI Topoisomerasen katalysieren die gleiche enzymatische Reaktion: die Umwandlung und Relaxation topologischer Knoten der DNA-Superhelix. Beim katalytischen Vorgang bindet das Enzym kovalent an doppelsträngige DNA, spaltet die Doppelhelix und formiert den Spaltungskomplex. Die ATP-Bindung initiiert Konformationsänderungen. Dabei wird ein zweites doppelsträngiges DNA-Fragment (*transported* oder T-DNA-Segment) durch die temporär geöffnete Stranglücke (*Gate*) des ersten DNA-Fragments (*gated* oder G-DNA-Segment) überführt (Abb. 3). Während der Spaltung bindet der Tyrosinrest des Enzyms an eine DNA-Phosphatgruppe zum kovalenten Komplex [62]. Nach der Überführung des T-Segments wird unter ATP-Hydrolyse die Wiederverknüpfung des geöffneten G-DNA-Helix vollzogen [62, 64].

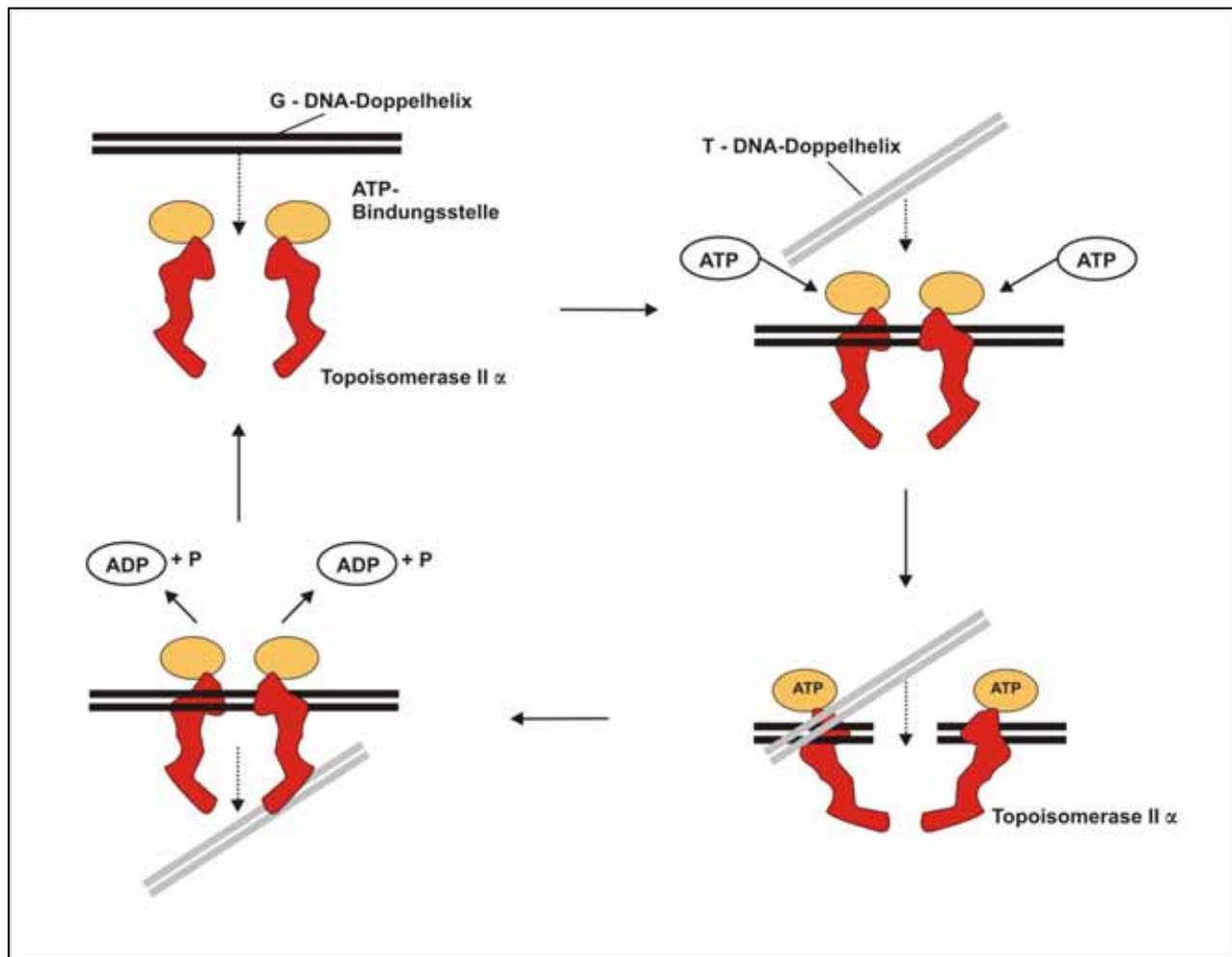


Abb. 3 Katalytischer Zyklus von TypII DNA-Topoisomerasen TOP2A und TOP2B. In einer DNA-Doppelhelix (*gated* oder G-DNA) wird kurzfristig ein Doppelstrangbruch generiert. Es folgt die Überführung der zweiten Doppelhelix (*transported* oder T-DNA). Nach ATP-Hydrolyse wird der Bruch (*gate*) geschlossen. Dadurch werden komplexe geometrische Verknotungen in der DNA aufgelöst [62, 64].

A.2.3 Physiologische Funktion der TOP2A

Bei Eukaryoten sind die Topoisomerasen vom TypII essentiell [70]. Die *in vivo* Enzymfunktion ist in ihrer Komplexität über differentielle Expression, Phosphorylierung oder Proteininteraktionen modulierbar. Die funktionelle Degeneration ermöglicht den partiellen oder kompletten Funktionsersatz durch andere Topoisomerasen. Für die Replikation, Transkription, Rekombination und besonders für die Chromosomentrennung haben die Enzyme eine zentrale Bedeutung [62]. In höheren Eukaryoten führen Defekte an TOP2A zum letalen Ausgang in der Embryonalentwicklung [62, 64].

Studien bestätigen die Rolle der TypII DNA-Topoisomerasen bei der Replikation [63]. Die Rotation des Replikationskomplexes um fixierte DNA-Abschnitte führt zu einer starken Verdrillung der DNA (*positive supercoils*) und Torsionsspannung. Die Topoisomerasen

relaxieren die überspiralisierten DNA-Abschnitte und ermöglichen das Fortschreiten der Replikationsgabel [70].

Die Bedeutung für die Transkription ist nicht eindeutig geklärt. Bei diesem Vorgang wird die DNA nur über kurze Strecken separiert, das Transkriptionskomplex (RNA-Polymerase, RNA-Transkript und Proteine) rotiert frei um die DNA ohne wesentliche räumliche Behinderung. Die Topoisomerasen sind als Transkriptionsfaktoren aktiv. Studien zeigen, dass ohne Topoisomerase die Aktivität von RNA-Polymerase I vermindert ist und Defekte bei der Transkription ribosomaler RNA entstehen [70].

Ein Zusammenhang besteht zwischen der Inaktivierung von DNA-Topoisomerasen und der Genominstabilität während der Rekombination [63]. Überspiralisierte verdrillte DNA-Abschnitte akkumulieren Instabilität im Genom und dienen als Ausgangsbasis für die Beschleunigung der Rekombination. TypII-Topoisomerasen sind an diesem Prozess nicht entscheidend beteiligt [63, 70].

Auch alle strukturellen Änderungen am Chromatin, wie Kondensation und Trennung der Chromosomen während der Zellteilung, stehen im engen Zusammenhang mit der DNA-Topologie. Das Chromatin ist ein dynamisches System von ständig wechselndem Organisationsgrad, bestehend aus DNA und Proteine. Seine Umwandlung zu Chromosomen während des Zellzyklus führt zu topologischen Transformationen an der DNA. Biochemische Studien konnten weder TOP2A noch TOP2B als essentielle Faktoren für die Chromatinorganisation in der Mitose identifizieren [62, 63].

A.2.4 Gewebespezifische TOP2A-Expression

Die DNA-Topoisomerasen sind hochspezifische Zellkernenzyme. Studien belegen die ubiquitäre Amplifikation und Expression des *TOP2A*-Gens in Zellkulturen und Gewebeproben und weisen eine differentielle Verteilung der Gewebeeexpression zwischen Normalgewebe und Tumor auf [71, 72].

Die mRNA-Amplifikation des *TOP2A*-Gens zeigt in Northern- und Western-Blot ein heterogenes Verteilungsmuster [62]. Auf Zellebene werden in Fetalgeweben höhere mRNA-Levels für TOP2A als für TOP2B detektiert. TOP2A wird hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, in den Proliferationszonen gefunden. Stark proliferationsaktives Gewebe, wie Thymus, Knochenmark, Milz, Darm oder Testis weisen die höchsten TOP2A mRNA-Mengen auf. Zum Vergleich wird TOP2B in einer viel größeren Anzahl von schwach proliferierenden Gewebeproben detektiert [71, 73]. Dagegen weisen Tumore mit

schwacher mitotischer Aktivität geringere, maligne Karzinome eine deutlichere TOP2A-Überexpression auf [71, 74, 75].

Auch immunhistochemisch wird das TOP2A-Enzym präferentiell in den proliferierenden Zellen nachgewiesen [62]. TOP2A wird in Normalgewebe und benignen Tumoren schwach exprimiert, dagegen in Embryonalkarzinomen, entdifferenzierten Karzinomen und Lymphomen deutlich überexprimiert [45, 46, 76-78]. Die Daten zur Korrelation der TOP2A Expression mit klassischen Prognosefaktoren und Überleben sind bei verschiedenen soliden Tumoren insgesamt stark limitiert. Häufig ist die Überexpression der TOP2A mit einer Koamplifikation wichtiger Onkogene wie p53 oder ERBB2 (HER-2/neu) assoziiert [40, 45, 46]. Besondere klinische Relevanz hat die häufig beobachtete Assoziation der HER-2/neu Amplifikation mit der TOP2A-Überexpression in verschiedenen Tumorarten [40, 45, 46, 79]. Diese Expressionsvariationen führen zu relevanten Veränderungen in der Therapieresponse von Zytostatika aus der Gruppe der Anthrazyklinen. Wichtige Bedeutung haben diese Erkenntnisse für das Therapiemanagement des Mammakarzinoms, wo Anthrazykline einen wesentlichen Bestandteil der adjuvanten Behandlungsstrategien darstellen.

Auch das Ovarialkarzinomgewebe weist eine deutliche Amplifikation des *TOP2A*-Gens auf [59, 80]. Im direkten Vergleich von TOP1, TOP2A und TOP2B zeigte sich ein signifikanter Expressionsanstieg in den Karzinomen gegenüber der Expression in benignen Zystadenomen und Normalgewebe nur bei TOP2A; TOP1 und TOP2B wiesen ein ubiquitäres Expressionsverhalten auf [73, 74, 80, 81]. Analytierte man die Expression in Bezug zu einer Platin-basierten Chemotherapie, konnte eine Expressionsreduktion [74, 81] mit niedrigerer Genexpression bei Nonrespondern verzeichnet werden [59, 80]. Die Proteinüberexpression von TOP2A scheint nicht zwingend mit der Enzymaktivität und der Genamplifikation assoziiert zu sein [75, 81, 82]. Das Ovarialkarzinomgewebe weist signifikant häufiger gesteigerte Überexpression und Enzymaktivität als benignes und Normalgewebe vom Ovar auf. Allgemeine Beobachtung ist auch die signifikante Expressions- und Aktivitätsreduktion in vorbehandelten Patientinnen nach Platin-haltiger Chemotherapie [39, 74]. Die Überexpression von TOP2A im Ovarialkarzinom ist mit signifikant schlechterem Überleben assoziiert. Wesentliche Rolle hierfür spielt auch die Koexpression der TOP2a mit dem Proliferationsmarker Ki-67 oder dem Wachstumsfaktorrezeptor ERBB-2 [18, 27, 33, 38, 83].

A.2.5 TOP2A im Hinblick auf den Zellzyklus

TOP2A unterliegt signifikanten zellzyklus-abhängigen Veränderungen in der Expression und der katalytischen Aktivität [62, 84]. Die Regulation der Aktivität von TOP2A wird über Phosphorylierung des Enzyms gewährleistet [36, 85]. Zu Beginn der G1-Phase werden niedrige Enzymlevel identifiziert. Über einen stetigen Syntheseanstieg in der S- und G2-Phase erreichen die Enzymaktivität und die Enzymmenge in der Mitose ihre höchsten Werte.

Expressionsstudien bestätigen die Korrelation von TOP2A mit dem Proliferationsindex [76, 83, 86-88]. Dieser Index beschreibt quantitativ die Rate an proliferationsaktiven Zellen und wird als Wachstumsfraktion bezeichnet. Die Ermittlung erfolgt klassischerweise über die Antikörper Ki-67 oder MIB-1. Die Bestimmung der Ki-67 positiven Zellfraktion als Prozentsatz entspricht der Wachstumsgeschwindigkeit und damit der Aggressivität des Tumors [89]. Beim Ovarialkarzinom ist eine signifikante Koexpression von Ki-67 mit TOP2A bei Frauen im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium bekannt. Dieses Expressionsverhalten ist mit einem ungünstigen Gesamtüberleben assoziiert [33].

A.2.6 DNA-Topoisomerasen als Zielmoleküle von Chemotherapeutika

In den 1980er Jahren verzeichnete die Enzymerforschung einen unerwarteten Wendepunkt als bekannt wurde, dass Topoisomerasen Zielmoleküle zytotoxischer Substanzen darstellen [65]. Pharmakologische Studien identifizierten die Enzyme als Target vieler antimikrobieller und antikarzinogener Wirkstoffe.

Die Eigenschaft von TypII Topoisomerasen doppelsträngige DNA-Brüche zu generieren, erlaubt eine gewisse funktionelle „Zwiespältigkeit“ [35]. Zum einen wird über die temporäre DNA-Strangspaltung in der Phase des Zwischenkomplexes die DNA-Topologie durch Öffnung und Neuverknüpfung von DNA-Doppelhelices verändert. Normalerweise ist diese Reaktionsstufe reversibel und der präformierte Komplex nur ein kurzlebiges Stadium im katalytischen Zyklus. Die Menge an intermediären Zwischenstufen liegt in vivo auf niedrigem Level und wird problemlos von der Zelle toleriert. Andererseits entwickelt der Spaltungskomplex eine potenzielle „Letalität“, wenn die Spaltungsreaktion fehlerhaft verläuft [35, 85]. Störungen der Enzymreaktion transformieren die physiologischen Einzelbrüche in permanente doppelsträngige Bruchstellen im gesamten Genom.

Ihre Bedeutung ist wesentlich, da sie zur Aktivierung verschiedener Reparaturmechanismen führen. Dadurch werden Insertionen und Deletionen an den Chromosomen generiert, die zu verschiedensten chromosomalen Aberrationen führen. Wenn die pathologischen DNA-Strangbrüche in ausreichender Anzahl im Genom vorhanden sind, werden apoptotische Mechanismen in Gang gesetzt, die schließlich zum Zelltod führen [85].

Pharmakologische Bedeutung entfalten die Topoisomerasen in der Wechselwirkung mit mehreren klinisch relevanten Substanzen. Nach dem Reaktionsmechanismus unterscheiden wir zwei Wirkungsgruppen: TOP2-Giftstoffe und TOP2-Inhibitoren. Die genaue Wirkungsweise ist nicht vollständig geklärt, wobei verschiedene Hypothesen diskutiert werden [35, 36, 62]. Zu den Topoisomerase-Giftstoffen zählen die Epipodophyllotoxine und die Anthrazykline. Diese Substanzen stabilisieren die katalytische Reaktion auf der Stufe des Spaltungskomplexes. Die Konzentration an gespaltenen DNA-Abschnitten steigt, wobei zelluläre Prozesse wie Replikation und Transkription ungehindert mit konstanter Geschwindigkeit weiterlaufen. Dabei überspringen sie die „erstarrten“ Enzym-Zwischenkomplexe und generieren im Genom zahlreiche pathologische Lücken, deren mutagenes Potential zum Zelltod führt. Dadurch wirkt die Topoisomerase als physiologisches Toxin [35]. Zu der Gruppe der Inhibitoren zählen die Anthraquinone (Mitoxantron), Aminoakridine (Amsakrin), Bisdioxopiperazine, Sumarin und Merbaron. Diese Substanzen stabilisieren irreversibel das Enzym in geschlossener Konformation und verhindern dadurch die eigentliche katalytische Reaktion. Auf diese Weise entwickeln sie eine antagonistische Wirkung zu der Gruppe der Giftsubstanzen [35, 62].

Die TypII-Topoisomerasen sind die primären Zielmoleküle für viele klinisch relevante Zytostatika. Hierzu zählt Doxorubicin, ein in der gynäkologischen Onkologie weit verbreitetes Zytostatikum. Die Toxizität ist am höchsten vor allem in Zellen mit gesteigerter DNA-Replikation und hoher TOP2-Expression. Obwohl beide TypII-Topoisomerasen identische Wechselwirkung mit den Wirkstoffen eingehen, wird TOP2A als das primäre Target definiert [35]. TOP2A besitzt eine höhere Sensibilität zu zytotoxischen Substanzen und weist eine bevorzugte Affinität zu neusynthetisierter DNA auf. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Rolle der TOP2A bei der Formierung von Substanzresistenzen [90]. Das Enzym soll an der Entwicklung der so genannten Atypischen Multidrug Resistance (AMR) beteiligt sein. Die Bedeutung dieser Wechselwirkungen für den klinischen Alltag ist aber wenig untersucht [36, 85].

A. 3 Zielsetzungen dieser Studie

Das Primärziel dieser Studie ist die Analyse der zellulären Expression der Topoisomerase II α (TOP2A) beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom. Die Amplifikation des *TOP2A*-Gens und die Expression des TOP2A-Enzyms werden auf Gen- und Proteinebene untersucht. Ein detaillierter Vergleich der Expressionsunterschiede von TOP2A zwischen Tumorzellen und tumor-assoziiertem Stroma in heterogenen Ovarialkarzinomproben wird durchgeführt. Die zellspezifischen Expressionsdaten werden mit etablierten klinisch-pathologischen Prognosefaktoren ausgewertet.

Auf der Genebene wird methodisch mRNA aus kryokonserviertem Karzinomgewebe mit Hilfe der laser-gestützten Mikrodissektion isoliert. Über ein Echtzeit RT-PCR Verfahren (TaqMan®) wird die *TOP2A*-Genamplifikation quantitativ untersucht. Qualitativ wird die gewebe- und zelltypische Expression des *TOP2A*-Gens über nicht-radioaktive *in-situ* Hybridisierung untersucht. Die Evaluation der TOP2A-Proteinexpression erfolgt mittels Immunhistochemie mit monoklonalem Antikörper an Paraffinschnitten und wird semiquantitativ nach dem Immunreaktiven Score (IRS) ausgewertet.

B. Material und Methoden

B. 1 Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Studie

Die Etablierung neuer diagnostischer und therapeutischer Standards im Management gynäkologischer Malignome erfordert im Hinblick auf die Vielzahl „molecular targets“ neue innovative Studienkonzepte. Die Gewebheterogenität solider Karzinome stellt diverse Schwierigkeiten bei der Interpretation der Expressionsdaten dar und erfordert komplexe Untersuchungsansätze.

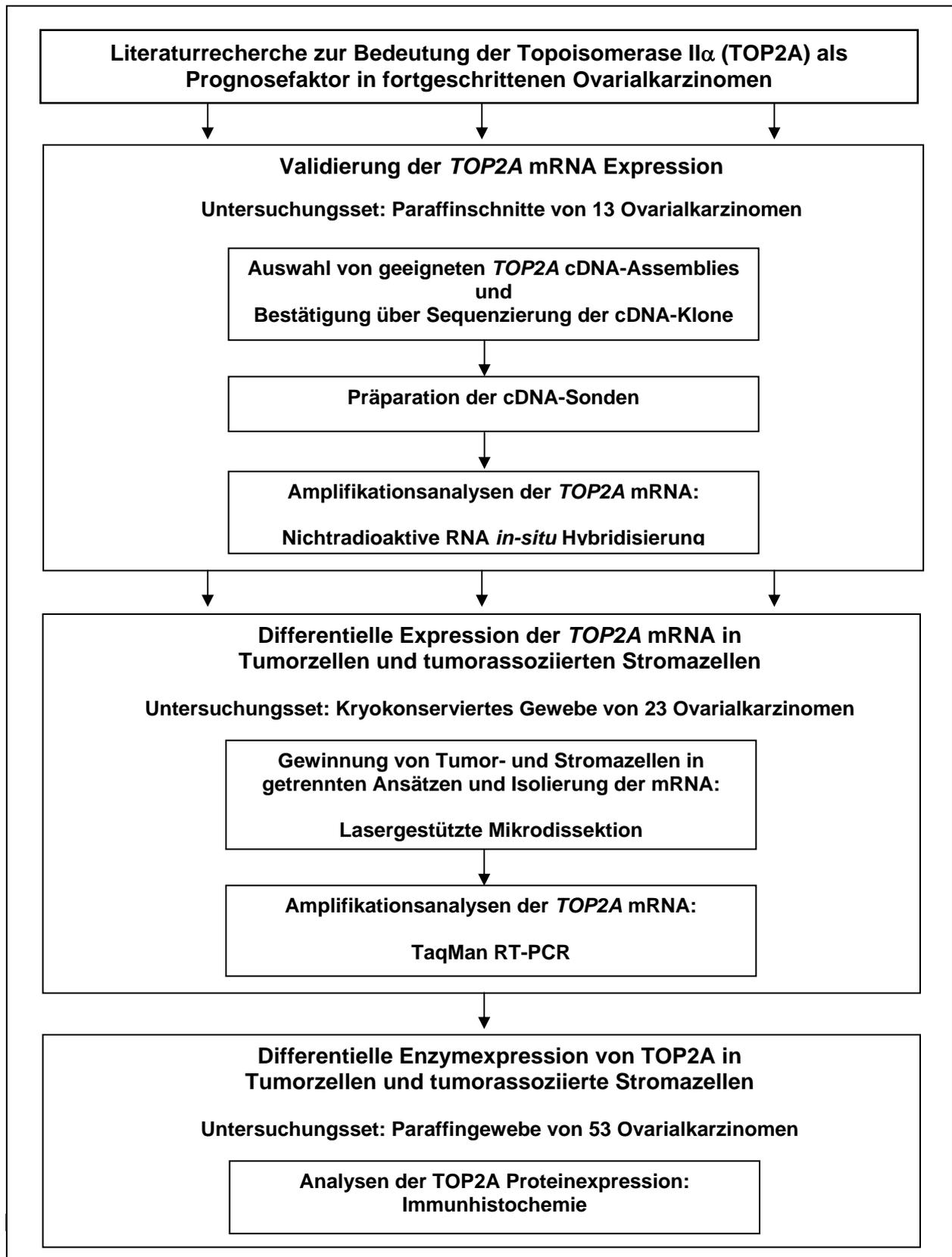
Die Topoisomerase II α (TOP2A) ist ein neuer Molekularfaktor der potentiell prognostische Bedeutung beim epithelialen Ovarialkarzinom besitzt. Neben Überexpression und gesteigerter Enzymaktivität bestehen Indizien für einen klinisch bedeutsamen Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die Chemotherapie. Hauptaufgabe dieser experimentellen Studie ist es durch moderne molekularbiologische Techniken Tumorzellen und Stromazellen von Ovarialkarzinomen auf die Expression von TOP2A zu analysieren.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgt die Evaluierung der geweblichen *TOP2A*-mRNA-Amplifikation mittels *in-situ* Hybridisierung um Erkenntnisse über die Amplifikation im Tumor und im Stroma zu ermitteln. Anschliessend wird die differentielle Expression der TOP2A untersucht. Hierzu werden an einem Set aus Primär- und Rezidivkarzinomen des Ovars die Tumor- und die tumor-assoziierten Stromaareale durch Mikrodisektion getrennt analysiert. Die *TOP2A*-Genamplifikation wird auf der mRNA-Ebene mittels TaqMan® RT-PCR untersucht. Auf der Protein-Ebene wird das Expressionsverhalten des Enzyms analysiert.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse soll zum einen die Unterschiede in der *TOP2A*-Amplifikation zwischen Tumor und tumor-assoziiertes Stroma in den heterogenen Ovarialkarzinomproben untersuchen. Der Bezug zu den Nachbeobachtungsdaten des untersuchten Kollektivs (Gesamtüberleben) soll Aufschluss über die klinisch-prognostische Relevanz der Expressionsdaten liefern. Eine schematische Darstellung der Zielsetzung und der Vorgehensweise unserer Studie zeigt Tab. 2.

Tab. 2:

Flussdiagramm über die Zielsetzung und Vorgehensweise in dieser Arbeit



B. 2.1 Patientinnen und Untersuchungsmaterial

Die Gewebeproben zur Bestimmung des Expressionsverhaltens der TOP2A stammen von einem Patientinnenkollektiv aus 62 Frauen mit primärem oder rezidiviertem Ovarialkarzinom, die zwischen Oktober 2000 und Oktober 2001 in der Gynäkologischen Abteilung der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité-Universitätsmedizin, Campus Virchow Klinikum, Berlin, chirurgisch behandelt wurden. Alle Gewebeproben und klinischen Daten wurden im Rahmen der „Tumor Bank Ovarian Cancer“ archiviert und aufgearbeitet (www.toc-network.de). Alle Tumorproben wurden intraoperativ nach einem standardisierten Protokoll gewonnen und prospektiv verfolgt [4]. In 16 Fällen wurden uns Paraffinblöcke von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom im Rahmen eines Kooperationsprojektes von der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Hoyerswerda zur Verfügung gestellt. Vor der Operation erfolgte die Patientinnenaufklärung und Einholung des schriftlichen Einverständnisses. Ein Ethikvotum der Ethikkommission liegt vor.

Die Gewinnung der Gewebeproben erfolgt unmittelbar nach der chirurgischen Resektion anhand eines Asservierungsprotokolls. Einen Teil des Materials wurde in flüssigem Stickstoff bei ca. -180°C eingefroren und später für die mRNA-Isolierung (aus mikrodisszierten Zellen) und TaqMan® Expressionsanalysen verwendet. Die mRNA und Protein Expressionsexperimente (*in-situ* Hybridisierung und Immunhistochemie) erfolgen an Formalin fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben.

Für die TaqMan-Analysen wurde auch kommerzielle mRNA aus humanen Ovar-Normalgewebeproben der Firma Clontech bezogen.

B. 2.2 Erhebung der klinischen Daten

Erhebung und Kodierung krankheitsrelevanter Daten werden prospektiv durchgeführt. Die klinische Daten werden nach einem standardisierten Protokoll [4] sowohl intraoperativ (Befragung des Operateurs), als auch mit Hilfe der jeweiligen Krankenblätter und Tumorakten erhoben (Tab. 3). Für die Nachbeobachtung ist wichtig, dass die überwiegende Zahl der Patientinnen nach ihrer Entlassung in der ambulanten Tumornachsorge (Ovarsprechstunde) der Frauenklinik Charité Campus Virchow Klinikum betreut werden. Hierdurch ist eine komplette Erfassung des Krankheitsverlaufs möglich. Darüber hinaus bestehen regelmäßige Kontakte zu den jeweiligen

behandelnden Ärzten. Neben der Gewebeasservierung wurden auch folgenden Daten zu jeder Patientin miterfasst: Histopathologie, chirurgische und zytostatische Therapie, allgemeine Anamnese, wie in Tabelle 4 dargestellt.

Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom erhielten als Standardoperation eine mediane Längsschnittlaparotomie mit bilateraler Adnexektomie, Hysterektomie, Omentektomie und systematischer pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie. Im Anschluss erfolgte die leitliniengerechte [26] adjuvante Chemotherapie mit 6 Zyklen Paclitaxel 175 mg/m² und Carboplatin nach AUC5 (platin-naives Kollektiv). Alle Frauen mit Ovarialkarzinomrezidiv wurden i. S. eines radikalen Tumordebulkings häufig mit Dünn- und/oder Dickdarmresektionen als Teil des gesamtchirurgischen Konzepts operiert. Alle Patientinnen in der Rezidivsituation haben mindestens eine platinhaltige Chemotherapie erhalten (platin-vorbehandeltes Kollektiv), mehrere befinden sich in der Zweit- oder Drittlinie Chemotherapie. Die Rezidivpatientengruppe besteht vorwiegend aus Frauen mit einem Spätrezidiv (krankheitsfreies Intervall ≥ 6 Monaten).

Die Zuordnung zu der FIGO und TNM Klassifikation erfolgt auf Basis des histologischen Befundes unter Berücksichtigung des intraoperativen Situs und der klinischen Befunde. Anhand der pathologischen Beurteilung erfolgt bei jeder Patientin die Bestimmung der Histologie und Differenzierungsgrad. Bei unklarem histologischem Befund, z. B. G2/3, wurde stets die schlechtere Differenzierung G3 übernommen. Zur Evaluation der Tumorausbreitung werden der Tumorbefall, die Tumorreduktion und der postoperative Tumorrest sowie die Aszitesmenge und das Vorkommen von Peritonealkarzinose intraoperativ anhand der Beschreibung durch die Operateure erfasst. Bei dem Tumorrest wird zwischen makroskopisch tumorfrei (R0) und postoperativer Rest ≤ 2 cm (R1) und > 2 cm (R2) unterschieden. Bei Metastasen wird zwischen den Lokalisationen Douglasperitoneum, Omentum, Mesenterium, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Zwerchfellperitoneum, Bauchwand, Pleura und Leber wie nach Asservierungsprotokoll vorgeschrieben, unterschieden. Diese Daten werden auch bei der Asservierung der einzelnen Gewebeproben berücksichtigt und dementsprechend kodiert.

Für die kommerziell erworbenen Ovar-Normalgewebeproben werden, soweit verfügbar, die klinischen Angaben der Lieferfirmen (Clontech bzw. Invitrogen) verwendet.

Tab. 3:

Standard Operating Preparations Protokoll befolgt bei der Erhebung der klinischen Daten [4]

Histopathologie	Erkrankungsonkologie		Allgemein
<ul style="list-style-type: none"> • Gewebe-Lokalisation • Gewebe-Typ • Histologie • FIGO - Klassifikation • TNM - Stadium • Grading • Asservierungsart 	Operation	Chemotherapie	<ul style="list-style-type: none"> • Alter bei Erstdiagnose • Gewicht • Größe • Familiäre Anamnese • Gynäkologische Anamnese • Geburtshilfliche Anamnese • Symptome • CA 125 Wert (U/ml)
	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor-Befall • Tumor-Reduktion • Tumor-Rest • Peritonealkarzinose • Aszites (Menge) • OP-Methoden 	<ul style="list-style-type: none"> • Art (Substanzen) • Therapieanzahl • Ansprechen nach Platin-first line Chemotherapie 	
Nachbeobachtung			

B. 3 Auswahl, Präparation und Bestätigung von cDNA-Klonen für *TOP2A*

Für die Expressionsanalysen werden spezifische cDNA-Klone für das *TOP2A*-Gen ausgewählt und als *E.coli*-Klone aufgearbeitet. Diese enthalten Teilsequenzen des *TOP2A*-Gens integriert als Insert in der extrachromosomalen-Plasmid-DNA. Um sicherzustellen, dass nach der Aufarbeitung mindestens eine bestätigte cDNA-Sequenz für *TOP2A* vorliegt, werden mehrere Klone ausgestrichen, als Einzelkolonien gepickt und im Flüssigmedium vermehrt. Anschließend wird die Plasmid-DNA präpariert und durch Sequenzierung bestätigt. Aus den bestätigten cDNA-Proben erfolgt die Generierung der Sonden für die RNA *in-situ* Hybridisierung. Über EDV („Repeat Masker“) wird sichergestellt, dass keine repetitiven Basenabfolgen in der cDNA-Sequenz vorliegen, die unspezifische Signale verursachen können.

B. 3.1 Herkunft der IMAGE cDNA-Klone für *TOP2A*

Die Auswahl der IMAGE cDNA-Klone für das *TOP2A*-Gen erfolgt aus der NCBI UniGene-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tab. 4) Dabei werden öffentliche Bakterien-Klone ausgewählt und bei Incyte Genomics (St. Louis, MO, USA) bestellt. Die *E.coli*-Klone werden als Agarsteps geliefert und können sofort bearbeitet werden.

Tab. 4:

Bearbeitete cDNA-Klone für *TOP2A*. Die Angaben zu den einzelnen Klonen stammen aus der Homepage des National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Gen	Genbank Acc. Nr.	Datenbank EST ID	IMAGE Klon ID	Vektor	Gewebe/ Ursprung	Insert in bp (Basenpaare)
TOP2A	AA047124	661887	489020 5'	pT7T3D-Pac	Uterus	569
	AA505822	1150452	966600 3'	pT7T3D-Pac	Brust	1111
	AA968782	1705210	1593682 3'	pBluescript SK-	Nierentumor	1788
	AI624669	2443473	2231341 3'	pCMV-Sport6	Uterus-Karzinom	2662

B. 3.2 Präparation der Plasmid-DNA für die Sequenzanalyse

Die als Agarsteps gelieferten *E.coli*-Klone mit *TOP2A* Inserts werden auf Agarplatten ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Im ersten Schritt werden die Sequenzen dieser Expressed Sequence Tags (EST) überprüft. Dazu erfolgt die *E.coli*-Vermehrung in Flüssigkultur und anschliessend die Minipräparation der Plasmid-DNA. Durch Restriktionsverdau der Plasmid-DNA-Proben werden die cDNA-Inserts isoliert, elektrophoretisch quantifiziert und mittels Sequenzierung bestätigt. Im zweiten Schritt erfolgen die Aufarbeitungen der bestätigten Klone im größeren Volumen und die Maxipräparation zur Gewinnung ausreichender cDNA-Mengen für die Studienexperimente. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Arbeitstechniken zur Präparation von Plasmid-DNA beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse, modifiziert nach Birnboim und Doly [91]. Das Prinzip ist die Trennung der chromosomalen Bakterien-DNA durch alkalische Denaturierung und Fällung der extrachromosomalen Plasmid-DNA. Nachfolgend werden alle Einzelschritte nach Protokoll kurz dargestellt.

B. 3.2.1 Kultivierung der Einzelkolonien

Die Klone werden in Abhängigkeit von der Resistenz auf LB-Agarplatten (Luria-Bertoni) mit 100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin (Fluka Biochemica, Neu-Ulm, Deutschland) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach etwa 12 h werden von jedem Klon drei Einzelkolonien gepickt und jeweils in 2 ml LB-Flüssigkultur 10h bei 37° im Schüttelschrank kultiviert. Von jeder Flüssigkultur werden 0,5 ml für ein 1 ml

Glycerinstock (15% Glycerin) angesetzt, um von diesem später die Maxipräparation der genspezifischen Sonden durchzuführen. Aus den restlichen 1,5 ml erfolgt die Minipräparation der Plasmid-DNA für die Sequenzanalysen.

B. 3.2.2 Minipräparation der Plasmid-DNA

Die Minipräparation der Plasmid-DNA erfolgt mittels GFX™ *Micro* Plasmid Prep Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die 1,5 ml *E.coli*-Kultur wird abzentrifugiert (12.000 x g, 30 sec, Raumtemperatur (Rt)) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wird in 150 µl isotonischen Resuspensionspuffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 400 µg/ml RnaseI, pH 7,5) durch Vortexen aufgenommen. Die Suspension wird anschließend in 150 µl Lysispuffer (200 mM NaOH, 1%SDS) aufgelöst und das denaturierte Lysat nach Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (3M KAc, pH 5,5) präzipitiert. Nach Zentrifugieren der chaotropen Lösung (12.000 x g, 5 min, RT) wird die Plasmid-DNA als Überstand von der denaturierten chromosomalen *E.coli*-DNA und Proteinen abpipettiert und auf die vorbereiteten GFX™-Säulen gegeben. Erneute Zentrifugation der Proben erfolgt nach einer Minute Inkubationszeit (12.000 x g, 30 sec, RT). Die an die Glasmatrix der Säulen gebundene Plasmid-DNA wird mit 400 µl Waschpuffer (80% Ethanol in Tris-EDTA Puffer) gewaschen. Durch Zugabe von 50 µl TE-Puffer wird die DNA eluiert und bei -20°C gelagert.

B. 3.2.3 Kontrollrestriktionsverdau der Plasmid-DNA

Durch den Restriktionsverdau werden alle genspezifischen cDNA-Inserts von der Vektor-DNA abgetrennt. Dafür werden Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenzen mit großer Spezifität die Insertionsstellen der cDNA-Fragmente erkennen und durchschneiden, eingesetzt. Je nach Klonierungsvektor werden verschiedene Kombinationen von Restriktionsendonukleasen ausgewählt (Tab. 5). Die quantitative Auswertung nach dem Linearisierungsverdau erfolgt durch Elektrophorese.

Tab. 5:

Auswahl der Enzyme für den Restriktionsverdau der bearbeiteten Vektoren.

Vektor	Restriktionsenzym 1	Restriktionsenzym 2	Restriktionspuffer
pT7T3D	EcoR I (Ava I)	Hind III (Not I)	Puffer B (H)
pCMV-Sport 6	EcoR I	Hind III	Puffer B
pBluescript SK-	EcoR I (Xba I)	Xho I (Pst I)	Puffer H

In dem Kontrollrestriktionsverdau werden 500 ng Plasmid-DNA mit 5 Einheiten der für den Vektor entsprechende Enzymkombination (Restriktionsendonuklease 1 und Restriktionsendonuklease 2) mit 1x Einheit Restriktionspuffer in einem 20 µl Ansatz für 2h bei 37°C verdaut. Die Enzyme und Restriktionspuffer für den Linearisierungsverdau sind alle von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) bezogen. Der Ansatz wird mit 1/6 Gel-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Größenstandard in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Fragmente werden durch Ethidiumbromid-Färbung (0,5 µg/ml in H₂Odest, 15 min) spektroskopisch detektiert (UV-Spektrometer Ultrospec 2000).

B. 3.3 Sequenzierung der *TOP2A* cDNA-Inserts

Die Richtigkeit der cDNA-Inserts aus den gelieferten Klonen wird durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzbestimmung erfolgt nach dem enzymatischen Kettenabbruchverfahren[92]. Dabei wird die Eigenschaft der DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA zu einem Doppelstrang zu ergänzen, genutzt. Die Reaktion beginnt von einem doppelsträngigen Startpunkt (Primerbindung) aus und führt zur Synthese des komplementären DNA-Strangs. Das Enzym katalysiert die Kettenverlängerung durch Phosphodiesterbildung zwischen der 5'-Phosphat und der 3'-OH-Gruppe der Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTP). Entscheidend bei diesem Verfahren ist die Fähigkeit der DNA-Polymerase, auch Didesoxy-Nukleosidtriphosphate (ddNTP), die natürlicherweise nicht vorkommen, als Substrat zu verwenden. Diese Terminator-ddNTP's führen zum Abbruch der Kettenverlängerung, da sie nicht nur an der 2', sondern auch an der 3'-Position desoxygeniert sind, d. h. die 3'-OH-Gruppe fehlt. Die automatisierte Sequenzierung benötigt als Startmaterial große Mengen gereinigten DNA's, das durch PCR-Amplifikation gewonnen wird. Zuerst entstehen einzelsträngige DNA-Moleküle durch Denaturierung, an diese werden Primer in Form eines

Oligonukleotids angelagert und die dabei gebildeten DNA-Primer-Doppelstränge durch die DNA-Polymerase verlängert. Im Sequenzieransatz-Mix für die Kettenverlängerung sind neben den üblichen Nukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide erhalten, die zum Kettenabbruch führen. Jede der vier Basen der ddNTP's ist durch einen Fluorochrom-Komplex aus Fluoreszein und Rhodamin markiert, die spezifische Absorptions- und Emissionsspektren besitzen. Im zyklischen Prozess der Amplifikation entstehen markierte DNA-Ketten unterschiedlicher Länge, deren Synthese beim Einbau eines Terminator-ddNTP's abgebrochen wurde. Sie werden elektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Detektion der terminierten Fragmente werden die eingebauten Fluorophore am Ende der Auftrennung durch einen Laser angeregt und die emittierte Strahlung ermittelt. Die Rohdaten werden von dem Sequenzierautomaten auf Software-Programme übertragen. Nach entsprechender Auswertung kann die ermittelte Sequenz mit der bestehenden Sequenz des Gens verglichen und bestätigt werden.

Für die Durchführung der Sequenzbestimmungen wird das Dye ET-Mix (DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Für die jeweiligen Klonierungsvektoren sind entsprechende Sequenzierprimer ausgewählt (Tab.6). Die automatisierte Sequenzanalyse erfolgt im Sequenzierautomat ABI™ Prism™ 377 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Die Sequenzierdaten werden mit den Programmen „Reap“ und „Scope“ (Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena, Deutschland) und anschließend die bestätigten Sequenzabschnitte mit der „Gap4“-Software bearbeitet.

Tab. 6:

Auswahl der Sequenzierprimer für die jeweiligen Vektoren

Vektor	5'-Primer/Sequenz (forward)	3'-Primer/Sequenz (reverse)
PBluescript SK-	T3 20mer (5pmol/μl)	M13 (-20) 17mer (5pmol/μl)
	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
PT7T3D (-PAC)	M13 for (-21) 18mer (5pmol/μl)	T7 20mer (5pmol/μl)
	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
PCMV-Sport6	M13 for (-21) 18mer (5pmol/μl)	M13 rev 19mer (5pmol/μl)
	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Bei der Sequenzierung wird ein 15 µl Ansatz aus 1 µl Primer (5 pmol/µl), 6 µl Dye ET Premix und etwa 500 ng Plasmid-DNA über 25 Zyklen amplifiziert (94°C, 30 sec; 50°C, 10 sec; 60°C, 1 min). Die Reinigung erfolgt anschließend über G-50 Sephadex™ Säulen (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden). Diese werden folgenderweise vorbereitet: auf 96-well Multi-Screen-Platte wird 0,3 mg G-50 Sephadex™ Pulver überführt in je 300 µl Millipore-Wasser aufgenommen und 3 h inkubiert (Rt). Danach werden die Säulen abzentrifugiert (910xg, 5min, Rt), die Proben aufgetragen und durch nochmalige Zentrifugation (gleiche Bedingungen) von freien Terminatormolekülen gereinigt. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wird die amplifizierte DNA 30min bei 80°C im Wärmeschrank getrocknet und in 2 µl Ladepuffer aufgenommen. In der 96-well-Platte werden die Proben für mindestens 30 min bei Rt geschüttelt, für 5 min bei 80°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gestellt.

Die elektrophoretische Auftrennung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente wird auf einem 5,25% Polyacrylamidgel, 6M Harnstoff (48 cm lang, 200 µm dick; PAGE plus Amresco, Solon, USA) durchgeführt. Ein 50 ml Gel-Ansatz wird aus 18 g Harnstoff, 6,6g PAGE-plus und 5 ml 10xTBE, aufgefüllt mit Millipore-Wasser, vorbereitet und durch 250 µl 10% Ammoniumpersulfat und 25 µl TEMED polymerisiert. Für die Sequenzbestimmung wird auf dem Gel 1ml Sequenzierprobe aufgetragen. Nach entsprechenden Einstellungen am ABI™ Prism™ 377 Sequenzierautomaten (Elektrophoreseleistung 200 W, Gel-Temperatur 51°C, Laserleistung 40 mW, Laufzeit 12 h, CCD-Einstellung 250, CCD-Empfindlichkeit 2, CCD x Pixel Position 196) kann die elektrophoretische Auftrennung starten. Nach Beendigung der Reaktion werden die Rohdaten zuerst mit den Programmen „Reap“ und „Scope“ qualitativ ausgewertet und anschließend mit den im Programm „Gap4“ gespeicherten Gensequenzen verglichen und gegebenenfalls bei Bestätigung aufgenommen.

B. 3.4 Maxipräparation der Plasmid-DNA

Durch Sequenzierung sind zwei der in Tab. 4 aufgelisteten *E.coli*-Klone bestätigt worden: AA047124 und AI624669. Es erfolgt die Aufarbeitung der bestätigten cDNA-Klone in einem größeren Volumen. Durch die anschließende Maxipräparation sollen ausreichende Mengen genspezifischer cDNA für die weiteren Expressionsexperimente gewonnen werden. Die eingesetzte Methode zur Isolierung der Plasmid-DNA basiert auf dem modifizierten Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Maxipräparation wird das

NucleoBond® AX 500 Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) eingesetzt. Durch alkalische Denaturierung der gesamten Bakterien-DNA und anschließender Zugabe von Kalium-Acetat werden die chromosomale *E.coli*-DNA und Zelltrümmer ausgefällt. Die extrachromosomale Plasmid-DNA behält ihre räumliche Struktur und wird über spezifische Adsorption an den NucleoBond® Säulen isoliert und aufgereinigt.

B. 3.4.1 Inkubation einer Vorkultur

Für jeden bestätigten cDNA-Klon wird von dem jeweiligen Glyzerinstock 2 ml LB-Medium (Ampicillin 10 µg/ml) angeimpft und 6 h kultiviert. Danach wird 100 µl Vorkultur in 500 ml LB-Flüssigmedium (Ampicillin 100 µl/ml) überführt und unter Schütteln bei 37°C etwa 12 h inkubiert.

B. 3.4.2 Maxipräparation

Der 500 ml Kulturansatz wird nach dem NucleoBond® AX 500 Kit Standardprotokoll bearbeitet. Das LB-Medium wird vom Bakterienpellet durch Zentrifugation (5000 x g, 15 min, 4°C) abgetrennt. Für die Lyse der Bakterien erfolgt im ersten Schritt die Aufnahme des Pellets unter Vortexen im 12ml S1-Resuspensionspuffer (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µl/ml RnaseA, pH 8,0). Danach werden die Zellen durch Zugabe von 12 ml S2-Lysispuffer (200 mM NaOH, 1% SDS) lysiert (maximal 5 min, Rt). Das denaturierte Lysat inkubiert und präzipitiert mit 12 ml S3-Neutralisationspuffer (2,8M KAc, pH 5,1) 5 min auf Eis. Durch die anschließende Zentrifugation (5000 x g, 40 min, 4°C) erfolgt die Auftrennung der Plasmid-DNA im Überstand von dem Pellet aus Präzipitaten chromosomaler DNA und Proteine. Der Überstand wird durch einen Faltenfilter filtriert und auf die mit 5 ml N2-Puffer (100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Triton X-100, pH 6,3) equilibrierten NucleoBond® Säulen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 12 ml N3-Puffer (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,15M KCl, pH 6,3) kann die adsorbierte Plasmid-DNA mit 12ml N5-Puffer (100mM Tris, 15% Ethanol, 1M KCl, pH 8,5) von der Säule eluiert werden. Die isolierte DNA wird durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (15.000 x g, 30 min, 4°C). Nach dem Verwerfen des Überstands wird das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (15.000 x g, 10 min, 4°C) und bei Rt getrocknet. Die aufgereinigte DNA wird anschließend in 500 µl BE-Puffer (10mM Tris, pH 8,5) aufgenommen. Die

Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde über Gelelektrophorese neben einem DNA-Standard bestimmt.

B. 4 Nichtradioaktive RNA *in-situ* Hybridisierung

Die Methode der *in-situ* Hybridisierung beschrieben erstmals von John und Gall[93, 94], ermöglicht die qualitative und semiquantitative Expressionsanalyse von Nukleinsäuren im nativen Gewebe. Das Grundprinzip ist der spezifische Nachweis von DNA- oder RNA-Sequenzen durch den Einsatz einer markierten Nukleinsäure-Sonde, die komplementär zu der analysierten Sequenz ist. Als Sonde können sowohl DNA als auch RNA Fragmente genutzt werden, die radioaktiv oder nicht-radioaktiv mit Digoxigenin (DIG), Biotin oder Fluorochromen zur Visualisierung markiert werden. Der Vorteil dieser Technik besteht in der Untersuchung der Genaktivität in der nativen, zellulären Umgebung. Die größte Spezifität und Sensitivität bei dem Nachweis aktiver Genen besitzen mRNA-Sonden, weil sie spezifisch nur die neu transkribierten Sequenzen lokalisieren. In dieser Studie werden RNA-Sonden eingesetzt. Für die Sondenpräparation wird das „DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)“ von Roche (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) verwendet. Die RNA-Sonden werden über *in-vitro* Transkription von genspezifischer cDNA generiert und über das DIG-Detektionsverfahren markiert [95]. Für diese Methode werden T3-, T7- und SP6-Promotorsequenzen der jeweiligen Klonierungsvektoren verwendet [96].

Zu Beginn der Sonden-Präparation wird die Plasmid-cDNA der bestätigten *E.coli*-Klone linearisiert. Bei der anschließenden *in-vitro* Transkription wird durch die RNA-Polymerase unter Einbau von Digoxigenin-markierten dUTP die komplementäre Antisense-Sonde transkribiert. Gleichzeitig wird eine nicht-komplementäre Sense-Sonde als Negativkontrolle *in-vitro* synthetisiert, um die Spezifität des Hybridisierungsignals zu überprüfen. Zu Beginn der Hybridisierung werden die paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten in einem Vorhybridisierungsschritt entparaffiniert, rehydriert und fixiert. Bei der Hybridisierung erfolgt die Inkubation der mRNA-Sonden auf den Gewebeschnitten. Die anschließende Detektion geschieht durch die Bindung des alkalischen Phosphatase-gekoppelten Anti-DIG-Antikörpers. Die Hybridisierung wird über die enzymkatalytische Präzipitation des Farbsubstrates BM-Purple visualisiert. Eine Überprüfung der Spezifität des Signals ist durch die zelluläre Lokalisation des Präzipitates und der Sense-Negativkontrolle möglich.

B. 4.1 Gewebeproben

Für diese Methode werden intraoperativ in Formaldehyd asservierte und nach Standardprotokoll zu Paraffinblöcken eingebettete Gewebeproben von 13 Patientinnen mit Ovarialkarzinom verwendet. Nach histopathologischer Begutachtung werden Ultramicrotom-Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt. Für das Untersuchungsset werden von jedem Gewebeblock jeweils Paraffinschnitte für die Antisense-, Sense-Ansätze und die HE-Kontrolle vorbereitet.

B. 4.2 Präparation der RNA-Sonden

B. 4.2.1 Linearisierung der Plasmid - DNA

Die Restriktionsspaltung überführt die ringförmige Plasmid-DNA in einer offenen, linearen Form, um die Bindung der RNA-Polymerase zu ermöglichen. Für die Linearisierung wird DNA von der Maxipräparation eingesetzt. Zwei getrennte Ansätze jeweils für die Antisense- und Senseprobe werden verdaut. Die linearisierte DNA wird mittels Phenol-Chloroformextraktion aufgereinigt und durch Zugabe von Na-Acetat gefällt. Der Ansatz wird elektrophoretisch aufgetrennt und über DNA-Standard quantifiziert. Je nach Klonierungsvektor kommen bestimmte Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen bei der Sonden-Präparation zum Einsatz (Tab.7).

Tab. 7:

Restriktionsenzyme für die Linearisierung und RNA-Polymerasen für die *in - vitro* Transkription

Vektor	DNA - Linearisierung: Restriktionsenzyme		<i>in-vitro</i> Transkription: RNA-Polymerasen	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense
pT7T3D	EcoRI (Aval)	HindIII (NotI)	T3	T7
pBluescript SK-	EcoRI (Xbal)	XhoI (PstI)	T7	T3

Für den Restriktionsansatz wird 20 µg Maxipräp-DNA mit 6 µl Endonuklease und 10 µl 10x Restriktionspuffer 3 h bei 37°C verdaut. Die Aufreinigung erfolgt unter Durchmischung mit 1 Vol Phenol (Tris-gesättigt, pH 8,0) und Zentrifugation (14.000 x g, 5 min, Rt). Der wässrige Überstand, welcher die linearisierte DNA enthält, wird abgenommen, mit 1 Vol Chloroform versetzt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand

mit der DNA wird erneut abgenommen und mit 1/10 Vol 3M NaAc (pH 7,0) und 2,5 Vol 100% Ethanol (0°C) durchmischt, 10 min bei -80°C gefällt und abzentrifugiert (14.000 x g, 20 min, 4°C). Das Pellet wird mit 400µl 70% Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (wie oben), luftgetrocknet und in 40 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die elektrophoretische Auftrennung (1% Agarose-Gel) dient zur Kontrolle der linearisierten DNA und ermöglicht die Konzentrationsabschätzung gegenüber des DNA-Längenstandards (Marker III, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Hierfür werden 1 µl Probe und 250 ng Standard auf das Gel aufgetragen und über den Vergleich mit dem Marker die DNA-Menge ausgerechnet.

B. 4.2.2 *In-vitro* Transkription der linearisierten cDNA

Von der linearisierten cDNA werden mit Hilfe thermostabiler RNA-Polymerase, unter Einbau von Digoxigenin markierten dUTP, die Antisense- und Sense-Sonden *in-vitro* transkribiert. Nach LiCl-Fällung und Ethanol-Reinigung erfolgt die elektrophoretische Kontrolle der generierten RNA-Proben gegenüber einem RNA-Größenstandard. Die Antisense-RNA-Sonde - entspricht einer reifen mRNA (nach Herausschneiden der Introns) - wird bei der Hybridisierung zur Detektion der *TOP2A*-Transkripte eingesetzt. Die Sense-Sonde als Negativ-Kontrolle dient zur Überprüfung der Spezifität des Antisense-Signals.

Für die *in-vitro* Transkription wird 1µg linearisierte DNA in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl DIG RNA Labeling Mix (je 10 mM ATP, CTP, GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP, pH 7,5), 2 µl 10xTranskriptionspuffer (400 mM Tris-HCl, 60 mM MgCl₂, 100 mM DTE, 20 mM Spermidine, 100 mM NaCl, 1 Unit/ml RNase Inhibitor, pH 8,0), 16 Units RNase Inhibitor und 24 Units RNA-Polymerase für 3h bei 37°C inkubiert. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 2,5 µl 4M LiCl₂ und 75 µl 100% Ethanol (10 min, -80°C) und anschließende Zentrifugation (13.000 x g, 30 min, 4°C). Das RNA Pellet wird mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (13.000 x g, 10 min, 4°C), luftgetrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die elektrophoretische Überprüfung der *in-vitro* Transkription erfolgt auf ein 0,7% RNA-Agarose-Gel (1x MOPS-Puffer, 1% Formaldehyd). Für die Probenvorbereitung wird 1 µl RNA mit 5 µl Formamid, 2 µl Formaldehyd, 1 µl Ethidium Bromid (400 µg/ml) und 1µl 10 x MOPS-Puffer 10 min bei 65°C inkubiert und auf Eis gestellt. Die Proben sind mit 2 µl RNA Ladepuffer (50% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau, 0,4% Xylencyanol) neben einem RNA-

Größenstandard auf Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA-Sonden werden in 1/20 Hybridisierungslösung aufgenommen und bei -20°C gelagert.

B. 4.3 Nichtradioaktive *in-situ* Hybridisierung

In-vitro transkribierten RNA-Sonden werden eingesetzt um komplementäre mRNA-Transkripte des *TOP2A*-Gens nachzuweisen und die Expression beim Ovarialkarzinom zu untersuchen. Nach Vorbehandlung der Paraffinschitte wird die DIG-markierte Probe hybridisiert und nach Inkubation mit dem Anti-DIG-Antikörper, gekoppelt an alkalischer Phosphatase, über BM-Purple als Substrat detektiert. Alle Reagenzien einschließlich des Anti-DIG-Antikörpers, Blocking-Stocks und BM-Purple-Substrates sind von Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland.

B. 4.3.1 Vorhybridisierung und Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung werden die Paraffinschnitte mittels Xylol entparaffiniert und über absteigende Alkoholreihe rehydriert. Nach Inkubation mit Paraformaldehyd (PFA) zur Gewebefixation erfolgt die enzymatische Proteolyse durch Proteinase-K, um bessere Zugänglichkeit für die Sonde zu erreichen. Bei der anschließenden Hybridisierung erfolgt die Bindung der RNA-Sonde zu komplementären mRNA-Transkripten des *TOP2A*-Gens. Für alle Inkubationsschritte werden gebackene Küvetten benutzt. Alle eingesetzten Lösungen (mit Ausnahme von Proteinase-K- und Tris-Puffern) werden mit 0,1% DEPC angesetzt und sterilisiert.

Vorhybridisierung: Die Schnitte werden dreimal 10 min in Xylol entparaffiniert. Über absteigende Ethanol-Reihe (2 x 5 min 100%, danach 1 min in 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%) erfolgt die schrittweise Rehydrierung und Überführung ins wässrige Medium 1 x PBS (2 x 5 min). Die Proben werden anschließend 30 min in 4% PFA fixiert, zweimal 5min in 1 x PBS gewaschen und 10 min mit Proteinase-K (10 µg/ml Proteinase K, 20mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,2) angedaut. Nach der Permeabilisierung wird das instabile Gewebe 5 min in 1 x PBS gewaschen, erneut in 4% PFA (30min) nachfixiert und zur Reagenzienentfernung in 1 x PBS (2 x 5 min) und 2 x SSC (2 x 2 min) gewaschen. Danach inkubieren die Schnitte mindestens 30min in Tris-Glycin-Puffer bis zur Hybridisierung.

Sonden-Hybridisierung: Die überschüssige Puffer-Flüssigkeit wird von den Schnitten entfernt. Nach Zugabe von 100 µl Hybridisierungslösung (2,5 ng/µl RNA-Sonde) werden die Präparate mit frischen Parafilm-Streifen abgedeckt für die Gleichverteilung der Flüssigkeit. Die Objektträger werden mit der Schnittfläche nach oben in 4-well-Schalen gelegt und 12 h in feuchter Schüttelkammer bei 65°C hybridisiert.

B. 4.3.2 Post-Hybridisierung und Antikörper-Inkubation

Bei der RNA-Hybridisierung entstehen *in-situ* nicht nur Hybride mit komplementären RNA-Fragmenten, sondern auch ein gewisses Maß an Fehlpaarungen (*mismatch*). Um bei der späteren Detektion nur RNA-Sonden nachzuweisen, die an das *TOP2A*-mRNA gebunden haben, werden Sondenfragmente, die an Sequenzen mit geringerer Homologie gebunden haben, durch Waschen mit SSC-Lösung abgetrennt. Nach zwei weiteren Formamid-Waschschritten ist die ungebundene RNA enzymatisch abgebaut und mit NTE-Puffer abgewaschen. Die Präparate inkubieren mit dem Anti-DIG-Antikörper.

Post-Hybridisierung: Die Gewebeschnitte werden nach dreimaligem Waschen in 5 x SSC (je 20 min, Rt) in Formamid-Waschlösung (20% Formamid, 0,5 x SSC) für 40 min bei 60°C inkubiert. Die Formamid-Lösung wird einmal gewechselt und langsam abgekühlt (von 60°C auf 37°C über ca. 1,5 h). Nach dem nächsten Waschschritt in NTE-Puffer (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, 0,5 mM EDTA) für 15 min und 37°C erfolgt der enzymatische Abbau der ungebundenen RNA mittels RNase A (10 µg/ml) in NTE-Puffer über 30 min bei 37°C. Die abgebauten Fragmente werden durch erneutes Waschen in NTE-Puffer (15 min, 37°C), Formamid-Lösung (40 min, 60°C) und 2 x SSC-Lösung (2 x je 15 min, Rt) abgetrennt.

Antikörper-Inkubation: Die Präparate werden in einem ersten Schritt in 1% Blocking-Lösung (1% Blocking-Stock, 0,1% Tween20 in 0,1M Maleinsäure-Puffer) über mindestens 1 h vorinkubiert. Nach Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit werden die Gewebeschnitte mit 1000 µl verdünnter Anti-DIG-Antikörper-Lösung (1:5000 in 1% Blocking-Reagenz) versetzt und 12 h bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend werden die Proben viermal 10 min und dreimal 1 h in 1 x TBST-Puffer (1 x TBS mit 0,1 % Tween20) sowie dreimal 10min in NTMT-Puffer (100 mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween20) vom Antikörper gewaschen.

B. 4.3.3 Antikörper-Nachweis und Gegenfärbung

Über das Fab-Fragment erkennt der Anti-DIG-Antikörper die eingebauten DIG dUTP's und bindet spezifisch an der komplementär hybridisierten RNA-Sonde. Der Komplex wird durch alkalische Phosphatase, die am Antikörper gekoppelt ist, detektiert. Das Enzym katalysiert die Farbreaktion des Substrates BM-Purple, mittels dessen Präzipitation die Hybridisierungssignale visualisiert werden. Die Gegenfärbung mit Kernechtrot dient bei der Auswertung zur besseren Erkennung der Zellstrukturen.

Procedere: Nach Abwaschen der Antikörper-Lösung werden die Schnitte mit 1000 µl BM-Purple versetzt und in einer feuchten Kammer (4°C) inkubiert. Die Farbreaktion dauert je nach Signalstärke bis zu vier Tage unter täglichem Farbsubstrat-Wechsel und visueller Kontrolle unter dem Binokular. Bei gut sichtbarem Signal wird die Färbung abgebrochen, indem die Schnitte in NTMT-Puffer überführt werden. Zur Gegenfärbung werden die Präparate 2 x 15 min in NTMT-Puffer, 1 x PBS (5 min), und H₂O autoklaviert (5 min) gewaschen, mit 0,1% Kernechtrot gefärbt und abschließend mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

B. 5 Laser gestützte Mikrodissektion

Die Mikrodissektion dient der Selektion distinkter Zellen und Gewebeareale. Sie wird eingesetzt, wenn sich die zu untersuchenden Zellen innerhalb sehr heterogenen Gewebes befinden, in der Studie aber ein möglichst homogenes Ausgangsmaterial vorausgesetzt wird [97]. Bei der lasergestützten Mikrodissektion wird das Zielgewebe durch ein computergesteuertes Mikroskop visualisiert, Software markiert und anschließend durch Laser vom übrigen Gewebe getrennt [98]. In dieser Studie wird das UV-Laser Mikrodissektions-System SL Mikrotest (SL Mikrotest, Jena) verwendet. Das Ziel ist, gezielt Areale mit Tumor und tumorassoziierten Stroma vom Ovar zu gewinnen, um daraus RNA zu isolieren. Kryokonserviertes Gewebe wird eingesetzt, um eine gute Ausgangsqualität der RNA zu gewährleisten. Das sterile Vorgehen während des Verfahrens stellt sicher, dass die Aufarbeitung des Gewebes die Qualität der RNA nicht beeinflusst [99]. Zur histologischen Bewertung der Gewebe werden die fixierten Kryoschnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

B. 5.1 Herkunft des Gewebes

Kryokonserviertes Gewebe von intraoperativ asservierten Ovarialtumoren wurde in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow - Klinikum isoliert. Proben von 23 Patientinnen werden untersucht, davon 16 mit primären Ovarialkarzinomen und 9 mit rezidierten Ovarialkarzinomen.

B. 5.2 Vorbereitung der Kryoschnitte

Auf Superfrost-Objektträger werden ca. 3 cm² große Folienabschnitte (Foliendicke: 2 µm; SL Microtest, Jena) aufgezogen und mit Fixogum befestigt. Die Objektträger werden zur Sterilisation eine Stunde unter UV-Licht exponiert.

Das kryokonservierte Gewebe wird nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff umgehend ins Kryotom (Microm HM560, Microm Laborgeräte, Walldorf) überführt. Von jedem Präparat werden jeweils 5 - 15 Gewebeschnitte von 7 µm Dicke hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. Alle für die Fixierung und Färbung verwendeten Lösungen werden mit 0,1% DEPC-behandeltem Millipore-H₂O angesetzt. Nach kurzem Lufttrocknen erfolgt die Fixierung 30sec in 70% Ethanol. Die Schnitte werden kurz in H₂O_{DEPC} gespült, 1min 30sec in Hämalaun nach Mayer gefärbt, kurz in H₂O_{DEPC} gespült, jeweils 1min in 70% und 95% Ethanol entwässert, 30sec in Eosin Y (0,1% alkoholisch) gefärbt und zweimal 2min in 95% Ethanol und 1min in absolutem Ethanol entwässert. Anschließend werden die Schnitte mit der Folie abgelöst und mit der Schnittseite nach unten auf einen frisch gebackenen, mit Xylol versehenen Objektträger überführt. Nach Verdunsten wird die Folie glattgestrichen und mit Klarlack an den Objektträger fixiert. Nach einstündiger Trocknung sind die Schnitte bereit für die Mikrodissektion.

B. 5.3 Durchführung der lasergestützten Mikrodissektion

Die lasergestützte Mikrodissektion erfolgt mit dem UV-Laser Mikrodissektions-System SL Mikrotest (Jena, Deutschland). Der Objektträger mit dem Kryoschnitt wird auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert und das Gewebe histologisch begutachtet. Anschließend wird auf die ausgewählten Gewebeareale ein steriles Kunststoff-Cap (CapSure, Arcturus Engeneering, CA, USA) aufgesetzt. Der Cap dient zur Ablösung und Überführung des mikrodissezierten Areals. Die zu mikrodissezierenden Tumor- und

Stroma-Zellareale werden, visualisiert durch das Softwareprogramm, am Bildschirm vorgezeichnet, um als Vorlage für den Laser zu dienen. Der computergesteuerte, motorisierte Mikroskopisch ermöglicht das Abfahren der eingezeichneten Areale durch den UV-Laser (Abb.4). Die Lasereinstellungen (Leistung, Geschwindigkeit) wechseln in Abhängigkeit zum Schneideerfolg. Anschließend wird das ausgeschnittene Gewebe mittels des Caps abgehoben und in ein 0,5ml-Eppendorfgefäß überführt. Für die RNA-Isolierung werden die Proben in Lysispuffer (Guanodinium-Isothiocyanat-Lösung) mit 1% β -Mercaptoethanol aufgenommen. Pro Patientin werden sämtliche ausgeschnittene Areale eines Zelltyps (ca. 30 mm²) bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

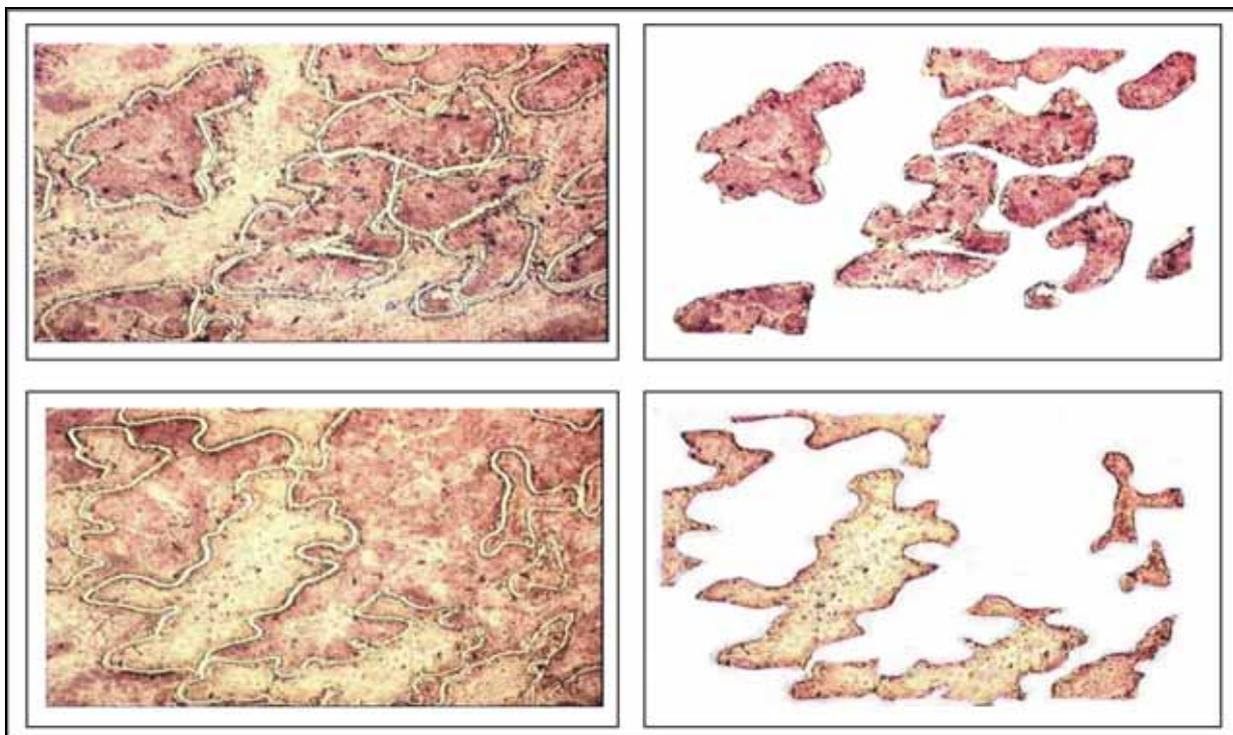


Abb. 4: UV-Laser Mikrodisektion: Vorgehensweise bei der Isolierung von reinen Zellpopulationen für die Expressionsanalyse. Die linken Bilder zeigen die mit dem Laser umfahrenen Gewebebereiche des Ovars (oben: Tumor, unten: Stroma). In den rechten Bildern ist der Gewebeschnitt nach Abnahme des Caps mit den ausgeschnittenen Zellarealen dargestellt.

B. 6 RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative TaqMan RT-PCR

B. 6.1 Kommerzielle mRNA-Kontrollprobe

Für die RT-PCR-Analysen wird neben der isolierten mRNA aus den mikrodisezierten Gewebeproben eine kommerzielle mRNA-Probe aus Ovar-Normalgewebe als Kontrollprobe bezogen (Invitrogen, Groningen).

B. 6.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus mikrodisssezierten Geweben

Aus dem mikrodisssezierten Gewebe wird Gesamt-mRNA nach dem geläufigen Protokoll mittels Guanidinium-Isothiocyanat (GTC) und saurem Phenol isoliert [100]. Das Verfahren ermöglicht eine Minimierung der mRNA-Verluste bei geringer mikrodisssezierten Gewebemenge. Dabei werden durch GTC als chaotrope Substanz Proteine denaturiert. Natriumcitrat wirkt als Puffersubstanz, das Natriumlauroylsarkosin als Detergenz. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol dient der Inhibition von RNasen durch Denaturierung. Das saure Phenol bindet DNA und Proteine, während die RNA in der wässrigen Phase bleibt und durch mehrfache Fällung gereinigt wird.

Procedere: Die Gewebeproben werden nach der Mikrodisssektion in 50 μ l GCS-Lösung (4M GTC, 25 mM Natriumcitrat pH 7,0, 0,5% Na-Lauroylsarkosin) mit 1% β -Mercaptoethanol aufgenommen. Zu dieser Lösung wird 5 μ l 2M Natriumacetat (pH 4,0), sowie 50 μ l einer Mischung aus saurem Phenol und Chloroform im Verhältnis 5:1 gegeben. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 20 min, 4°C) wird die wässrige Phase abgenommen und zur Fällung 20 μ l Isopropanol zugegeben. Nach einstündiger Fällung (-20°C) und Zentrifugation (12.000 x g, 20 min, 4°C) wird der Überstand abgenommen und verworfen. Das RNA-Pellet wird nochmals in 20 μ l GCS gelöst und mit 1Vol Isopropanol wie oben gefällt. Anschließend wird das RNA-Pellet in 20 μ l H₂O_{DEPC} aufgenommen, mit 2 μ l 3M NaAc (pH 5,2) und 40 μ l 100% Ethanol erneut 1h bei -20°C gefällt und abzentrifugiert (12.000 x g, 30 min, 4°C). Der Überstand wird abgenommen, das Pellet zweimal mit 20 μ l 80%igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (12.000 x g, 5 min, 4°C) und schließlich in 20 μ l H₂O_{DEPC} aufgenommen.

B. 6.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Qualitätskontrolle der DNA und RNA Konzentrationen erfolgt nach RiboGreenTM bzw. PicoGreenTM Verfahren (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Gegenüber der spektrometrischen Messung von RNA können bei dieser sensitiven Methode durch die spezifische Bindung der fluoreszierenden PicoGreen-Partikel sehr geringe RNA-Konzentrationen bis zu 1 ng/ μ l gemessen werden. Die RiboGreen-Stammlösung wird zur Messung von DNA-Endkonzentrationen im Bereich von 1-50 ng/ml (bzw. 20-1000 ng/ml) 1:2000 (bzw. 1:200) mit TE-Puffer verdünnt. Die PicoGreen-Stammlösung wird immer 1:200 verdünnt. Von der Standard-Nukleinsäure-Lösung bekannter

Konzentration wird eine Eichreihe mit fünf verschiedenen Konzentrationen im angegebenen Messbereich erstellt. Für die Messung sind sowohl die Standard-Lösung, als auch die Versuchsproben in 100 µl TE-Puffer verdünnt und in einer optischen Platte mit 100 µl der verdünnten RiboGreen- oder PicoGreen-Lösung gemischt. Die Extinktion erfolgt im Fluoreszenzscanner. Nach linearer Regression der Eichgeraden werden die Konzentrationen der Versuchsproben ermittelt.

B. 6.4 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die RNA mittels Oligo-(dT)- oder Hexamer Primer und Reverse Transkriptase (RT) in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA ist stabiler und kann als Matrize für PCR-basierte Experimente genutzt werden. Dabei verwenden wir für geringe RNA-Konzentrationen (<50ng; mikrodisezierte Proben) der Sensiscript™-RT-Kit (Qiagen). Sämtliche Bestandteile, bis auf den Oligo-(dT)-Primer (Clontech, Palo Alto, CA, USA), werden den Qiagen-Kits entnommen.

Für die cDNA-Synthese wird die RNA mit 1x Reverse Transkriptase-Puffer, dNTP-Mix (0,5 mM je dNTP), 1 µM Oligo-(dT)-Primer, 10 Units RNase Inhibitor und 1µl Reverse Transkriptase angesetzt (für 20 µl Ansatz). Dabei wird die Gesamt-RNA der mikrodisezierten Proben vollständig eingesetzt. Der Reaktionsansatz inkubiert 1h bei 37°C und wird anschließend zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase 5min auf 95°C erhitzt. Die Aufbewahrung der cDNA-Proben erfolgt bei –80°C.

B. 6.5 Quantitative Real-time Reverse Transkriptase-PCR (TaqMan-PCR)

Die TaqMan PCR ist ein automatisierter PCR-Assay, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan erfolgen. Bei diesem "Real-Time"-Verfahren wird bei den zu quantifizierenden Proben das entstehende Amplifikat nach jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal-übermittelndes System detektiert [101]. Die Ausgangsproben können anschließend über den logarithmisch dargestellten Verlauf der PCR innerhalb der exponentiellen Phase miteinander verglichen und die Expressionslevel der untersuchten Gene bestimmt werden.

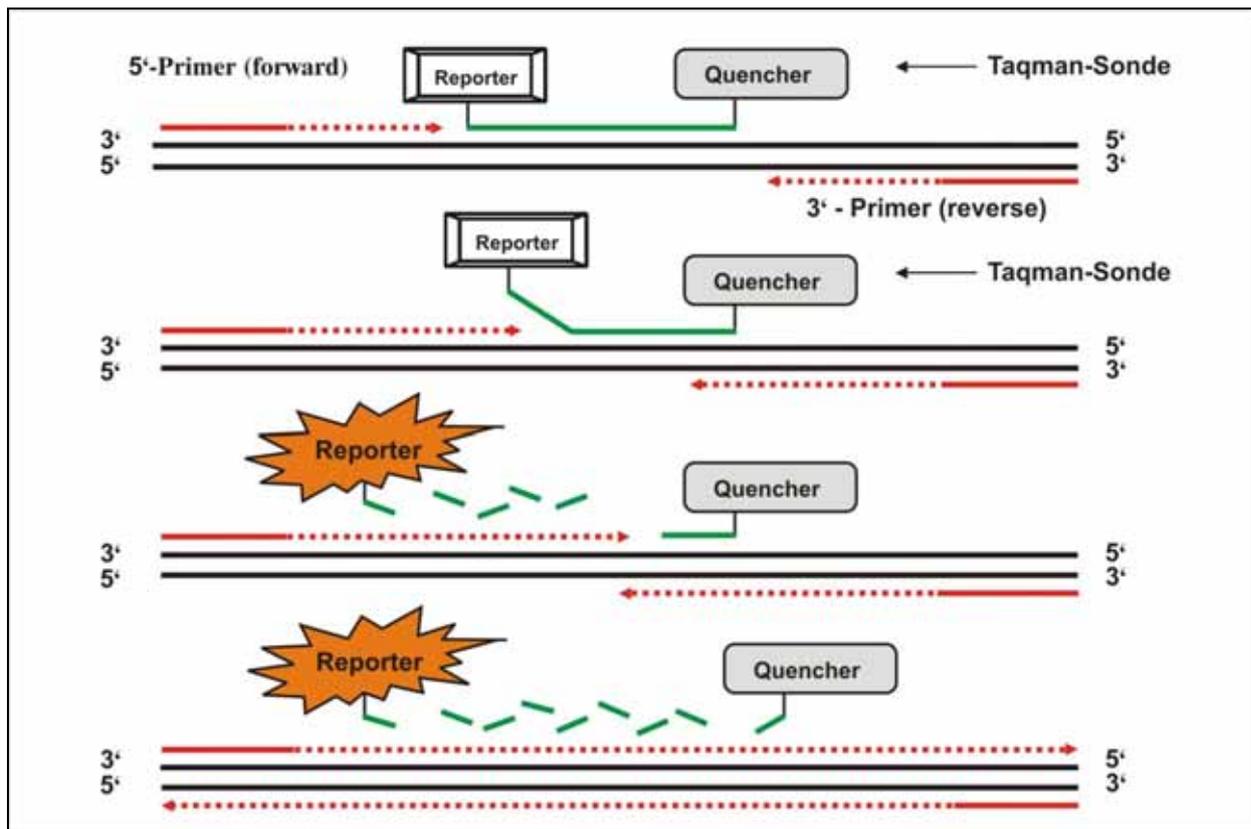


Abb. 5: Das Prinzip der Taqman-PCR basiert auf die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase. Eine fluoreszenzmarkierte Sonden trägt Reporter- und Quencher-Farbstoff. Die Strangsynthese verdrängt die Sonde, spaltet dabei Reporter vom Quencher und führt zur Fluoreszenzemission.

Zur Detektion durch die fluoreszenzmarkierte, genspezifische Sonde wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase genutzt [102]. Im ersten Schritt der PCR hybridisieren die spezifischen Primer und die fluoreszenz-markierte Sonde an den Matrizen-Strang (Abb.5). Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert, deren Fluoreszenz von einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) am 3'-Ende aufgrund der räumlichen Nähe unterdrückt wird. Bei der Extension verdrängt die Taq Polymerase die Sonde, die durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität hydrolysiert wird. Der Reporter-Farbstoff wird abgetrennt und erzeugt ein Fluoreszenzsignal. Die TaqMan-PCR mit fluoreszenzmarkierter Sonde erfolgt im GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Das Fluoreszenzsignal wird während der PCR-Zyklen von einer CCD-Kamera empfangen und über entsprechendes Software-Programm (GeneAmp 5700 SDS Software, PE, Weiterstadt) prozessiert. Die benötigten PCR-Reagenzien (2 x Taqman Universal PCR Master Mix mit AmpliTaq Gold, dNTP mit dUTP, AmpErase UNG, 25 mM MgCl₂) sind vom gleichen Hersteller. Uracil-N-Glycosylase (UNG) bewirkt durch das eingebaute dUTP den Abbau der Amplikons und

wird als Schutz vor Kontamination mit Fremdprodukten eingesetzt. Die Amplifikation erfolgt durch eine 2-Schritt PCR mit 40 Zyklen (95°C, 15 sec; 60°C, 1 min) und zwei initiale Temperaturschritte (50°C, 2 min; 95°C, 10 min). Bei dieser quantitativen Methode werden von jeder Gewebeprobe drei identische PCR-Ansätze (Dreifachbestimmung) durchgeführt und als Ergebnis der Mittelwert mit der Standardabweichung berechnet.

B. 7 Immunhistochemie

Der TOP2A-Proteinnachweis erfolgte *in-situ* auf Gewebeschnitte mittels monoklonalen Antikörper. Diese einfache und schnelle Technik besitzt hohe qualitative und quantitative Aussagekraft. In dieser Studie wurde die indirekte Streptavidin-Biotin-Komplex Methode (SAB) verwendet. Grundprinzip hier ist die Bindung des Primärantikörpers (*mouse antihuman*) an dem Ziel-Antigen (Abb. 6). Die Detektion erfolgt über Biotin-markierten Sekundärantikörper (*multi link antimouse*), der nach Beimischung von Streptavidin-Enzymkonjugat in einer Komplexbildung hineingezogen wird. Der Antikörper-SAB-Peroxidase-Komplex kann nun über Reduktion eines Chromogens visualisiert werden. Die hohe Affinität von Avidin zu Biotin und durch die Verwendung der horseradish Peroxidase [103] wird die hohe Sensitivität der Technik gewährleistet.

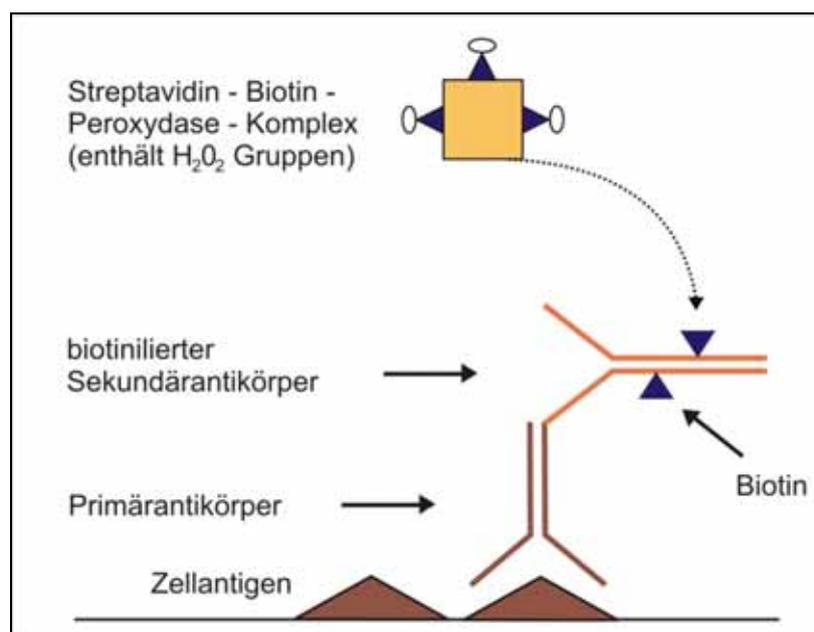


Abb. 6: Prinzip der Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode

B. 7.1 Gewebeproben

Für die Untersuchungen werden Gewebeproben von 7 Ovar-Normalgeweben, 4 Zystadenomen, 34 primären und 28 rezidivierten Ovarialkarzinomen verwendet. Für die immunhistochemische Reihe werden vom Doktoranden selbst aus den formalinasservierten Präparaten Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden mit einem Schlittenmikrotom (Model Jung-HN 40, Jung, Deutschland) angeschnitten (5µm Dicke).

B. 7.2 Immunhistologische Charakterisierung des Gewebesets

Die histopathologische Einteilung und Diagnosebestätigung der Gewebeproben wird an HE-Schnitten (Mikroskop Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) von der betreuenden Pathologin durchgeführt. Diese schließt eine detaillierte immunhistochemische Charakterisierung des Untersuchungskollektivs ein. Für die Beurteilung der mitotischen Aktivität wird das Gewebeset mit dem Ki-67 Antikörper inkubiert. Die zytologisch-morphologische Zuordnung innerhalb der sehr heterogenen Gewebeproben erfolgte nach immunhistochemischer Aufarbeitung mit Cytokeratin-7 (CK7) als epithelialer Marker[60]. Über den CK7-Nachweis können die Epithelzellen im Normalovargewebe von den Tumorzellen und der assoziierten Stromaareale der Ovarialkarzinome voneinander spezifisch abgegrenzt werden [104]. Die TOP2A-Immunhistochemie erfolgt nach einer einheitlichen, standardisierten Methodik mit dem Ziel die differentielle TOP2A-Enzymexpression in den Zellen des Tumor- und des tumor-assoziierten Stromas zu evaluieren.

B. 7.3 Verwendete Antikörper und Reagenzien

Für die Untersuchungen werden monoklonale Antikörper mit hoher Spezifität ausgewählt. Die Antikörper sind sowohl an Kryo- wie auch an formalinfixiertem Paraffinmaterial anwendbar. Zur Ermittlung der optimalen Arbeitskonzentration werden zu Beginn der Studie Tests mit verschiedenen Ausgangsverdünnungen der eingesetzten Antikörper durchgeführt. Im weiteren Vorgehen werden immer die optimal ermittelten Verdünnungen für TOP2A (1:80), CK7 (1:30) und Ki-67 (1:30) verwendet. Als Negativkontrolle dient in jedem Inkubationsvorgang eine PBS-Leerkontrolle ohne

Zusatz vom Primärantikörper. Eine Auswahl der verwendeten Antikörper und Reagenzien bietet Tabelle 8.

Tab. 8:
Auswahl der Reagenzien für die Immunhistochemie

Reagenzien	Klon	Charakteristiken	Code	Hersteller	Verdünnung
TOP2A	Ki-S1	Mab mouse IgG2a kappa	M 7186	Dako	1:80
CK-7	OV-TL 12/30	Mab mouse IgG1 kappa	N1626	Dako	1:30
Ki-67	7B11	Mab mouse IgG1	18-0192	Zymed	1:30
CAS Block™	-	Universal blocking agent	00-8120	Zymed	1:100/1:200
Universal Link	-	Secondary mouse/rabbit antibody biotinylated IgG(H+L)	HP504UR	Biocare	lt. Protokoll
Streptavidin-HRP	-	Conjugated Streptavidin-Peroxidase	HP504UR	Biocare	lt. Protokoll
AEC (red) Substrate Kit	-	H ₂ O ₂ substrate, AEC chromogen, substrate buffer	00-2007	Zymed	1:150

B. 7.4 Inkubation nach der indirekten Streptavidin Biotin Methode

Vor der Antikörperinkubation werden die Paraffinschnitte mittels Xylol entparaffiniert und über absteigende Alkoholreihe rehydriert. Während der Rehydrierungsphase erfolgt eine Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität. Die eigentliche Inkubation des Primärantikörpers (*mouse antihuman*) wird in einer feuchten Kammer entsprechend den jeweils in der Testphase ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die anschließende Bindung an den Sekundärantikörper (*multi link antimouse*) und darauffolgende Komplexbildung mit dem Streptavidin HRP Reagenz dienen der Detektion der immunhistochemischen Reaktion. Nach der Visualisierung durch Chromogenzugabe und der Gegenfärbung werden die Schnitte eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte nach dem Immunreaktiven Score (siehe B.8).

Vorbereitung der Paraffinschnitte: Die Gewebeschnitte werden dreimal in Xylol für 15 min entparaffiniert. Die Rehydrierung über absteigende Alkoholreihe beginnt mit 2 x abs. Ethanol für 4 min. Die endogene Peroxidase wird durch Zugabe von H₂O₂ (3% in 96% Ethanol 15 min.) blockiert. Danach wird schrittweise die Rehydrierung fortgeführt (2min. in 80%, 70% und 50% Ethanol) und endet mit Überführung in H₂O_{DEST}. Die

Vorbehandlung der Paraffinproben beinhaltet die Antigendemaskierung. Diese erfolgt durch Aufkochen in Citrat-Puffer pH 6,0 zur Auflösung von Proteinbindungen und Freilegung der Antigenstrukturen. Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren, inkubieren die Schnitte in CAS-Block bis zur Antikörperzugabe.

Antikörperinkubation: Die Inkubation der Schnitte mit dem primären monoklonalen Antikörper erfolgt in einer feuchten Kammer für 60 min. Nach einer kombinierten Spülung mit 0,05% Tween in PBS gefolgt von PBS werden die Schnitte mit dem multi link Sekundärantikörper für 20 min inkubiert. Es folgt wieder eine kombinierte Spülung der Proben. Nach 10 min im Streptavidin Peroxidase Reagenz und erneuter Spülung wird die Entwicklung mit dem Chromogen AEC-Red für ca. 5 min unter mikroskopischer Kontrolle angeschlossen. Die Präparate werden in H₂O_{DEST} überführt, danach mit „Mayer's Hämalaun“ 1,5 min gefärbt und 10 min in Leitungswasser zur Blau-Differenzierung gespült. Abschließend werden die Schnitte mit AquaDect-Medium (Roche) eingedeckt.

B. 8 Semiquantitative Auswertung über den Immunreaktiven Score IRS

Alle histologischen Gewebeproben werden gemeinsam durch den Doktoranden und die betreuende Pathologin evaluiert. Für die Auswertung der *in-situ* Hybridisierung und der immunhistochemischen Reihe wird der semiquantitative Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele eingesetzt [105]. Dieser berücksichtigt zwei Faktoren. Erstens wird die Anzahl der positiv gefärbten Zellen pro Gewebeschnitt ermittelt und als prozentualer Anteil angegeben. Dazu sind systematische nichtautomatisierte Auszählungen von 1500 Zellen pro Präparat durch den Doktoranden vorgenommen worden. Für diesen Zweck werden mindestens fünf, höchstens zehn HPF (high-power fields, Gesichtsfeld unter 40facher mikroskopischer Vergrößerung) ausgewählt und ausgewertet. Zweitens wird die Färbintensität der Hybridisierungsreaktion mikroskopisch evaluiert. Aus beiden Faktoren errechnet sich der Score. Der prozentuale Zellanteil und die Farbintensität bekommen für definierte Ausprägungsstärken einen Punktwert zugeordnet, aus denen sich der IRS Score durch Multiplikation errechnen lässt (Tab. 9). Die Auswertung nach der IRS-Score erfolgt getrennt jeweils für den Tumor- und für die Stromazellen pro Gewebeprobe.

Tab. 9:

Ermittlung des Immunreaktiven Scores (IRS)

Für die Faktoren Prozentsatz positiver Zellen (percent positive) und die Färbeintensität (staining intensity) wurden Punktwerte vergeben. Aus dessen Produkt werden Scorewerte zwischen 0-12 (Maximalwert 12) vergeben. Der Schwellenwert für die Abgrenzung positiver und negativer Reaktion lag bei 2 Punkten.

Immunreaktiver Score (IRS)	
Prozentsatz positiver Zellen (PP)	Färbeintensität (SI)
0 - negativ 1 - <10% positive Zellen 2 - 10-50% positive Zellen 3 - 51-80% positive Zellen 4 - > 80% positive Zellen	0 - negativ 1 - schwach 2 - mittel 3 - stark

B. 9 Statistik

Für die biostatistische Datenerfassung und Auswertung sind alle krankheitsrelevanten Daten der Patientinnen in einer Datenbank aufgenommen worden. Hierfür sind die klinischen und experimentellen Informationen, transformiert als dichotome, kategoriale oder metrische Merkmale, in einer Serie von Datenfeldern (Variablen) festgehalten. Die Art der Studie macht in erster Linie die Anwendung von deskriptiven Methoden erforderlich. Alle statistischen Prozeduren werden mit SPSS (Version 15.0 für Windows) durchgeführt. Als statistisch signifikant werden Ergebnisse angesehen, bei denen die Irrtumswahrscheinlichkeit p bei Verwerfen der Nullhypothese kleiner als 5% ($p < 0,05$) ist (errechnete p -Werte werden im Text in Klammern angegeben).

Die Darstellung von Häufigkeiten, Median- und Mittelwerten bei normalverteilten Größen erfolgt über univariate Methoden und dient der Beschreibung der klinisch-experimentellen Daten. In der explorativen Datenanalyse wird eine Überprüfung der Normalverteilung sowohl graphisch, über Histogramm und Box-Plot-Darstellung, als auch rechnerisch über den Kolmogorov-Smirnov-Test vorgenommen. Korrelative Beziehungen zwischen den Testvariablen werden bei kategorialen Daten durch Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) und bei nicht gruppierten Variablen über den Mann-Whitney-U-Test, ggf. den Kruskal-Wallis-H-Test auf einer linearen Assoziation geprüft.

Zur Überprüfung der Signifikanz von Unterschieden bei unabhängigen Stichproben, die keine Normalverteilung aufweisen, werden nichtparametrische Testverfahren verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test vergleicht zwei unabhängige Stichproben hinsichtlich der Verteilung einer abhängigen Variablen. Der Kruskal-Wallis-H-Test stellt

eine methodische Erweiterung auf mehr als zwei unabhängige Stichproben dar. Beide Tests berücksichtigen die Rangunterschiede der untersuchten Stichproben und weisen dadurch eine größere Teststärke als der Median-Test [106].

Zur Überprüfung der prediktiven Bedeutung von krankheitsrelevanten Parametern und experimentellen Daten zum Expressionsverhalten werden Analysen der Überlebenszeiten durchgeführt. Als Nachbeobachtungszeit (Follow-up) wird der Zeitraum zwischen dem Einschluss in die Studie (Datum der Operation) und dem Endpunkt der Beobachtung festgelegt. Zum finalen Erfassungszeitpunkt bestehen bezüglich des Verbleibs der Patientinnen grundsätzlich folgende Möglichkeiten:

- 1) Die Patientin ist verstorben.
- 2) Die Patientin lebt.
- 3) Der Verbleib der Patientin kann nicht geklärt werden.

Für die Fälle ohne bekannten Endpunkt wird ein Ersatzendpunkt definiert, nämlich bei den noch Lebenden der Zeitpunkt des Studienendes und bei den abgewanderten Patientinnen das Datum des letzten Kontaktes. Diese so genannten „zensierten“ Überlebensdaten haben den Vorteil, dass alle Kasuistiken mit in die Berechnungen eingehen und wegen der höheren Fallzahlen (soweit die Anzahl der zensierten Daten ein gewisses Maß nicht übertrifft) die Aussagekraft steigt. So kann den unterschiedlichen Follow-up-Verläufen entsprechend Rechnung getragen werden.

Die graphische Darstellung der Überlebenszeitverteilung erfolgt in Form einer umgekehrten Summenhäufigkeitsfunktion, unter Berücksichtigung der zensierten Daten gemäß der Kaplan-Meier-Methode. Für den statistischen Vergleich der Gruppen wird der Log-Rank-Test verwendet.

Multivariate Verfahren werden in dieser Studie trotz des kleinen Untersuchungskollektivs eingesetzt, um die Faktoren auf ihre unabhängige prognostische Bedeutung in Bezug auf das Überleben zu analysieren. Hierfür wird die *Cox-Regression-Methode* angewendet.

C. Ergebnisse

C. 1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

In dieser prospektiven Studie werden Proben von 62 Patientinnen mit Ovarialkarzinom in der Primär- und Rezidivsituation analysiert (Tab. 10).

Tab. 10:

Allgemeine Charakteristika des Untersuchungskollektivs aus 62 Patientinnen mit Ovarialkarzinom

Parameter	Primäres Ovarialkarzinom	Rezidiertes Ovarialkarzinom
Anzahl Patienten	34 (54,8%)	28 (45,2%)
Alter bei Erstdiagnose (Jahre) Median (Range)	56 (30 – 86)	50,5 (26 – 68)
Histologie		
Serös	21 (61,8%)	25 (89,3%)
Endometroid	8 (23,5%)	2 (7,1%)
Muzinös	2 (5,9%)	1 (3,6%)
Gemischt	3 (8,8%)	-
FIGO*		
I	8 (23,5%)	2 (7,1%)
II	1 (2,9%)	-
III	13 (38,2%)	19 (67,9%)
IV	12 (35,3%)	7 (25%)
Differenzierungsgrad		
I	5 (14,7%)	6 (21,4%)
II	10 (29,4%)	9 (32,1%)
III	19 (55,9%)	13 (46,4%)
CA 125 präoperativ (U/ml) Median (Range)	590,5 (15,3 – 24317)	390 (24 – 29000)
Aszites		
kein	9 (26,5%)	18 (64,3%)
≤ 500ml	13 (38,2%)	5 (17,9%)
> 500ml	12 (35,3%)	5 (17,9%)
Postoperativer Tumorrest		
makroskopisch tumorfrei	23 (67,6%)	11 (39,3%)
≤2cm	6 (17,7%)	12 (42,9%)
>2cm	5 (14,7%)	5 (17,9%)

* Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

C. 1.1 Altersstruktur

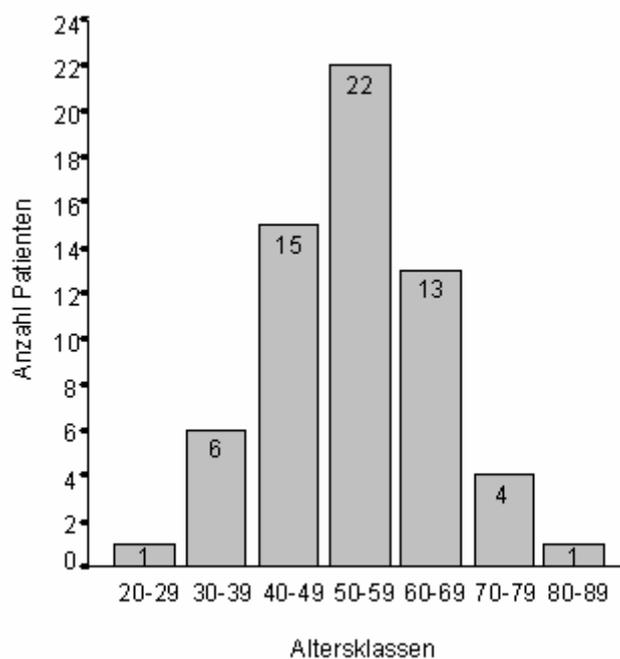
Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnose eines Ovarialkarzinoms liegt bei 55 Jahren, der Median beträgt 55 Jahre. Bei Diagnosestellung ist die jüngste Patientin 26 Jahre, die älteste 86 Jahre alt (Tab. 11).

Tab. 11:

Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose (Jahre)

	Anzahl	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Median
Alter bei Diagnose	62	26	86	54,9	55

Der Gipfel der Normalverteilungskurve liegt in der Altersklasse der Fünfzigjährigen. Diese Daten erweisen sich sowohl nach graphischer Darstellung im Histogramm als auch nach Überprüfung mit dem Kolmogorov-Smirnov Test als normalverteilt (Abb. 7).

**Abb. 7:** Altersverteilung mit Fallzahlen bei Diagnosestellung eines Ovarialkarzinoms

Innerhalb des Kollektivs zeigen sich unter Berücksichtigung der Erkrankungssituation (Primär oder Rezidiv) Unterschiede in der Altersverteilung (Abb. 8). Der Altersmedian der Frauen mit primärem Ovarialkarzinom liegt bei 56 Jahren. Bei Diagnosestellung ist die jüngste Patientin 30 Jahre alt und die älteste 86 Jahre alt. Das mediane Alter liegt bei Patientinnen mit einer rezidierten Erkrankung bei 50,5 Jahren (Range 26 bis 68 Jahre), damit um mehr als 5 Jahre unter dem Altersmedian beim Primärkarzinom ($p=0,004$).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind 22 Patientinnen (35,5%) jünger als 49 Jahre, 35 Frauen (56,5%) 50 bis 69 Jahre alt und 5 Patientinnen (8%) älter als 70 Jahre.

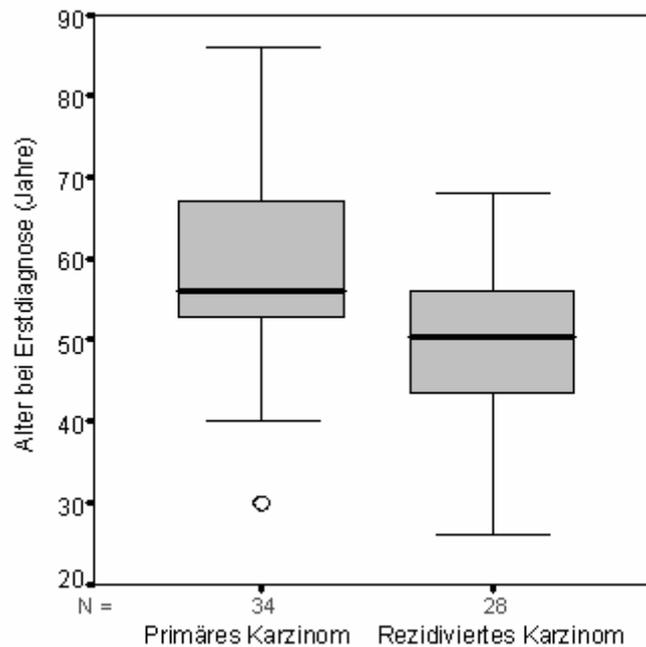


Abb. 8: Altersverteilung bei Erstdiagnose (Jahre)

C. 1.2 Histologie

Innerhalb der 62 Patientinnen sind 34 primäre (54,8%) und 28 rezidierte Ovarialkarzinome (45,2%) annähernd gleich verteilt. Nach histologischem Befund liegen 46 serös-papilläre (74,2%), 10 endometroide (16,1%), 3 muzinöse (4,8%) und 3 gemischte (4,8%) Tumore vor (Abb. 9).

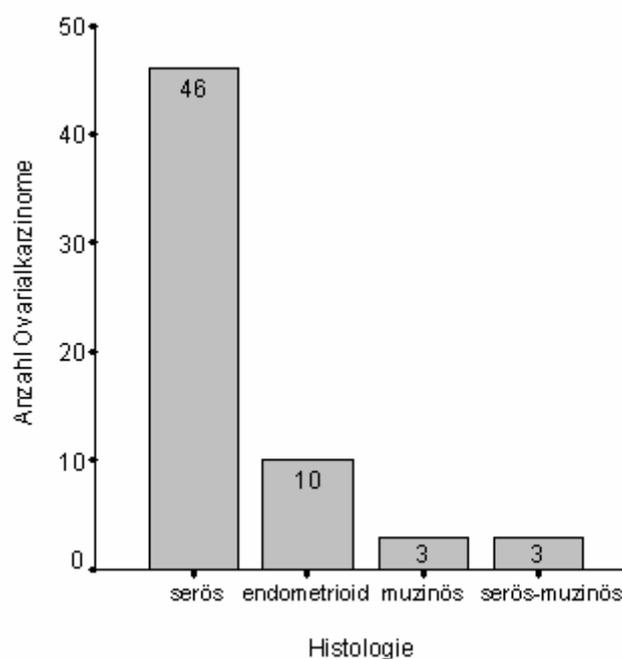


Abb. 9: Histologie der Ovarialkarzinome

C. 1.3 Tumorstadium

Das Staging in der primären Erkrankungssituation erfolgt nach der FIGO-Klassifikation der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique. Ein Ovarialkarzinom im frühen Stadium I wird bei 8 Frauen (23,5%) diagnostiziert. Bei einer Patientin liegt Stadium FIGO II (2,9%) vor. Die meisten Patientinnen weisen zum Zeitpunkt der Diagnose ein weit fortgeschrittenes Tumorstadium FIGO III (13 Frauen, 38,2%) oder FIGO IV (12 Fälle, 35,3%) auf (Abb. 10).

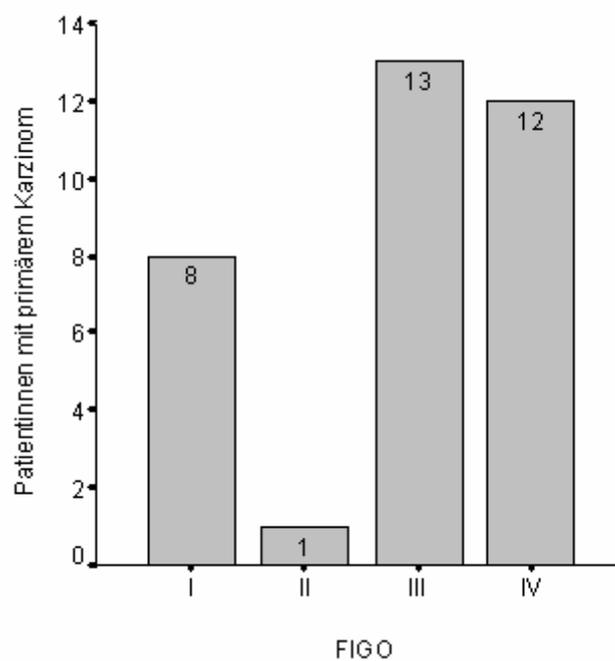


Abb. 10: Stadieneinteilung bei 34 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom nach FIGO

C. 1.4 Differenzierungsgrad

In Anlehnung an die Richtlinien der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) unterscheidet man beim Ovarialkarzinom drei Differenzierungsstufen: gut (G1), mäßig (G2), niedrig differenzierte oder entdifferenzierte Tumore (G3). Unter den 62 Ovarialkarzinomen sind 11 (17,7%) gut, 19 (30,6%) mäßig und weitere 32 (52,6%) niedrig differenziert.

C. 1.5 Postoperativer Tumorrest

Nach dem Ausmaß der erzielten Tumorresektion werden Patientinnen mit kompletter Tumorentfernung und makroskopischer Tumorfreiheit (R0), sowie Patientinnen mit weniger und mehr als 2 cm Tumorrest unterschieden. In unserem Studienkollektiv gelang eine komplette Tumorresektion in 34 Fällen (54.8%), in 18 Fällen (29%) ist der zurückgelassene Tumorrest ≤ 2 cm. In weiteren 10 Fällen (16.1%) gelang nur eine partielle Resektion mit Resttumor > 2 cm (Abb. 11).

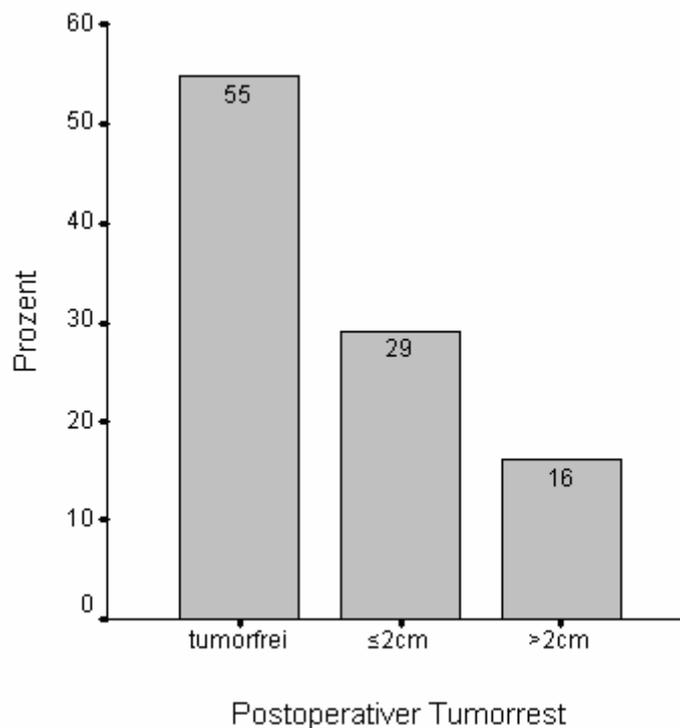


Abb. 11: Größe des postoperativen Tumorrests nach Radikaloperation (Prozent)

C. 1.6 Aszites

Die Aszitesbildung wird als relevantes Tumorsymptom in die Auswertung aufgenommen. Nach der Aszitesmenge werden 3 Gruppen wie folgt unterteilt: Patientinnen ohne Aszites, Frauen mit ≤ 500 ml und > 500 ml Aszitesvolumen. Nach diesen Kriterien wird bei 27 Patientinnen (44%) intraoperativ kein Aszites gefunden. 18 Frauen (29%) weisen ≤ 500 ml und weitere 17 Frauen (27%) > 500 ml Aszitesmenge auf (Abb. 12).

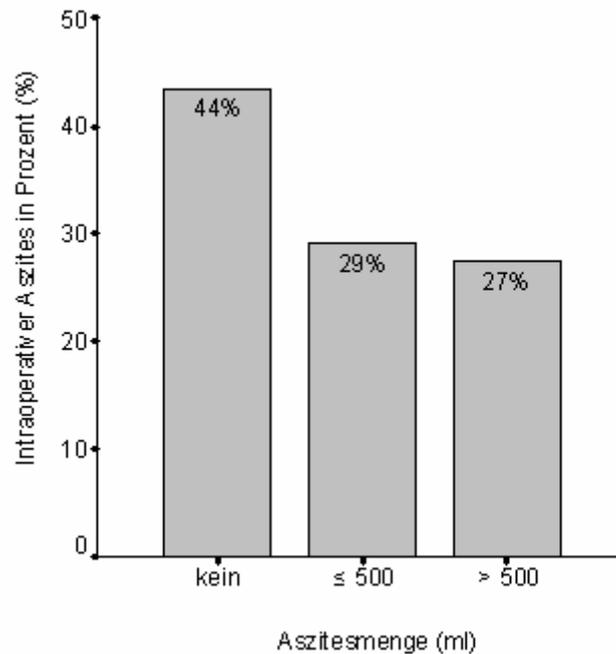


Abb. 12: Nachweis von intraoperativem Ascites

C. 1.7 Kontrollgruppe für die *in-situ* und immunhistochemischen Analysen

Für die *in-situ* Hybridisierung und die immunhistochemische Untersuchungsreihe wurden als Kontrollgruppe 4 benigne Tumore und 7 Normalgewebeproben aus Ovarien analysiert. Das Normalovargewebe stammt aus 7 in der histopathologischen Begutachtung unauffälligen Ovarproben. Die Proben sind nach Adnexektomie bei abdomineller Hysterektomie wegen Uterus myomatosus, nach laparoskopischer Ovarektomie bei persistierenden Follikelzysten oder im Rahmen von einer Radikaloperation bei Appendixkarzinom ohne histologische Ovarbeteiligung (Tab. 12) entnommen worden. Die benignen Gewebeproben stammen aus 4 Patientinnen, bei denen aufgrund von Zystadenomen eine operative Adnexektomie durchgeführt wurde. Alle Proben werden im Rahmen einer Dignitätskontrolle histopathologisch begutachtet und nach Ausschluss maligner Veränderungen als Kontrolle eingesetzt. Die gründliche pathologische Untersuchung dient der Sicherung des unauffälligen histologischen Befundes, um das Risiko einer möglichen Ergebnisfehlinterpretation durch Gewebekontamination zu reduzieren. Diese Auswahlkriterien stellen nur eine von vielen Möglichkeiten für die Zusammenstellung einer Kontrollgruppe aus Normalovar dar [59, 102].

Tab. 12

Zusammensetzung der Kontrollgruppe für die *in-situ* und immunhistochemische Untersuchungsreihe.

Nr.	Gewebeart	Diagnose und histopathologische Charakteristika
Unauffälliges Eierstockgewebe		
1	Ovar-Normalgewebe	Normalgewebe vom Ovar mit Corpus luteum Zyste
2	Ovar-Normalgewebe	Normalgewebe vom Ovar bei histologisch gesichertem Appendixkarzinom
3	Ovar-Normalgewebe	Normalgewebe vom Ovar bei serösem Zystadenom des anderen Ovars
4	Ovar-Normalgewebe	Normalgewebe vom Ovar mit funktionellen Zysten
5	Ovar-Normalgewebe	Normalgewebe vom Ovar mit Follikelzyste
6	Ovar-Normalgewebe	Normalgewebe vom Ovar nach Adnektomie wg. Uterus myomatosus
7	Ovar-Normalgewebe	Normalgewebe vom Ovar nach Adnektomie wg. Uterus myomatosus
Gutartiges Ovargewebe		
1	benigner Ovar tumor	muzinöses Zystadenofibrom
2	benigner Ovar tumor	seröses Zystadenom
3	benigner Ovar tumor	Zystadenom
4	benigner Ovar tumor	seröses Zystadenom

C. 2 Nichtradioaktive *in-situ* Hybridisierung bestätigt eine differentielle Expression der *TOP2A*-mRNA in Tumor und Stromazellen

Über die Identifizierung und Lokalisation der *TOP2A*-mRNA in der *in-situ* Hybridisierung wird qualitativ die Transkriptionsaktivität des *TOP2A*-Gens im Gewebe erfasst. Diese Methode erlaubt eine präzise Analyse der Zellexpression im Tumor und tumorassoziierten Stroma auf Paraffinschnitten unter Anwendung von spezifischen mRNA-Sonden.

Die Sonden werden nach Linearisierung der Klone AA047124 und A1624669 und *in-vitro* Transkription hergestellt. Die DIG-markierten Antisense- und Sense-RNA-Sonden sind 0,7 kb (Klone AA047124) und 2,3 kb (A1624669) lang. Nach Bindung der RNA-Sonde an die zelluläre mRNA wird das Signal über die Präzipitation des BM-Purple Farbstoffs visualisiert. Bei positiver Genexpression nach Hybridisierung mit der *TOP2A* Antisense-Sonde entsteht in drei bis vier Tagen Färbung ein blauer Farbniederschlag. Gewebeschnitte, die als Kontrolle mit der Sense-RNA-Sonde hybridisiert werden, sind stets negativ. Die Gegenfärbung erfolgt mit Kernechtrot. Zur besseren histologischen Auswertung sind auch die entsprechenden Hämatoxylin-Eosin gefärbten (HE) Schnitte dargestellt (Abb. 14-16).

Mittels RNA *in-situ* Hybridisierung werden insgesamt 17 Gewebepräparate von 13 Ovarialkarzinomen, zwei Zystadenomen und zwei Proben aus Ovar-Normalgewebe untersucht. Die Auswertung erfolgt über den semiquantitativen Immunreaktiven Score (IRS). Das Normalovar zeigt keine *TOP2A*-Genamplifikation in den

Oberflächenepithelien und im benachbarten Stroma (Abb. 13). Die zwei Zystadenome weisen ein heterogenes Färbemuster mit schwacher bis mittlerer *TOP2A*-Expression in den Oberflächenepithelien auf. Das Stroma ist negativ. Die Ovarialkarzinome zeigen eine signifikant höhere *TOP2A*-Amplifikation in den Tumorzellen im Vergleich zu den Epithelzellen der benignen und Normalovar-Proben ($p=0.049$). In den Zellen des tumorassoziierten Stromas wird eindeutig die *TOP2A* Expression nachgewiesen. Gegenüber den Stromafibroblasten der Kontrollgruppe ist das tumorassoziierte Stroma durch eine signifikant erhöhte *TOP2A*-Genamplifikation gekennzeichnet ($p=0.032$). Insgesamt zeigt das Tumorkompartiment eine stärkere (größeren Prozentsatz positiver Zellen) und intensivere (höhere Färbeintensität) *TOP2A*-mRNA-Überexpression als das tumorassoziierte Stroma ($p=0.0001$).

Bei der Subgruppenanalyse zeigen primäre Karzinome und Platin-vorbehandelte Rezidivtumore keine Unterschiede in der *TOP2A* Tumorzellexpression ($p=0.234$) oder Stromaexpression ($p=0.945$). Als Nebenbefund wird eine heterogene Amplifikation des *TOP2A*-Gens in den Endothelzellen beschrieben.

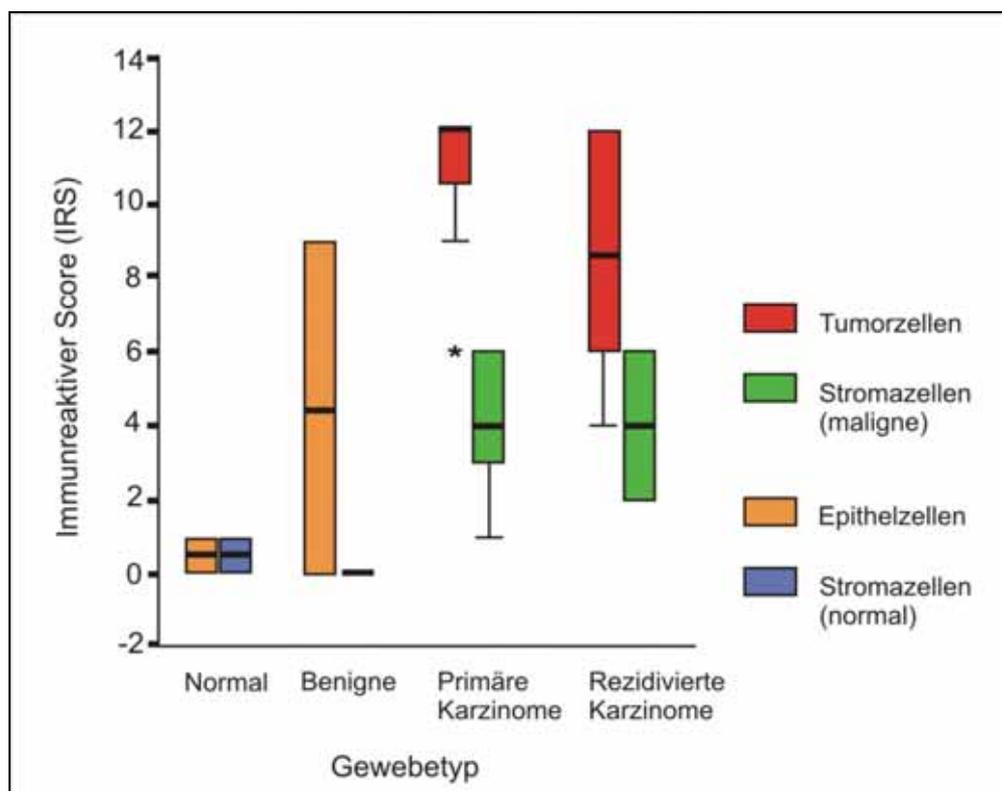


Abb. 13: Expressionsverhalten des *TOP2A*-mRNA Transkripts in 17 Gewebeproben nach Dignität. Die Ovarialkarzinome zeigen eine positive Expression sowohl im Tumor als auch im Stroma. Das Normalovar weist eine negative Expression auf. Die zwei Zystadenome zeigen ein heterogenes Expressionsprofil.

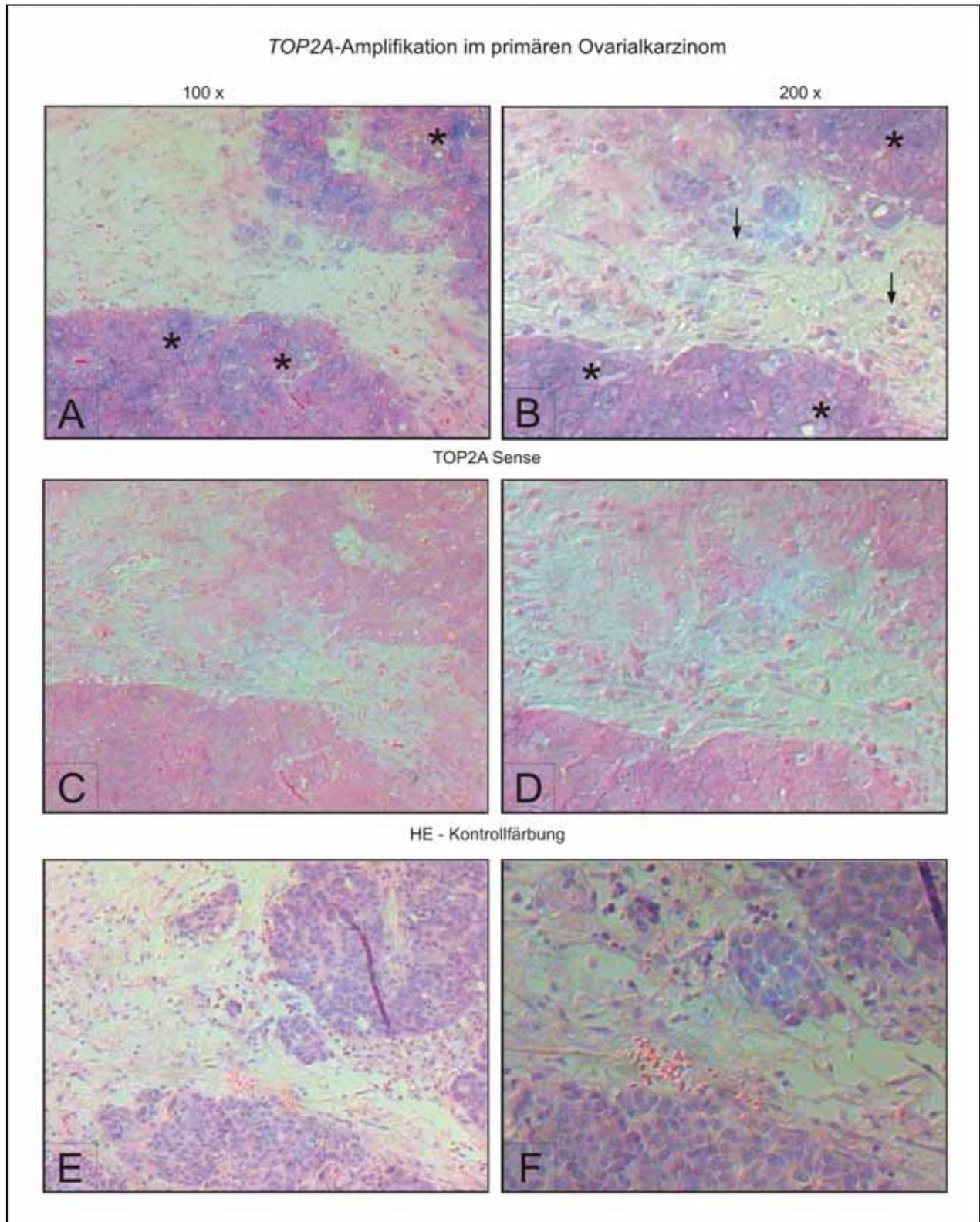


Abb. 14: Nachweis der *TOP2A*-Genamplifikation bei Patientin mit primärem Ovarialkarzinom (FIGO IIIc, 65 Jahre). Bilder A und B zeigen die positive Expression nach der Antisense-Sonden-Hybridisierung visualisiert durch einen blauen Niederschlag. Starke *TOP2A*-Amplifikation wird in Tumorzellen (A, B, Asterisk) und in tumorassoziierte Stromazellen (B, Pfeile) nachgewiesen. Bilder C und D sind Negativkontrolle in Folgeschnitten des Präparats, nach Hybridisierung mit der Sense-Sonde (kein Farbniederschlag). Bilder E und F stellen die histologische Kontrolle nach HE-Färbung dar. Links 100fache, rechts 200fache mikroskopische Vergrößerung.

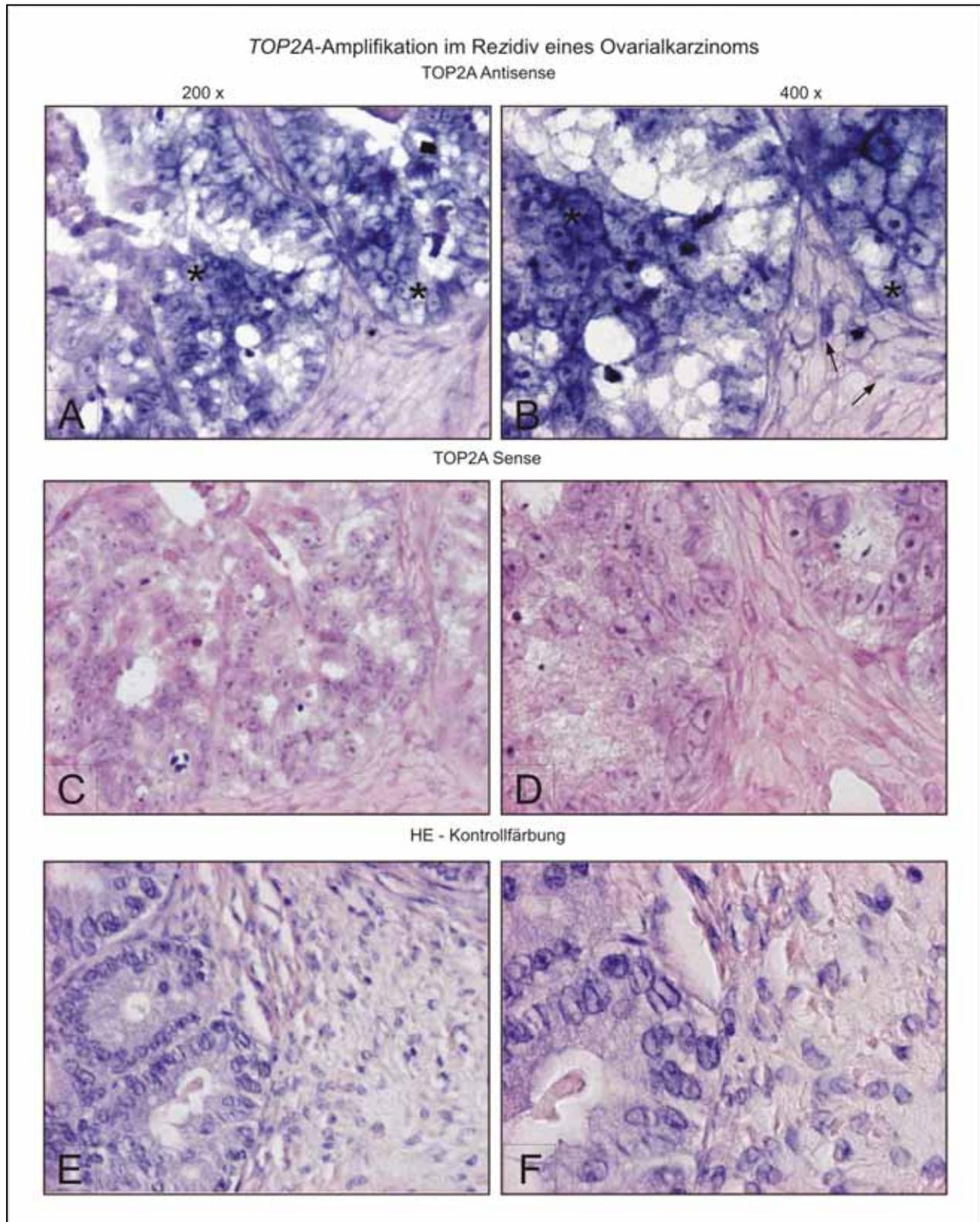


Abb. 15: Nachweis der *TOP2A*-Genamplifikation bei Patientin mit rezidiertem Ovarialkarzinom (FIGO IIIc, 60 Jahre). Bilder A und B zeigen die positive Expression nach der Antisense-Sonden-Hybridisierung. Die Markierungen zeigen die *TOP2A*-Amplifikation in Tumorzellen (A, B, Asterisk) und in tumorassoziierten Stromazellen (B, Pfeile). Bilder C und D stellen Negativkontrolle aus Folgeschnitten des Präparats dar, nach Hybridisierung mit der Sense-Sonde (kein Farbniederschlag). Bilder E und F zeigen Gewebeschnitte nach HE-Färbung als histologische Kontrolle. Links 200fache, rechts 400fache Vergrößerung.

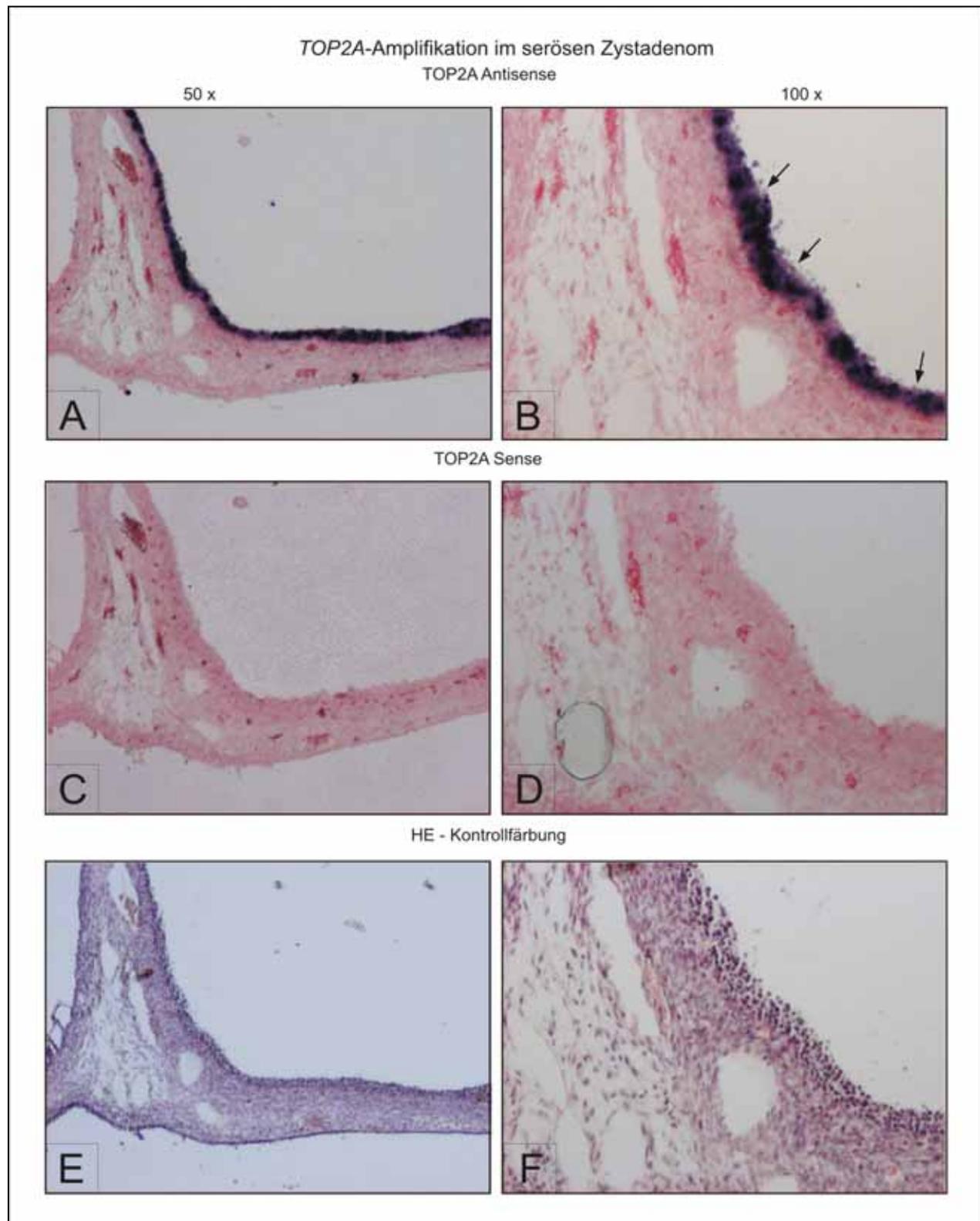


Abb. 16: Nachweis des *TOP2A*-Gentranskripts im Zystadenom des Ovars. Bilder A und B zeigen positive *TOP2A*-Genexpression mit der Antisense-Sonde. Die Pfeile markieren den *TOP2A* Nachweis in den Zellen des Oberflächenepithels. Bilder C und D sind die Negativkontrolle aus den Folgeschnitten des Präparates, hybridisiert mit der Sense-Sonde. Bilder E und F stellen Gewebeschnitte nach HE-Färbung als histologische Kontrolle dar. Links 50fache, rechts 100fache mikroskopische Vergrößerung.

C. 3 Bestätigung der differentiellen Expression von TOP2A in Tumor- und Stromazellen beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom

Die *in-situ* Hybridisierung beschreibt qualitativ die TOP2A-Genamplifikation in Tumorzellen und tumorassoziertem Stroma. Die quantitative Expressionsanalyse erfolgt an einem größeren histologisch heterogenen Ovarialkarzinomset mittels TaqMan RT-PCR und Immunhistochemie. Hier wird mittels laser-gestützter Mikrodissektion von kryoasserviertem Gewebe aus 23 Karzinomen die Gesamt-mRNA der getrennt isolierten Zellfraktionen gewonnen, in cDNA umgeschrieben und über die Amplifikation des TOP2A-Gens nach der TaqMan-Methodik quantifiziert. In der immunhistochemischen Versuchsreihe wird die TOP2A-Enzymexpression an 53 Karzinomen analysiert.

C. 3.1 Quantitativer Nachweis der zellulären TOP2A mRNA Amplifikation in mikrodissezierten Karzinomproben

Zu Beginn werden die heterogenen Tumorproben histopathologisch begutachtet, um anschliessend ausgewählte Gewebeareale mit Hilfe der UV-Laser Mikrodissektion zu isolieren. In getrennten Sitzungen werden homogene Populationen von einerseits Tumorzellen und andererseits tumorassoziertem Stroma aus den Kryoproben gewonnen. Aus der mRNA wird nach einer Umschreibung in cDNA die TaqMan™ RT-PCR durchgeführt (Tab. 13). Hierfür wird Gewebe von 23 Patientinnen untersucht, 14 mit primärem und 9 mit rezidiviertem Ovarialkarzinom. Alle Proben werden zuvor gegenüber der Expression des „house-keeping“ Gens (GAPDH) normiert. Diese Bestimmung dient als Qualitätskontrolle für die isolierte mRNA. In der Endauswertung werden deshalb nur Proben einbezogen, deren GAPDH C_T -Wert kleiner als 31 war, d. h. eine ausreichend große RNA-Transkriptmenge vorlag. Bei C_T -Werten größer als 31 sind folgende mRNA-Proben aus der Endauswertung ausgenommen worden: für das Stroma die Gewebeproben Nr. 1, 7, 10, 11, 17, 19 und 22, sowie die Tumorzellprobe vom Karzinom Nr. 13. Bei der Auswertung werden spezifische C_T -Werte berechnet. Diese Werte ergeben wiederum im Vergleich zu dem C_T -Wert der Referenzprobe die relative Expressionsstärke für jede untersuchte Zellprobe. Als Referenz ist eine kommerziell erworbene cDNA Präparation aus Ovar-Normalgewebe verwendet worden (Invitrogen).

Tab. 13:

Quantifizierung der *TOP2A*-Genamplifikation im TaqMan™ RT-PCR

Alle Proben sind gegenüber der GAPDH-Expression als „house-keeping Gen“ normiert. Der relative Expressionslevel wird in Bezug auf die Referenzprobe aus Ovar-Normalgewebe berechnet.

Nr.	Tumor	Gen	C _T (Mean)	StdDev C _T	Gen	C _T (Mean)	StdDev C _T	ΔC _T	StdDev ΔC _T	ΔΔC _T	Level	- Fehler	+ Fehler
R1 T	s Tumor	GAPDH	25,13	0,02	TOP2A	29,02	0,30	3,9	0,30	-1,7	3,18	0,60	0,74
R2 T	s Tumor	GAPDH	28,59	0,16	TOP2A	28,47	0,21	-0,1	0,26	-5,7	50,97	8,51	10,22
R2 S	s Stroma	GAPDH	29,36	0,25	TOP2A	30,15	0,18	0,8	0,31	-4,8	27,19	5,20	6,44
R3 T	s Tumor	GAPDH	24,73	0,50	TOP2A	27,36	0,12	2,6	0,52	-2,9	7,62	2,29	2,25
R3 S	s Stroma	GAPDH	24,34	0,56	TOP2A	27,58	0,47	3,2	0,73	-2,3	4,99	1,98	1,83
R4 T	s Tumor	GAPDH	22,50	0,18	TOP2A	27,89	0,05	5,4	0,18	-0,2	1,13	0,13	-0,38
R4 S	s Stroma	GAPDH	24,60	0,02	TOP2A	27,30	0,11	2,7	0,12	-2,9	7,24	0,55	0,51
R5 T	s Tumor	GAPDH	29,93	0,19	TOP2A	31,97	0,20	2,0	0,27	-3,5	11,51	1,99	2,41
R5 S	s Stroma	GAPDH	27,34	0,16	TOP2A	28,35	0,16	1,0	0,22	-4,6	23,43	3,31	3,31
R6 T	s Tumor	GAPDH	28,55	0,17	TOP2A	31,05	0,06	2,5	0,18	-3,1	8,34	0,96	0,94
R6 S	s Stroma	GAPDH	28,76	0,08	TOP2A	28,08	0,16	-0,7	0,17	-6,2	75,15	8,54	8,54
R7 T	s Tumor	GAPDH	26,62	0,03	TOP2A	31,63	0,25	5,0	0,25	-0,6	1,46	0,24	-0,29
R8 T	s Tumor	GAPDH	29,49	0,24	TOP2A	31,59	0,40	2,1	0,46	-3,5	11,00	3,01	3,00
R8 S	s Stroma	GAPDH	30,00	0,47	TOP2A	32,51	0,13	2,5	0,48	-3,1	8,28	2,36	2,34
R9 T	e Tumor	GAPDH	25,33	0,36	TOP2A	26,80	0,32	1,5	0,48	-4,1	17,03	4,79	4,79
R9 S	e Stroma	GAPDH	28,45	0,23	TOP2A	30,13	0,28	1,7	0,36	-3,9	14,72	3,26	3,26
Ovar	Referenz	GAPDH	21,82	0,08	TOP2A	27,38	0,21	5,6	0,23	0,0	1,00	0,15	-0,35
P10 T	e Tumor	GAPDH	25,29	0,18	TOP2A	30,90	0,06	5,6	0,19	0,1	0,97	0,12	-0,38
P11 T	e Tumor	GAPDH	21,78	0,08	TOP2A	28,39	0,28	6,6	0,29	1,0	0,48	0,09	-0,26
P12 T	s Tumor	GAPDH	28,10	0,06	TOP2A	32,59	0,23	4,5	0,24	-1,1	2,09	0,32	0,37
P12 S	s Stroma	GAPDH	29,01	0,29	TOP2A	33,20	0,09	4,2	0,30	-1,4	2,59	0,49	0,61
P13 S	s Stroma	GAPDH	30,00	0,50	TOP2A	35,57	0,18	5,1	0,53	-0,5	1,38	0,42	-0,11
P14 T	e Tumor	GAPDH	26,94	0,09	TOP2A	30,18	0,27	3,2	0,29	-2,3	5,00	0,90	1,10
P14 S	e Stroma	GAPDH	27,76	0,37	TOP2A	31,57	0,20	3,8	0,43	-1,7	3,36	0,86	0,53
P15 T	s Tumor	GAPDH	27,17	0,42	TOP2A	28,96	0,50	1,8	0,66	-3,8	13,66	4,99	4,99
P15 S	s Stroma	GAPDH	26,73	0,57	TOP2A	29,21	0,13	2,5	0,58	-3,1	8,46	2,82	2,79
P16 T	s Tumor	GAPDH	24,44	0,23	TOP2A	35,83	0,29	11,4	0,37	5,8	0,02	0,00	-0,01
P16 S	s Stroma	GAPDH	27,16	0,54	TOP2A	37,78	1,06	10,6	1,19	5,1	0,03	0,02	-0,01
P17 T	e Tumor	GAPDH	28,82	0,18	TOP2A	29,99	0,40	1,2	0,44	-4,4	20,97	5,46	7,39
P18 T	s Tumor	GAPDH	27,02	0,07	TOP2A	28,60	0,09	1,6	0,11	-4,0	15,74	1,16	1,25
P18 S	s Stroma	GAPDH	27,57	0,23	TOP2A	29,32	0,44	1,8	0,50	-3,8	13,94	4,10	5,81
P19 T	s Tumor	GAPDH	29,61	0,06	TOP2A	29,95	0,16	0,3	0,18	-5,2	37,36	4,28	4,84
P20 T	e Tumor	GAPDH	29,31	0,33	TOP2A	30,00	0,19	0,7	0,38	-4,9	29,24	6,82	8,90
P20 S	e Stroma	GAPDH	28,66	0,36	TOP2A	32,21	0,46	3,6	0,59	-2,0	4,03	1,34	2,02
P21 T	s Tumor	GAPDH	28,88	0,08	TOP2A	29,57	0,40	0,7	0,41	-4,9	29,34	7,29	9,70
P21 S	s Stroma	GAPDH	30,00	0,32	TOP2A	32,90	0,45	2,0	0,55	-3,6	11,88	3,79	5,56
P22 T	s Tumor	GAPDH	28,20	0,20	TOP2A	29,61	0,23	1,4	0,30	-4,1	17,71	3,37	4,17
P23 T	m Tumor	GAPDH	27,33	0,03	TOP2A	34,82	0,24	7,5	0,24	1,9	0,26	0,04	-0,18
P23 S	m Stroma	GAPDH	27,90	0,30	TOP2A	37,03	0,35	9,1	0,46	3,6	0,08	0,02	-0,06

Die TaqMan™ RT-PCR zeigt eine gesteigerte *TOP2A*-Genamplifikation in den mikrodisszierten Tumorzellen. In den Zellen des tumorassoziierten Stromas wird ebenfalls eine starke *TOP2A*-Expression gefunden. *TOP2A* ist im Tumor und Stroma deutlich stärker exprimiert als in der Normalgewebe-Referenzprobe (Abb. 17 und 18). Die heteroge Überexpression innerhalb der Tumor- und Stromazellen sowie der

primären und rezidierten Tumore wird hinsichtlich bestehender Unterschiede zwischen den Gruppen ausgewertet.

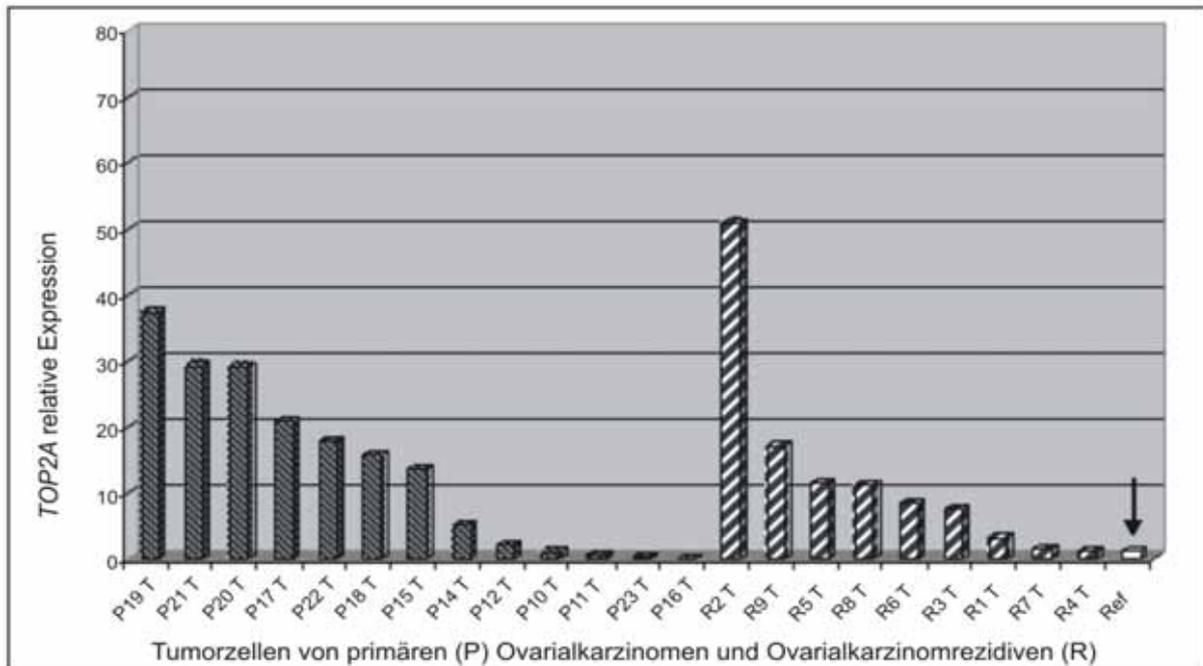


Abb. 17: Relative *TOP2A*-Expression in den Tumorzellen von 23 Ovarialkarzinomen. Als Referenz (Pfeil) dient eine Probe aus Normalovar. Die Balkenbeschriftung zeigt Gewebetyp und Probennummer an, z. B. P19T ist Primärkarzinom Nr. 19 Tumorzellen. Nur Proben mit einem C_T -Wert < 31 sind ausgewertet.

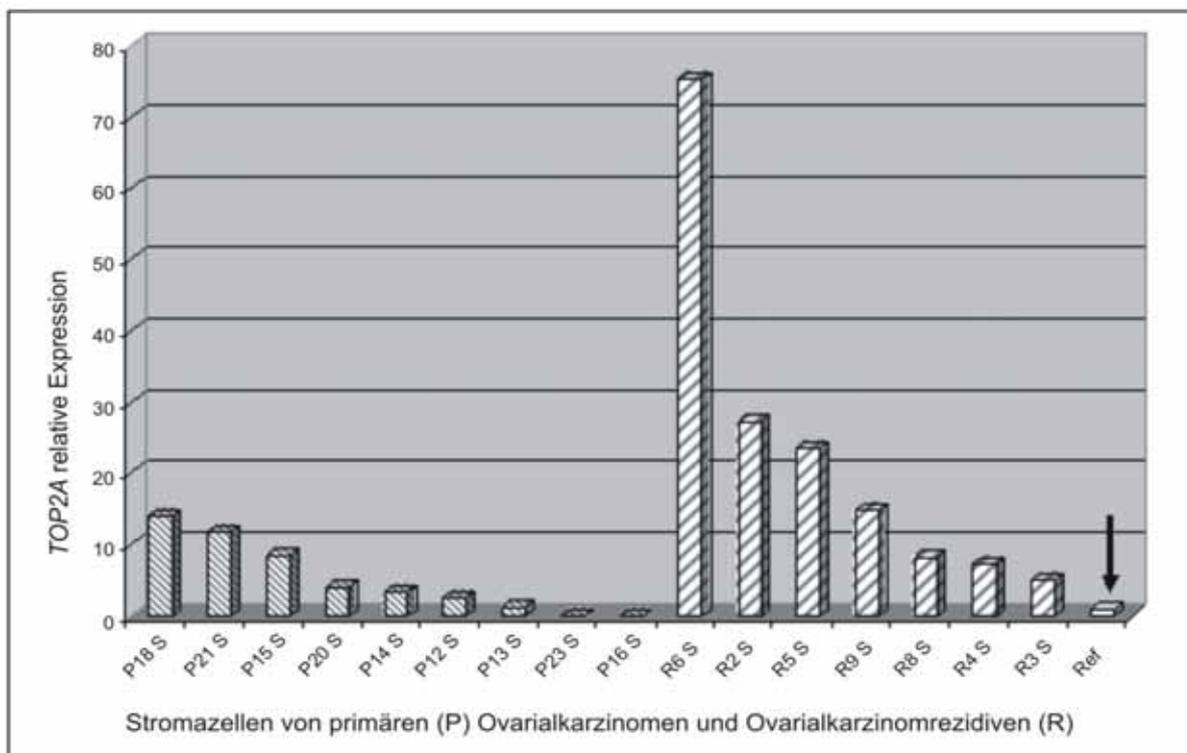


Abb. 18: Relative *TOP2A*-Expression im Stroma von 23 Ovarialkarzinomen. Als Referenz (Pfeil) dient eine Probe aus Ovar Normalgewebe. Die Balkenbeschriftung zeigt Gewebetyp und Probennummer an, z.B. R6S ist eine Rezidivprobe Nr. 6 aus Stromazellen. Nur Proben mit C_T -Wert < 31 sind ausgewertet.

Insgesamt zeigen die Tumor- und Stromazellen eine starke Überexpression des *TOP2A*-Gen bei zum Teil sehr hoher Standardabweichung und Streubreite (Abb. 19). Im direkten Vergleich weisen die Tumorzellen mit einem Median von 9.7 der relativen Expression eine stärkere Amplifikation als die Stromazellen (Median 7.8). Bei der Überprüfung mit dem Mann-Whitney Test erweist sich dieser Unterschied jedoch als nicht statistisch signifikant ($p=0.804$).

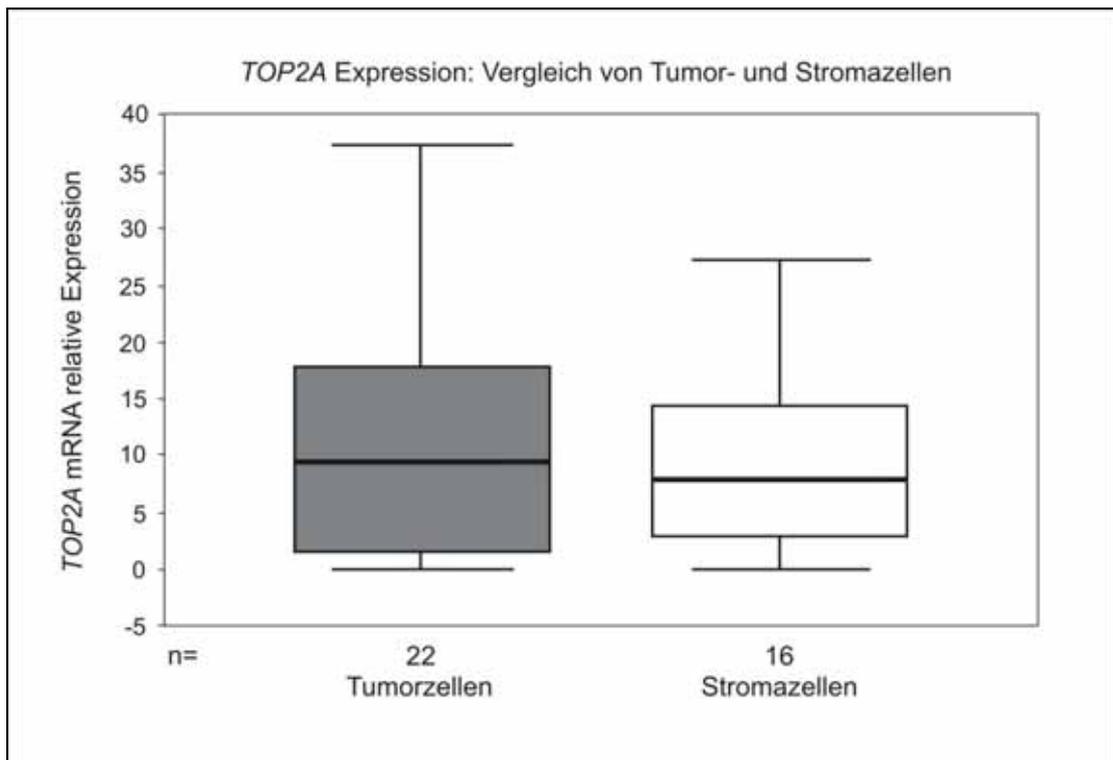


Abb. 19: Grafische Darstellung der *TOP2A*-Amplifikation in den zwei Zellgruppen ($p=0.804$).

Im Weiteren erfolgt eine Auswertung in Bezug auf den Chemotherapiestatus zwischen Primärkarzinomen (Platin-naiv) und rezidierten Karzinomen (Platin-vorbehandelt) (Abb. 17 und 20). Die Tumorzellen primärer Karzinome weisen einen Amplifikationsmedian im Bereich einer etwa 10fachen Erhöhung, eine sehr große Standardabweichung und eine deutliche Streubreite der *TOP2A*-Amplifikationsstärke auf. Im Vergleich dazu haben die Rezidivproben einen niedrigeren Median der tumorzellenspezifischen Amplifikation mit einem bis zu siebenfachen Anstieg. Nach einer Überprüfung mit dem Mann-Whitney Test erweisen sich diese Unterschiede als nicht signifikant ($p=0.973$).

Bei der Analyse des Amplifikationsverhaltens von *TOP2A* in den Stromazellen wird eine deutliche Überexpression des Gens in der Subgruppe der Rezidive gemessen. Bei den Primärkarzinomen zeigt sich eine wesentlich niedrigere mediane *TOP2A*-Expression. Dieser Unterschied erweist sich als signifikant ($p=0.017$) (Tabelle 14).

Damit liegen die Ergebnisse der TaqMan basierten quantitativen RNA-Analysen in Übereinstimmung mit dem Nachweis der genomischen Aktivität des *TOP2A*-Gens in den Tumor- und Stromazellen beim epithelialen Ovarialkarzinom. Neben den Tumorzellen weist auch das tumorassoziierte Stroma eine signifikante Überexpression von *TOP2A* auf. Bei etwa 30% der rezidierten Ovarialkarzinome (3/9 Fällen) wird eine deutlich stärkere Amplifikation des *TOP2A*-Gens im Stroma im Vergleich zum Tumor ermittelt.

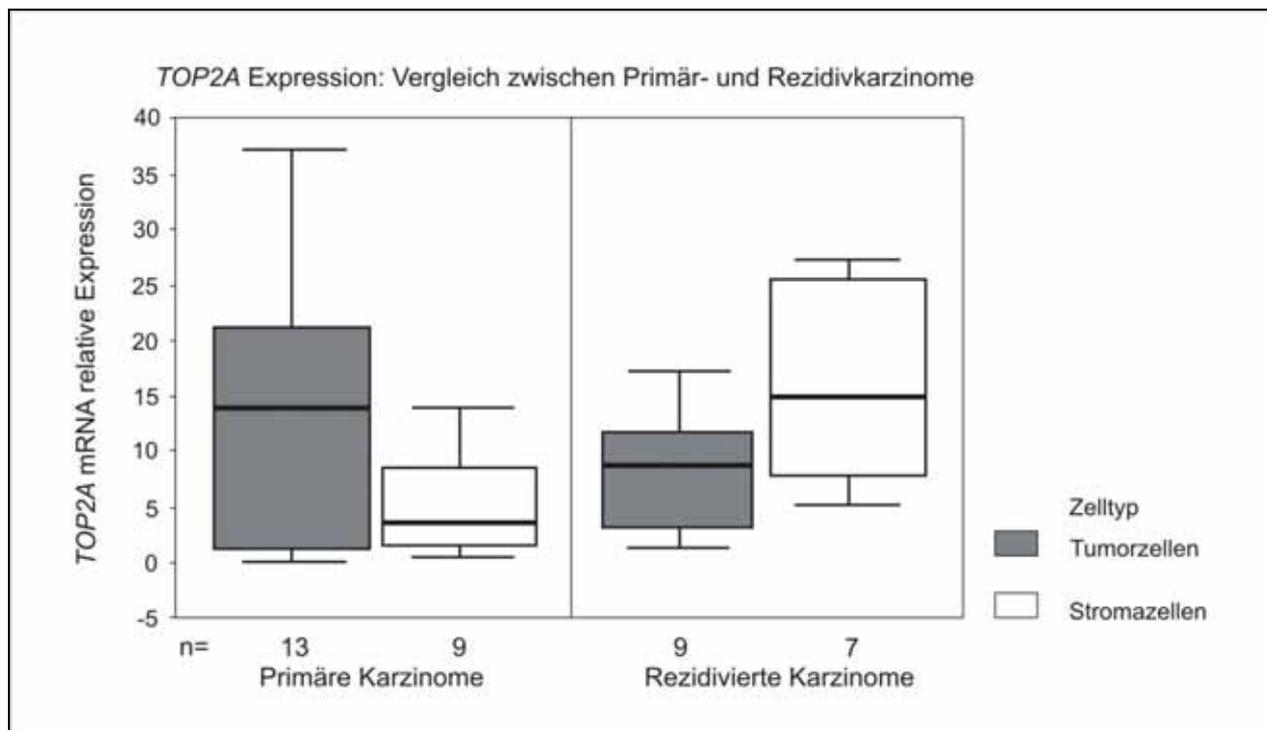


Abb. 20: Vergleichende Darstellung der *TOP2A* Expression in den mikrodisszezierten Tumorzellen und Stromazellen der Primärkarzinome (linkes Diagramm) und der Rezidivkarzinome (rechtes Diagramm) der untersuchten Gewebepräparate. Nur Präparationen mit CT-Wert < 31 sind ausgewertet.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse aus der TaqMan RT-PCR Versuchsreihe stellt die Tabelle 14 dar. In mikrodisszezierten Ovarialtumorproben wird in den meisten Proben eine *TOP2A*-Überexpression festgestellt. Mittels der Echtzeit-PCR Technik kann eine detaillierte quantitative Erfassung der zellspezifischen mRNA-Expression im heterogenen Gewebe maligner Ovarialtumoren erfolgen. Die Subgruppenanalyse der *TOP2A*-Amplifikation bezogen auf den Erkrankungsstatus: primäre (Chemotherapie naive) vs. rezidierte (Platin-vorbehandelte) Ovarialkarzinome, ergibt eine stärkere Überexpression des *TOP2A*-Gens in den Tumorzellen im Vergleich zu den tumorassoziierten Stromazellen. Dennoch ist dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0.804$). Die Tumorzellen weisen eine stärkere Überexpression in der Gruppe der Primärkarzinome im Vergleich zu der Gruppe der rezidierten Tumoren auf ($p=0.973$).

Dagegen hat das *TOP2A*-Gen in den Stromazellen der Rezidive eine signifikant stärkere Amplifikation als in der Gruppe der Primärtumoren ($p=0.017$).

Tab. 14:

TOP2A-Amplifikation in mikrodisssezierten Tumor- und Stromazellen

Vergleichende Darstellung der Überexpression der mikrodisssezierten Tumorzellen zu den tumor-assoziierten Stromazellen der primären ($n=14$) und rezidierten ($n=9$) Ovarialkarzinome

Vergleich der differentiellen <i>TOP2A</i>-Amplifikation in primären und rezidierten Ovarialkarzinomen	
Tumorzellen (gesamt) vs. Stromazellen (gesamt)	Tumor > Stroma $p=0.804$
Tumorzellen von primäre Karzinome (unbehandelt) vs. Tumorzellen vom Ovarialkarzinomrezidiv (vorbehandelt)	Primär > Rezidiv $p=0.973$
Stromazellen von primäre Karzinome (unbehandelt) vs. Stromazellen vom Ovarialkarzinomrezidiv (vorbehandelt)	Rezidiv > Primär $p=0.017$

C. 3.2 Immunhistochemischer Nachweis der zellulären *TOP2A* Überexpression

Die *TOP2A* zeigt auf der mRNA-Ebene einen Amplifikationsanstieg sowohl im Tumor als auch im Stroma auf. Die immunhistochemische Analyse auf Proteinebene erfolgt an einem Probenet aus 53 Ovarialkarzinome und einer Kontrollgruppe aus 7 Ovarproben und 4 Zystadenomen. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen wird als Prozentsatz berechnet, indem 1500 Zellen pro Zelltyp (jeweils getrennt Tumor und Stromazellen) von jedem Präparat in fünf bis zehn HPF (*high-power field*, 400fache Vergrößerung) ausgezählt werden und die Färbintensität der Antikörperreaktion evaluiert wird. Die Evaluierung über den IRS-Score ist selbst vom Doktoranden durchgeführt worden.

C. 3.2.1 Unterscheidung der Tumorzellen von den Stromazellen über CK 7

Cytokeratin 7 (CK7) ist ein Intermediärfilament, das ein spezifischer Marker für epitheliale Zellen darstellt [104, 107]. Epithelien und Tumoreale mit z. T. im Stroma verstreuten Tumorzellen (wie in der Invasionsfront) werden durch die kompakte zytoplasmatische Epithelfärbung abgegrenzt (Abb. 21). Mittels der CK7 Färbung werden hochspezifisch alle epithelialen Komponenten in den gewebsheterogenen Ovarkarzinomproben identifiziert [60]. Dieser Marker wurde in der Studie eingesetzt um Tumorzellen von dem umliegenden Stroma zu unterscheiden.

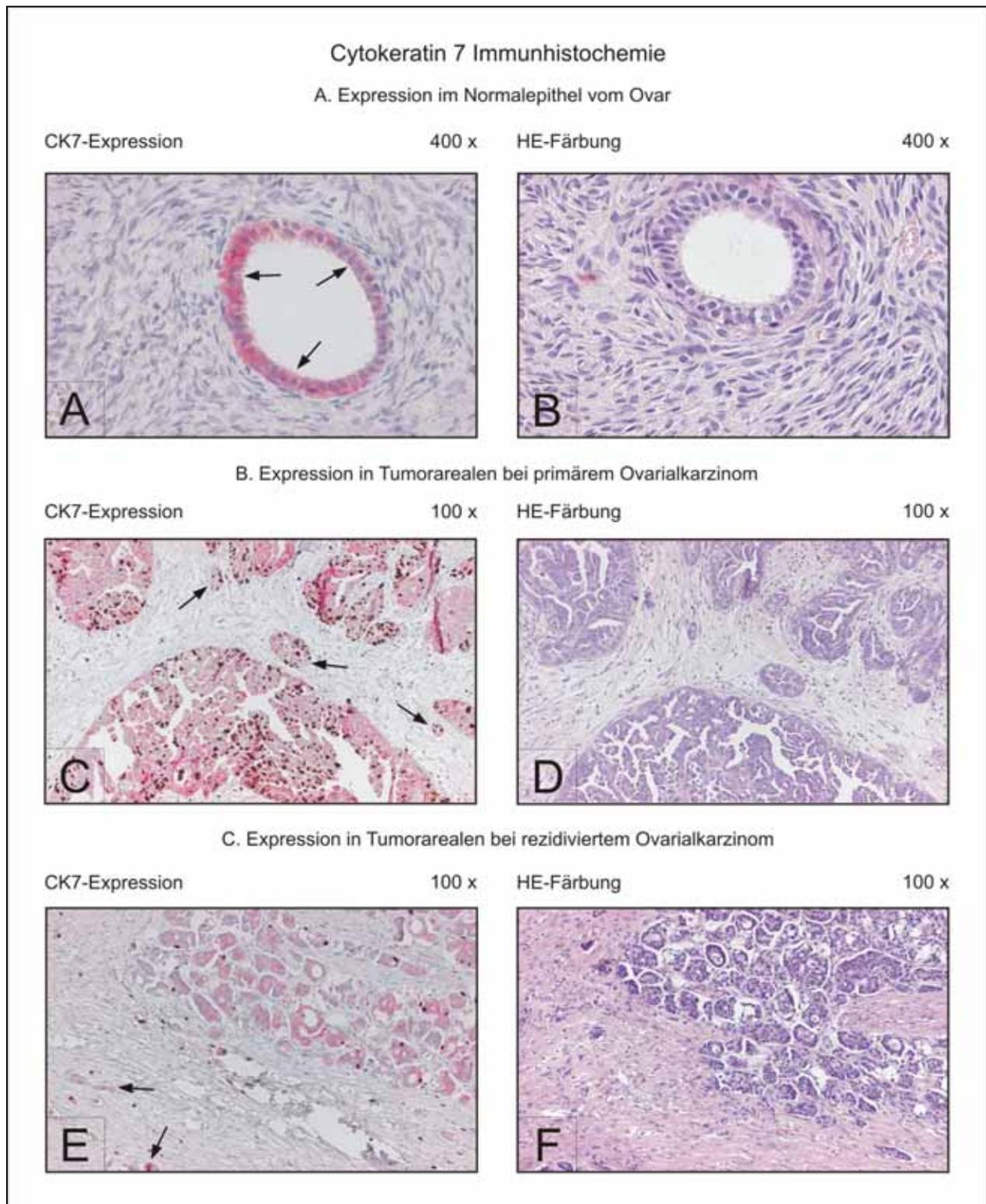


Abb. 21: Immunhistochemie mit CK 7 im Normalgewebe und im Ovarialkarzinom. Die CK7-Färbung dient zur Abgrenzung der Epithelzellen und Tumorzellen von den Stromazellen. Häufig wird der CK7-Nachweis als Doppelfärbung mit dem Ki-67-Antikörper durchgeführt. Im Teil A ist die positive Reaktion des Follikel­epithels im Ovar-Normalgewebe erkennbar (Pfeile), das Stroma ist negativ. Teile B und C zeigen die typische Positivreaktion von Karzinomzellen, die dadurch gut vom Stroma abgrenzbar sind. Verstreute Tumorzellkomplexe können leicht identifiziert werden (Pfeile).

C. 3.2.2 TOP2A Enzymexpression in Tumorzellen und Stromazellen

Für die Evaluation der TOP2A-Enzymexpression in der immunhistochemischen Untersuchungsreihe wird der monoklonale Ki-S1 Antikörper eingesetzt. Die Auswertung erfolgt nach dem semiquantitativen immunreaktiven Score, wobei 1500 Tumorzellen bzw. Epithelzellen in getrennten Ansätzen von den Stromazellen beurteilt werden.

TOP2A zeigt bei positiver immunhistochemischer Antwort eine typische Kernfärbung und in einigen Fällen eine diffuse zytoplasmatische Reaktion. Die positive Antikörperreaktion kann sowohl in den Tumor- und Epithelzellen wie auch in den Stromazellen visualisiert werden (Abb. 22).

Die Expression von TOP2A in den Tumorzellen der Ovarialkarzinome weist bei großer Expressionsbreite hohe Medianwerte für den IRS-Score auf. Die benignen Zystadenome verhalten sich ähnlich bei niedrig liegenden IRS-Werten. Die TOP2A Expression in den Normalepithelien ist negativ (Abb. 23). Diese Ergebnisse erweisen sich als hoch signifikant bei der Überprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test ($p=0.0001$). In einem Subgruppen-Vergleich zeigen die primären Ovarialkarzinome eine signifikant stärkere TOP2A Expression in den Tumorzellen als die Platin-vorbehandelten Rezidivtumore ($p=0.023$).

In der Auswertung der Stromazellen wird erneut eine positive TOP2A Expression nachgewiesen (Abb. 24). Es zeigt sich die Tendenz zur Zunahme der Expressionsstärke vom Normalgewebe über benigne Zystadenome bis zu den Ovarialkarzinomen. Auch hier ergibt die Überprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test einen signifikanten Unterschied ($p=0.001$). In der Subgruppenanalyse zeigt das Stroma der rezidierten Karzinome eine höher liegende mediane TOP2A Expression, allerdings ohne statistische Signifikanz ($p=0.056$).

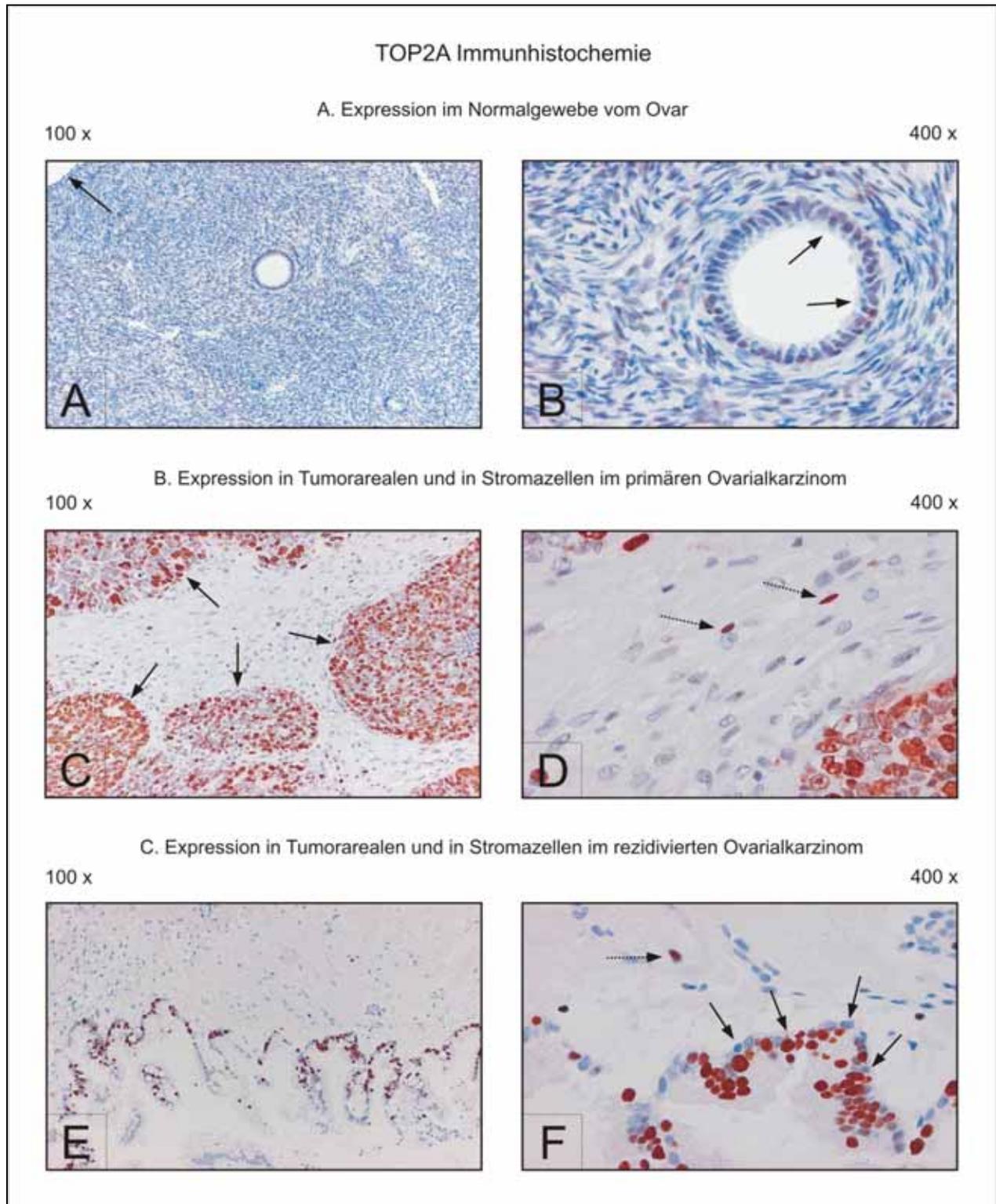


Abb. 22 Expression des TOP2A-Enzyms in Normalgewebe und im Ovarialkarzinom. Im Normalgewebe zeigt TOP2A in den Epithelzellen eine schwache Expression, das Stroma ist überwiegend negativ. In den Karzinomproben wird im Tumor und im Stroma eine signifikant stärkere Expression nachgewiesen. Der TOP2A Antikörper zeigt eine spezifische Kernreaktion.

A: Oberflächenepithelien und Follikelzyste mit schwacher Reaktion <10% positive Zellen (A und B, Pfeile) und negatives Stroma.

B: Primärkarzinom (endometrioid, FIGO IV, 58 Jahre) mit >80% positiven Tumorzellen (C, Pfeile) und 10-50% positiven Stromazellen (D, punktierte Pfeile).

C: Rezidiertes Karzinom (muzinös, FIGO IIIc, 58 Jahre) mit 51-80% positiven Tumorzellen (F, Pfeile) und <10% positiven Stromazellen (F, punktierte Pfeile).

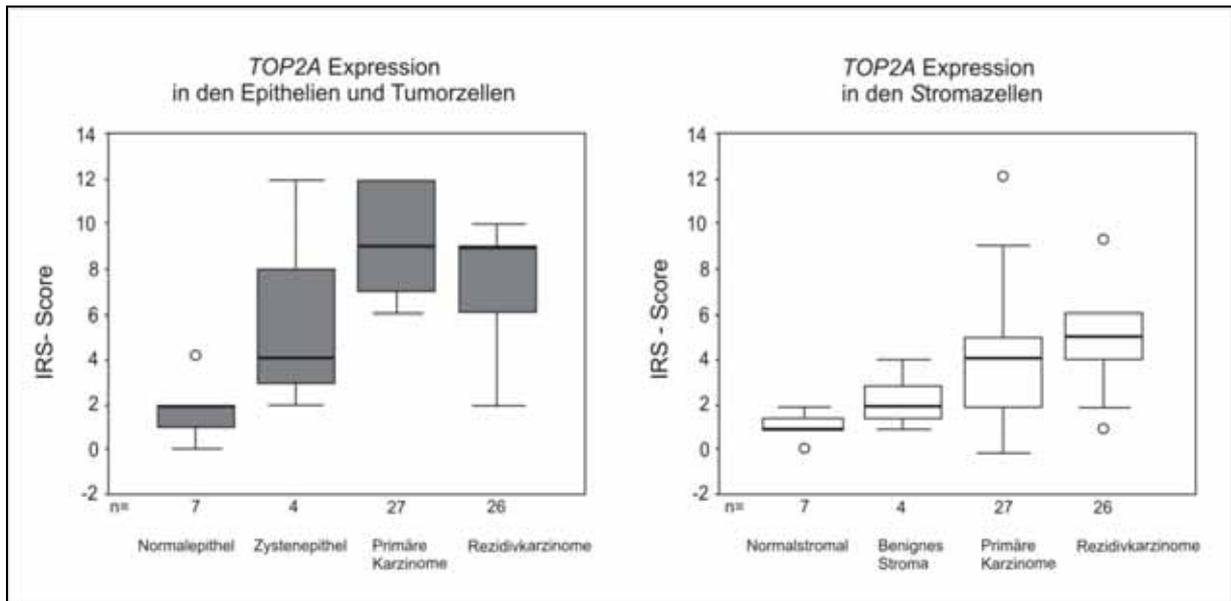


Abb. 23: Differentielle TOP2A Expression zwischen Normalepithelien und Tumorzellen (links, $p=0.0001$), sowie zwischen Normalstroma und tumorassoziertem Stroma (rechts, $p=0.0001$).

Der Vergleich der absoluten Expressionsprofile (Tumorzellen und Stromazellen) zeigt eine signifikante Abnahme der Expressionsstärke in der Reihenfolge: Tumor, tumorassoziertes Stroma, Epithelien, Normalstroma ($p=0.0001$) (Abb. 24). Die Tumorzellen beim Ovarialkarzinom weisen eine signifikant stärkere Überexpression als die tumorassozierten Stromazellen ($p=0.0001$) auf. Das Normal- und Zystenepithel sowie das Normalstroma haben eine fehlende bis schwache TOP2A-Expression.

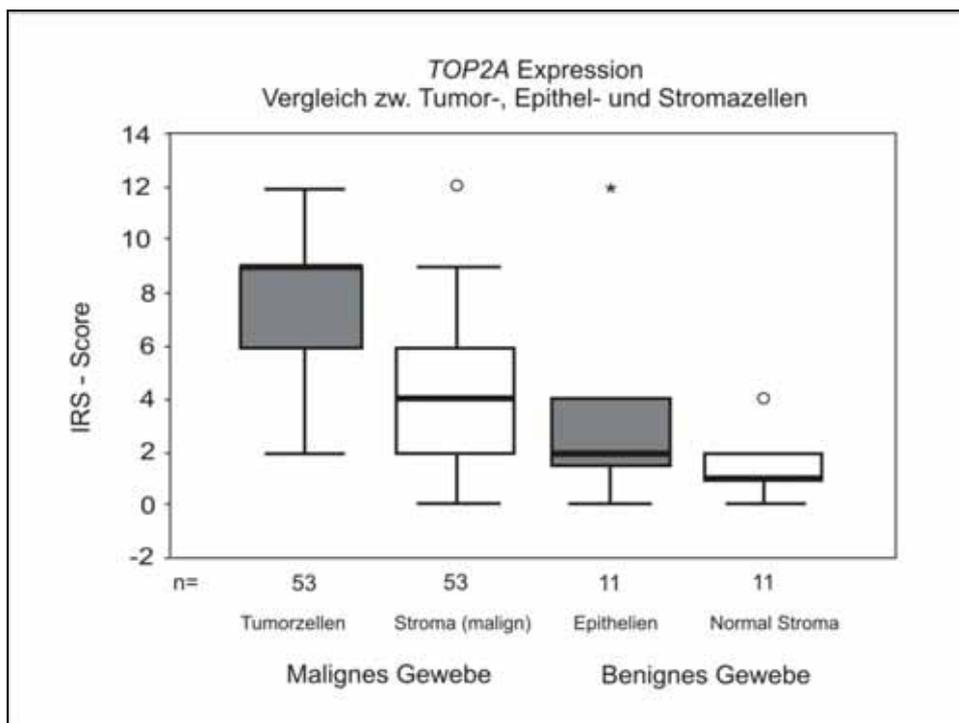


Abb. 24: TOP2A Expression bei Normalepithelien, Tumorzellen, tumorassoziertem Stroma (primäre und rezidierte Karzinome zusammen) und Normalstroma nach Zell- und Gewebstypen ($p=0.0001$).

C. 4 Überlebenszeitanalysen

Die folgenden Berechnungen stützen sich auf unser Patientenkollektiv aus 62 Frauen die zwischen 2001 und 2003 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Charité Campus Virchow, Berlin behandelt und im Rahmen der Tumor Bank Ovarian Carcer analysiert wurden. Das Follow-up berücksichtigt alle Tumornachsorgedaten bis Dezember 2007. Die Überlebenszeitberechnungen werden nach der Kaplan-Meier Methode ausgewertet.

Bei der Nachbeobachtung konnten Informationen von 61 Patientinnen (98,4%) gesammelt werden, zu einer Patientin (1,6%) besteht kein Kontakt seit dem stationären Aufenthalt. Dabei lässt sich feststellen, dass während der Nachbeobachtungszeit 36 Patientinnen (58,1%) an den Folgen des Tumorleidens verstorben waren. Bei dem postoperativen Gesamtüberleben betrug die mittlere Beobachtungszeit 37,4 Monate (Range 0 - 75) bzw. 24 Monate (Median) mit 95% KI von 29,8 bis 45,1 Monaten (Abb. 25).

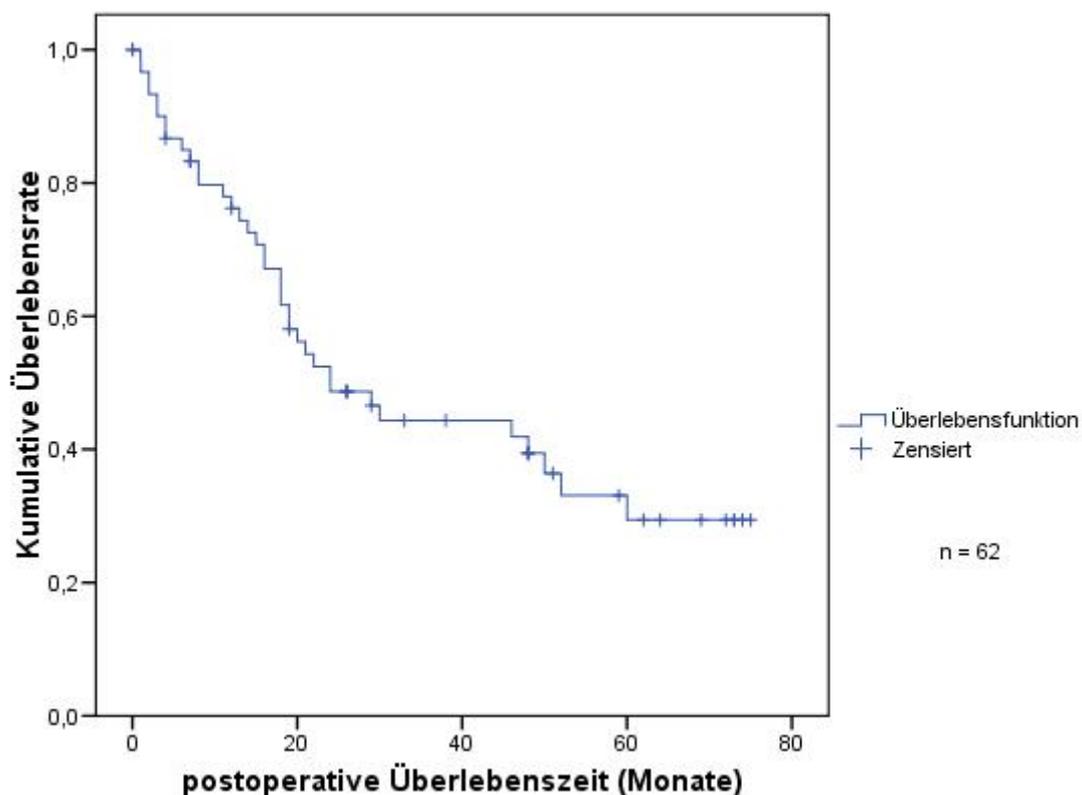


Abb. 25: Gesamtüberlebenszeiten nach Kaplan-Meier im Zeitraum 2001-2007 (Monate), n=62

C. 4.1 Tumorrest und Überleben

Um den Einfluss der postoperativen Tumorlast auf die Überlebenszeit zu analysieren, wurden Tests nach Kaplan-Meier durchgeführt. Dabei wird die Patientengruppe mit maximaler Tumorreduktion (R0-Resektion) gegenüber der Patientengruppe mit makroskopischem Tumorrest verglichen. Bei dem kumulativen Gesamtüberleben zeigt die R0-Resektion ein mittleres Gesamtüberleben von 49,8 Monaten (Median nicht erreicht) und deutet auf einen relevanten Überlebensvorteil, im Unterschied zu den Frauen, bei welchen keine komplette Tumorresektion erreicht werden konnte. In dieser Gruppe lag das mittlere Überleben bei 22,9 Monaten mit einem Median von 19 Monaten. Diese Daten erweisen sich als statistisch hoch signifikant ($p=0.001$) (Abb. 26).

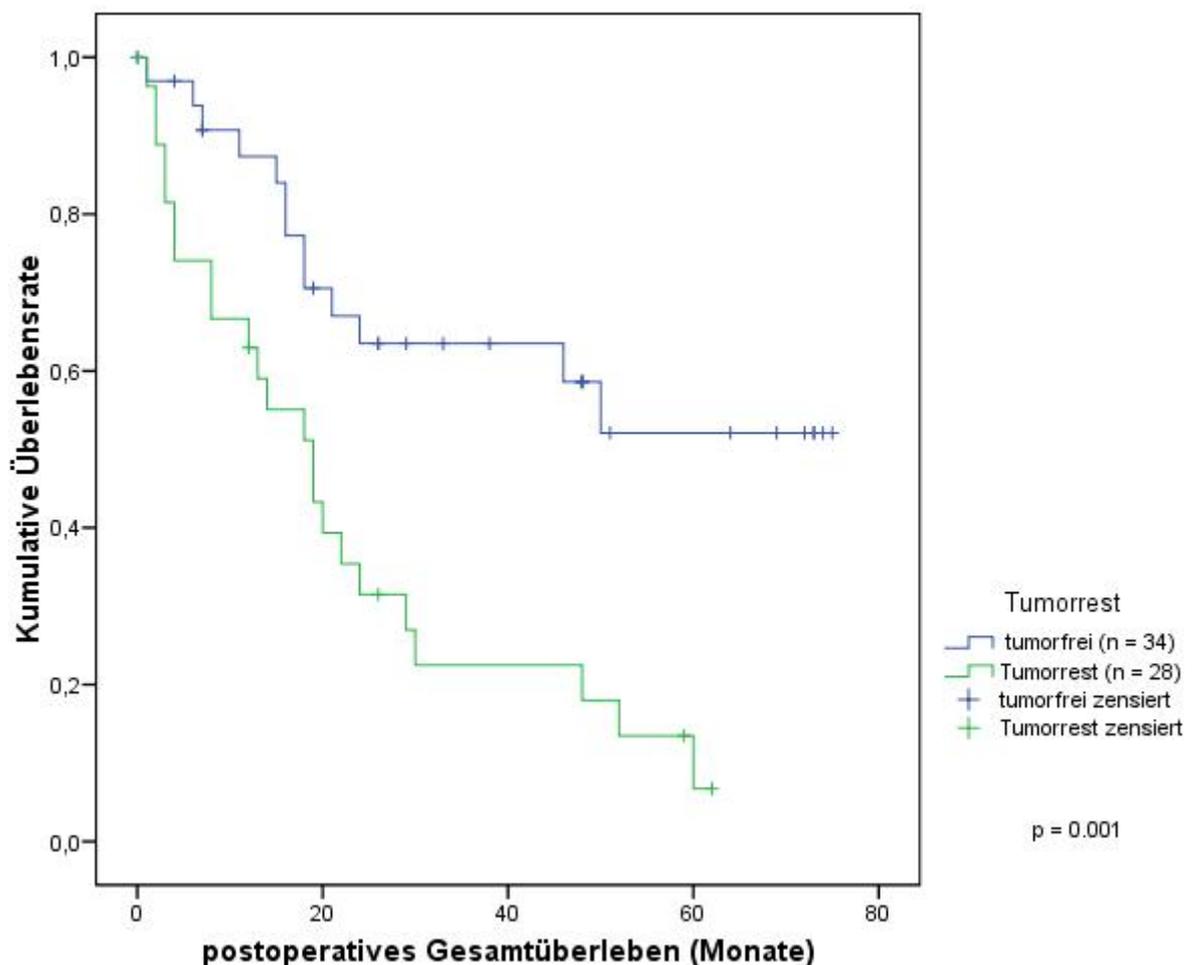


Abb. 26: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom postoperativen Tumorrest

C. 4. 2 FIGO-Stadium und Überleben

Für die Analyse der Überlebenszeit werden alle FIGO I und II Karzinome sowie Tumoren der Stadien III und IV zu jeweils zwei separaten Gruppen zusammengefasst. Das postoperative Überleben der primären Ovarialkarzinome FIGO I/II hat nach 75 Monaten das Median der Überlebenskurve noch nicht erreicht. Für die fortgeschrittene Tumorstadien FIGO III/IV liegt das mediane Überleben bei 48 Monaten. Dieser Unterschied ist trotzdem mit $p=0,26$ nicht statistisch relevant (Abb. 27).

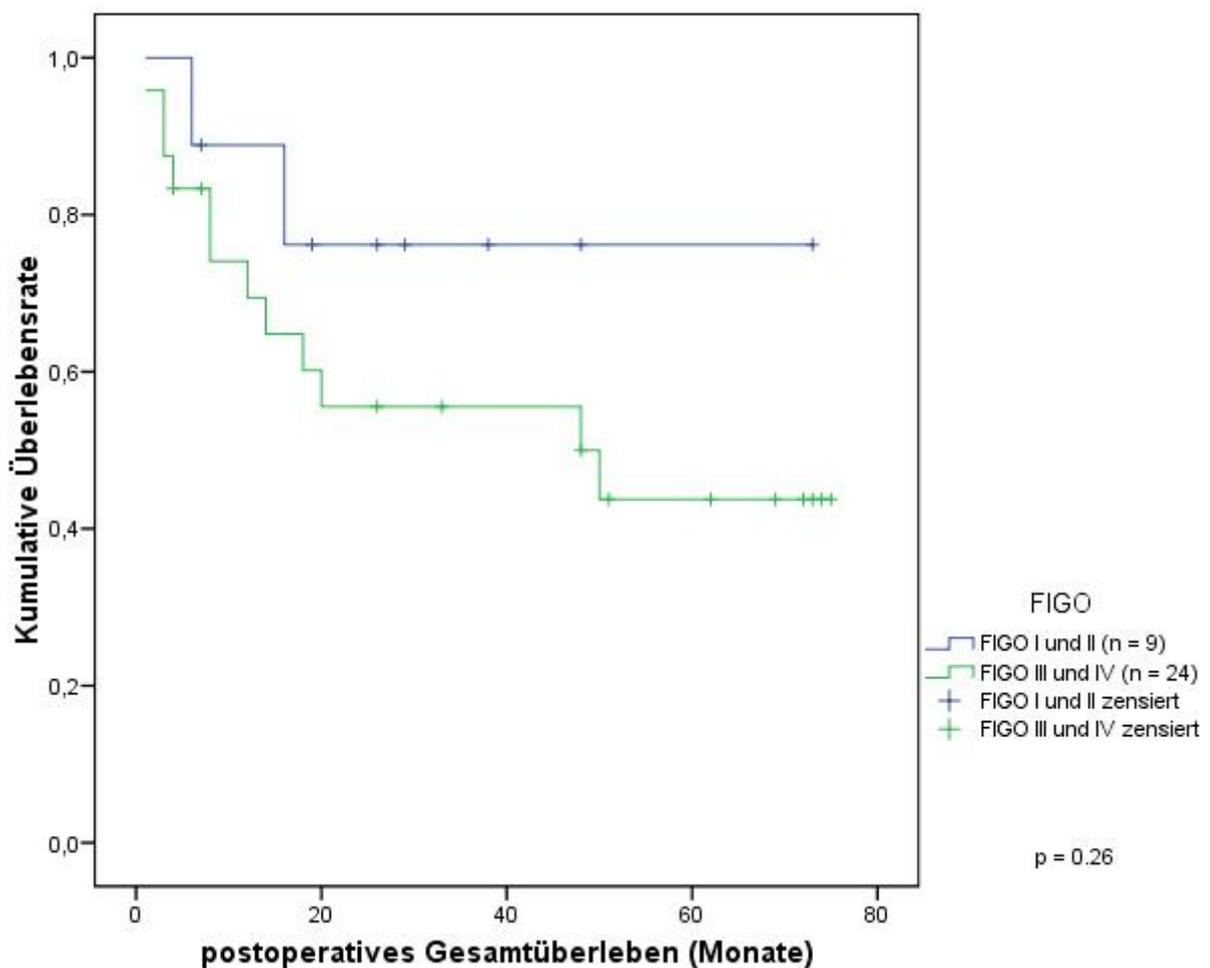


Abb. 27: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom FIGO Stadium (primäre Karzinome, n = 33)

C. 4. 3 Grading und Überleben

Für die Überlebenszeitanalysen werden G1- und G2-Tumoren sowie G3-Tumoren zu jeweils zwei Untersuchungsgruppen zusammengefasst. In der Analyse der Überlebenszeitwahrscheinlichkeiten konnte kein eindeutiger Zusammenhang ($p = 0,98$) zwischen dem Grad der Differenzierung und dem postoperativen Überleben der Patientinnen evaluiert werden (Abb. 28).

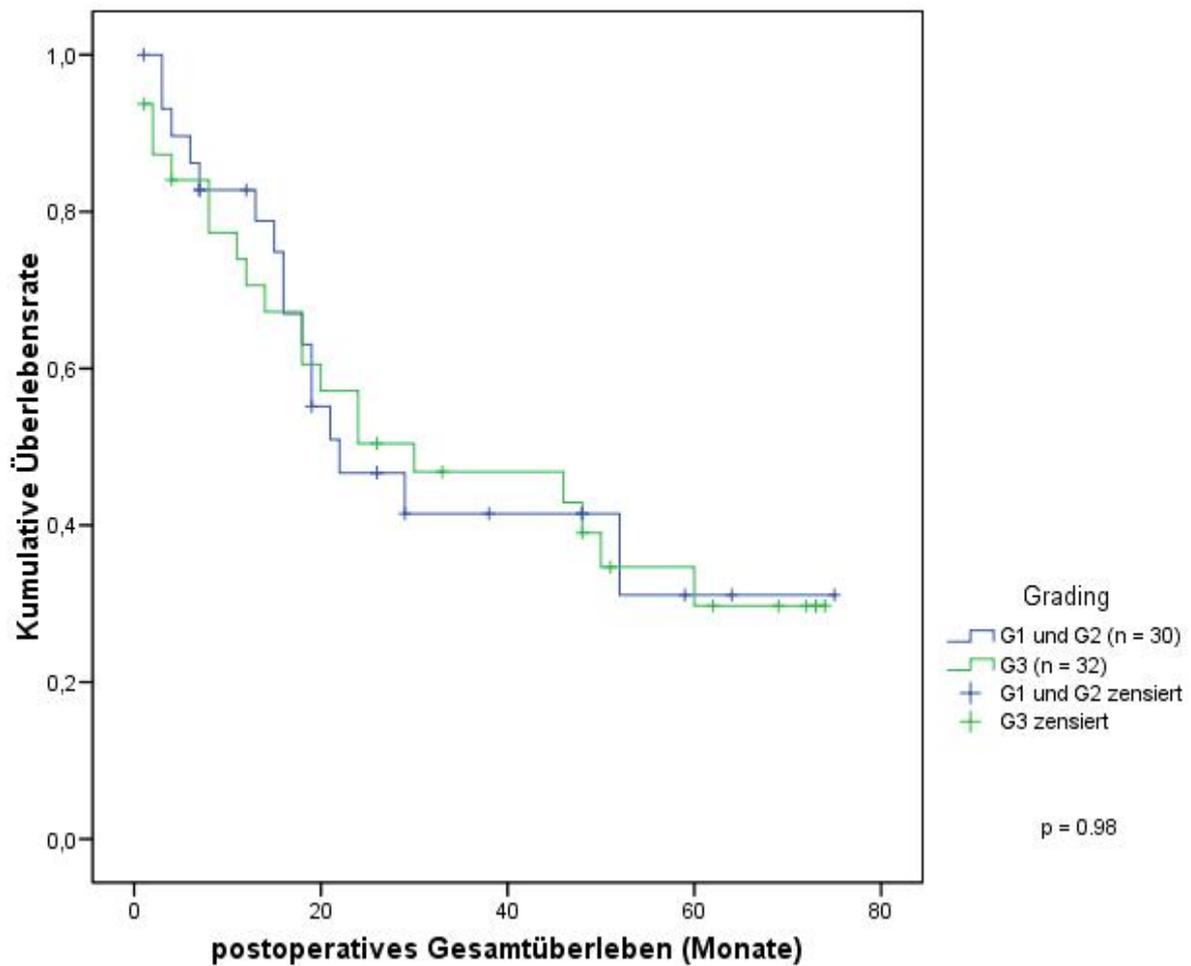


Abb. 28: Überlebenszeiten und Grading

C. 4. 4 Histologie und Überleben

Im Weiteren wird die geschätzte Überlebenszeit unter Berücksichtigung des histologischen Karzinomtyps untersucht. Aufgrund der geringen Fallzahl der endometrioiden, muzinösen und gemischten Tumorproben werden sie für die Auswertung zu einer Gruppe zusammengefasst und mit den serös-papillären Ovarialkarzinomen verglichen.

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigen serös-papilläre Karzinome ein etwas kürzeres medianes postoperatives Gesamtüberleben von 22 Monaten vs. 24 Monaten bei den Tumoren aus den übrigen histologischen Subtypen. Für diese Tendenz ist der Unterschied mit $p = 0,29$ nicht signifikant (n.s.).

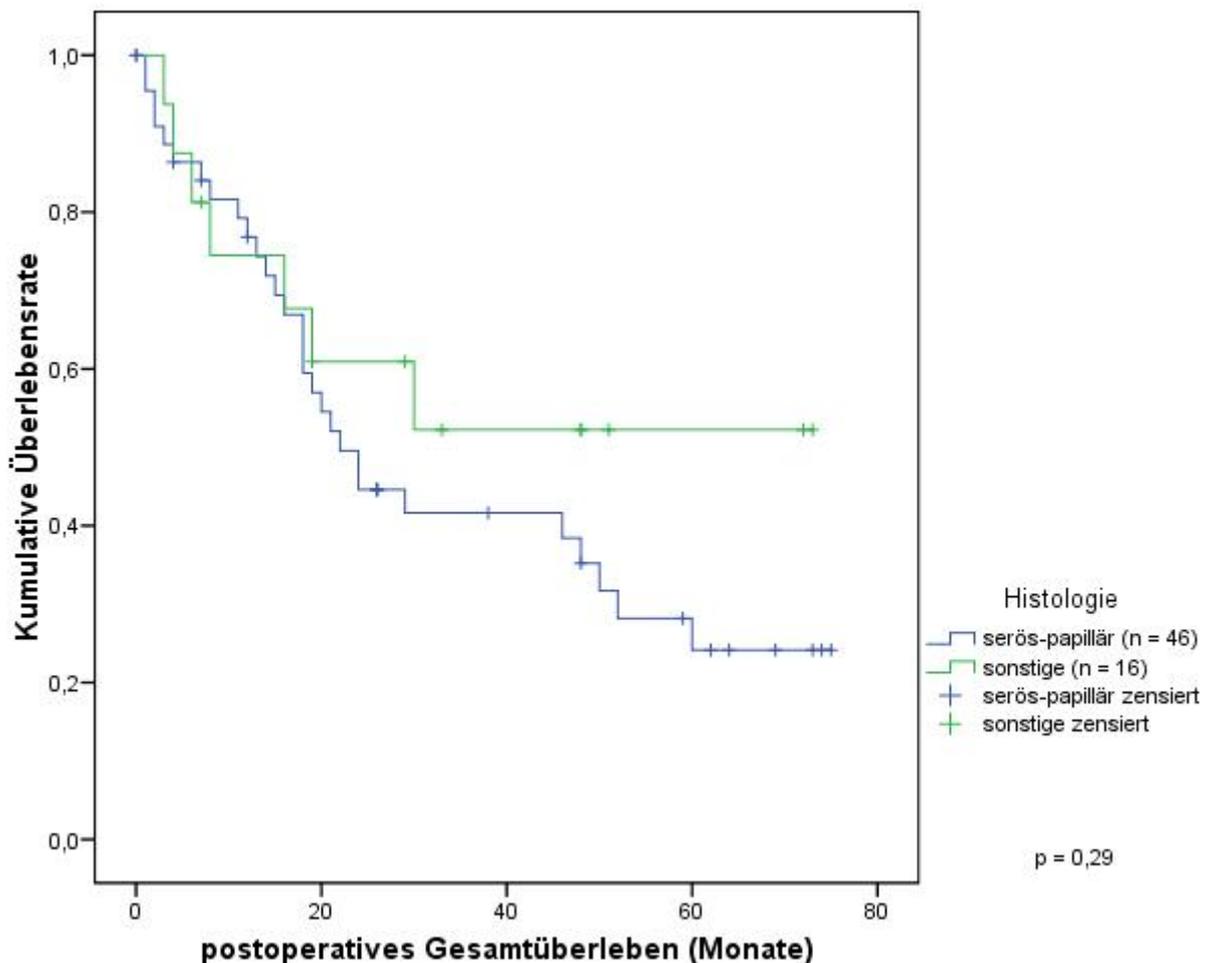


Abb. 29: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Histologie

C. 4.5 Aszites und Überleben

Im Weiteren wird der mögliche Zusammenhang zwischen der Aszitesmenge und der Überlebenszeit der Patientinnen mit Ovarialkarzinom untersucht (Abb 30).

Bei der Analyse nach Kaplan-Meier weisen Patientinnen ohne und mit weniger als 500 ml Aszites einen Überlebensvorteil gegenüber den Frauen mit mehr als 500 ml Aszitesvolumen auf. Dieses Ergebnis ist mit einem medianen Gesamtüberleben von jeweils 52 Monaten vs. 16 Monaten ebenfalls hochsignifikant, $p = 0.0001$.

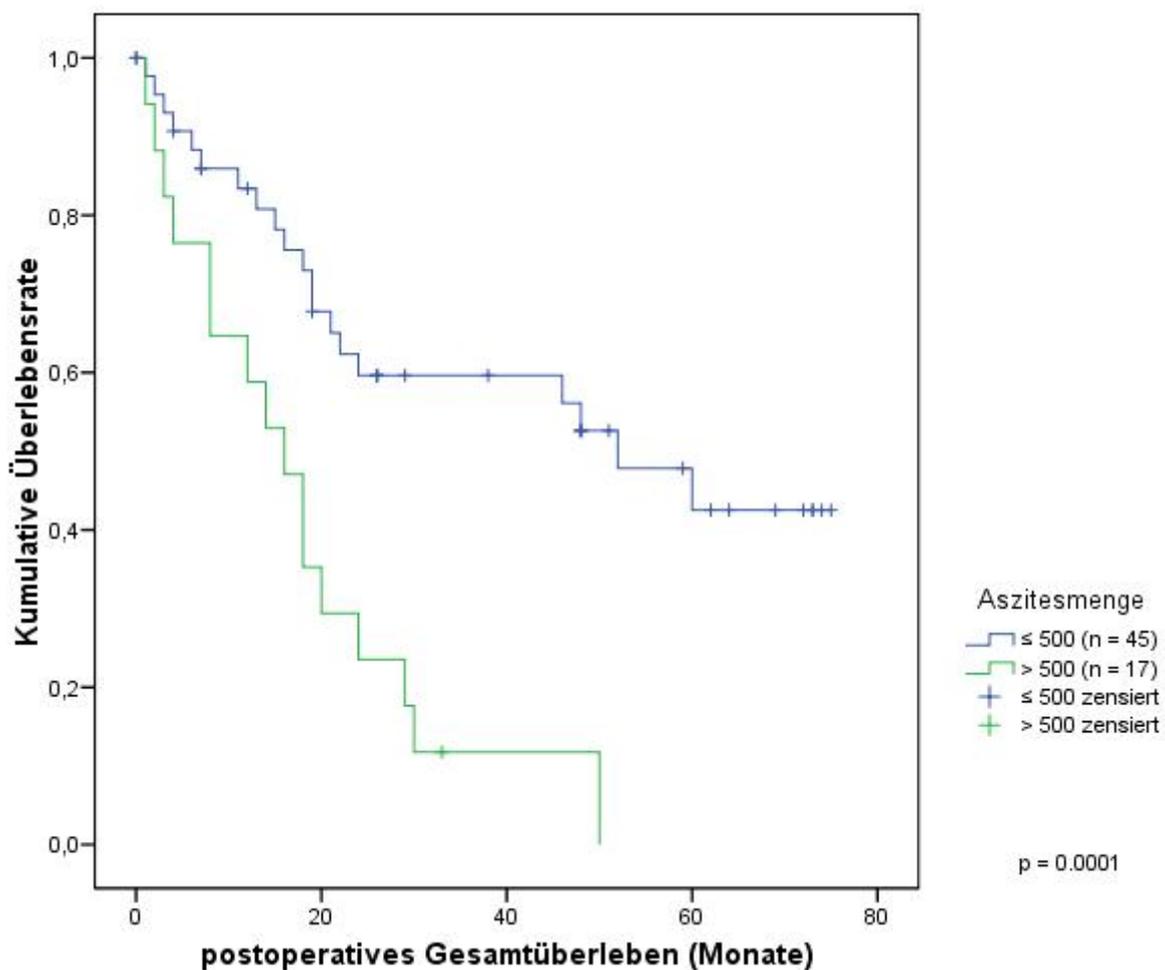


Abb. 30: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Aszitesmenge

C. 4. 6 Alter und Überleben

Wir verglichen die Überlebensrate der Patientinnen, die jünger oder 50 Jahre sind (n=22), mit dem von Frauen über 50 (n=40) und konnten keinen signifikanten Unterschied nach Überprüfung mit dem Log-Rank Test ($p = 0,12$) feststellen.

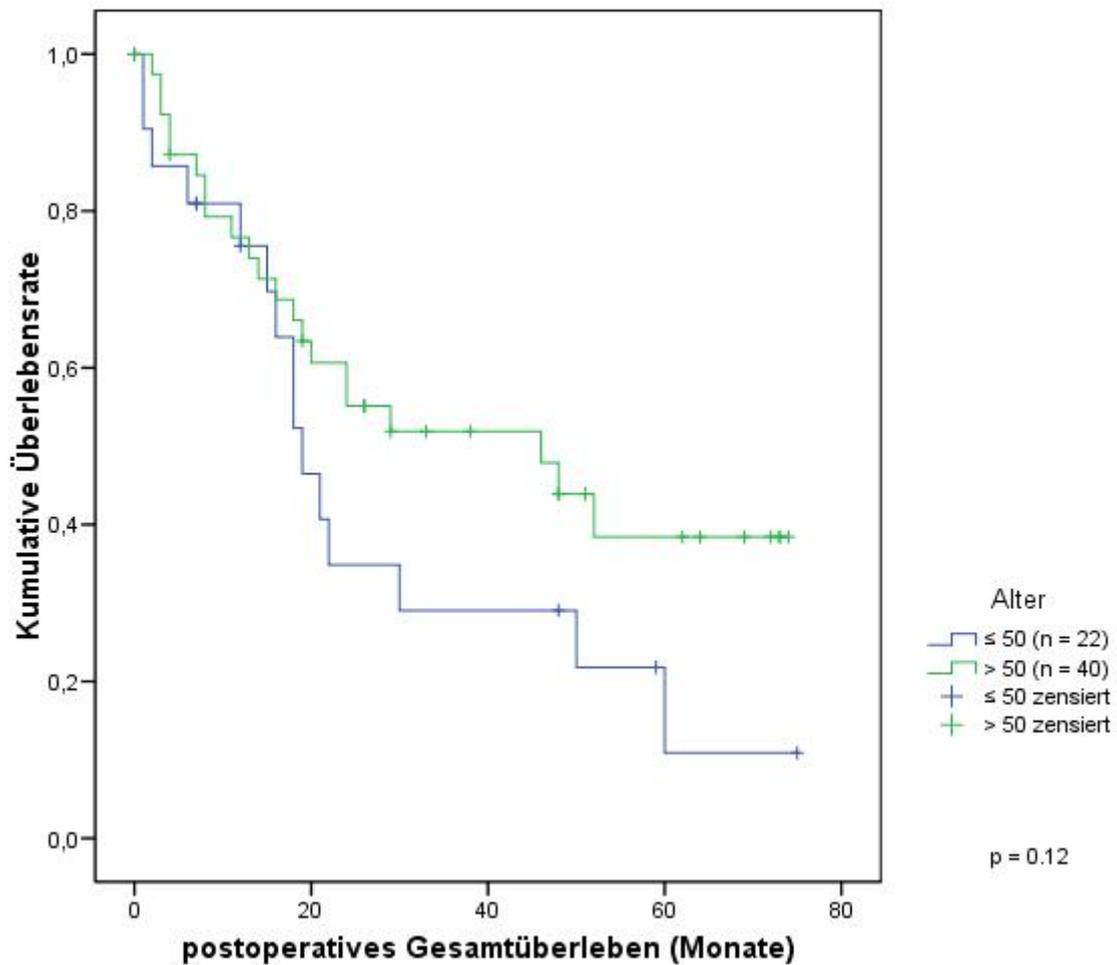


Abb. 31: Überlebenszeit und Alter

C. 4.7 TOP2A-Genamplifikation in Tumor und Stroma vs. Überlebenszeit

Im Folgenden wird die Auswertung des Zusammenhangs vom Gesamtüberleben zu der relativen TOP2A-Genamplifikation präsentiert (Abb. 32). Zur Gruppendifferenzierung dient der errechnete Medianwert für den jeweiligen Zelltyp als Schwellengrenze (*cut-off point*). Dieser liegt für die mikrodissezierten Tumorzellen bei 9,67 (relative Expression) und für die Stromazellen bei 7,76 (relative Expression). Bei der Betrachtung der Amplifikationsprofile in den mikrodissezierten Tumorzellen zeichnet sich kein signifikanter Vorteil für die Patientinnen mit einer niedrigen Expression ab ($p=0.3636$). Die Amplifikation des TOP2A-Gens in den tumorassoziierten Stromazellen zeigt keine Korrelation zu der Überlebenszeit ($p=0.2705$). Insgesamt kann die Evaluierung der Amplifikationsaktivität des TOP2A-Gens durch die TaqMan Methode keine Hinweise auf einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben der Patientinnen innerhalb der betrachteten Gruppen liefern.

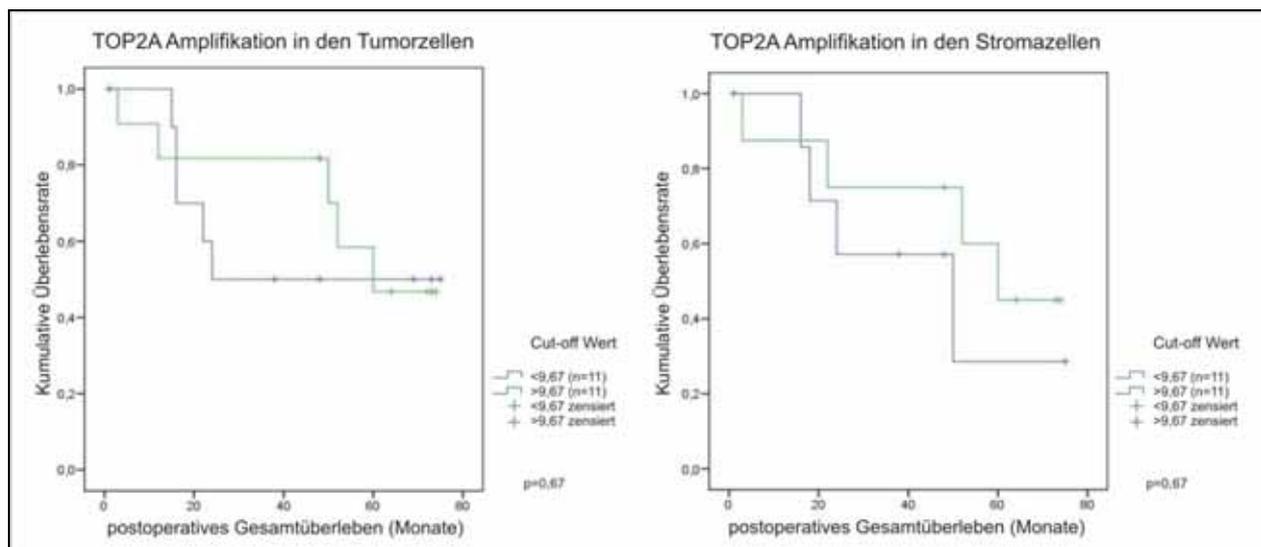


Abb. 32: Überlebenszeiten und TOP2A-Genamplifikation in den Proben der 23 mikrodissezierten Ovarialkarzinome. Für die Aufteilung nach Gruppen ist als Cut-off Wert der Median aus der relativen Expressionshöhe für das jeweilige Zelltyp ausgewählt: für die Tumorzellen liegt er bei 9,67, für die Stromazellen bei 7,76.

C. 4.8 TOP2A-Expression in Tumor und Stroma vs. Überlebenszeit

Die Auswertung der Überlebenszeitwahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der Überexpression des TOP2A-Enzyms ist auch mittels der Kaplan-Meier Methode und dem Log-Rank Test analysiert (Abb. 33). Es zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Überlebenszeit und einem positiven TOP2A-IRS-Score im Gewebe (beim Tumor und Stroma). Die mediane Überlebenszeit wird nicht von der TOP2A-Überexpression in den Tumorzellen ($p=0,91$) oder den Stromazellen beeinflusst ($p=0,6$).

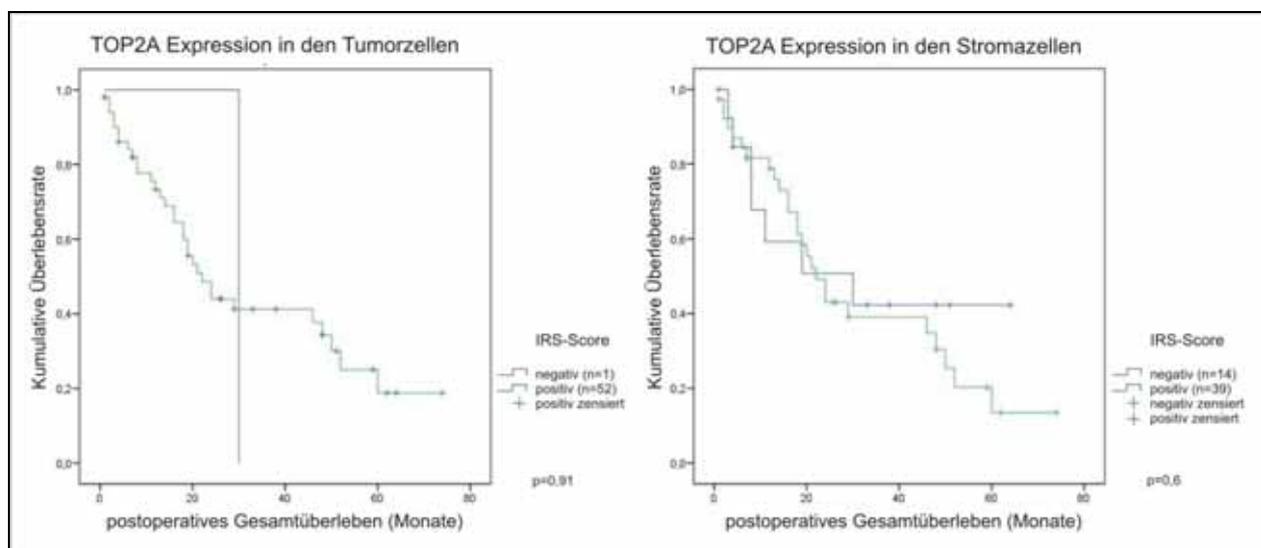


Abb. 33 Überlebenszeit und TOP2A-Enzymexpression in den Tumor- und den Stromazellen der immunhistochemisch untersuchten 53 Ovarialkarzinomen. Zur Aufteilung bei der Evaluation des Überlebens wurde der IRS-Score (positiv oder negativ) angewandt.

C. 5 Prognostische Bedeutung der klinischen und experimentellen Ergebnisse

Aus den univariaten Tests konnte nur für das postoperative Tumorrest ($p = 0.001$) und für die intraoperative Aszitesmenge ($p = 0.0001$) eine statistische Signifikanz in den Long-rank Tests der Kaplan-Meier Überlebensanalysen ermittelt werden (Tab. 15).

In den RNA-Analysen korreliert die *TOP2A*-Genamplifikation der mikrodisszierten Tumor- und Stromazellen aus der TaqMan™ RT-PCR Reihe nicht mit der Überlebenszeit der Patientinnen. Auch auf Proteinebene wird keine prognostische Bedeutung der TOP2A Überexpression der Tumor- und Stromazellen für das postoperative Überleben ermittelt.

Tabelle 15:

Univariate Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeiten nach klinischen und experimentellen Parametern (n=62)

	n	Überlebenszeit in Monate (Median)	p-Wert
Alter			
≤ 50 Jahre	22	19	p = 0,12
> 50 Jahre	40	46	
Histologie			
serös-papillär	46	22	p = 0,29
sonstige	16	nicht erreicht	
FIGO			
I und II	8	nicht erreicht	p = 0,26
III und IV	26	48	
Grading			
G1 und G2	30	22	p = 0,98
G3	32	30	
Tumorrest			
Tumorfrei	34	nicht erreicht	p = 0,001
mit Tumorrest	28	19	
Aszites			
≤ 500 ml	45	52	p = 0,0001
> 500 ml	17	16	
TOP2A Genamplifikation (TaqMan RT-PCR)			
Tumorzellen			
< 9,67	11	24	p = 0,67
≥ 9,67	11	60	
TOP2A Genamplifikation (TaqMan RT-PCR)			
Stromazellen			
< 7,76	8	50	p = 0,43
≥ 7,76	8	60	
TOP2A Expression (Immunhistochemie)			
Tumorzellen			
IRS-Score negative	1	30	p = 0,91
IRS-Score positive	52	22	
TOP2A Amplifikation (Immunhistochemie)			
Stromazellen			
IRS-Score negativ	14	30	p = 0,6
IRS-Score positiv	39	22	

In dem multivariaten Cox-Regressionsmodell werden diese Daten erneut überprüft und die Ergebnisse können für bestätigt worden. Der postoperative Tumorrest (p = 0,009) und die Aszitesmenge größer 500ml (p = 0,034) werden als unabhängige prognostische Faktoren evaluiert. Die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse zeigt Tabelle 16.

Tabelle 16:

Prognostische Bedeutung der klinischen Parameter im Cox-Regressionsmodell (n=62)

Parameter	Beta	Standard error	Relative Risk	95% CI	p-value
Aszites ≤ 500 ml > 500 ml	1,058	0,36	0,335	1,42 – 5,84	p = 0,003
Tumorrest tumorfrei mit Tumorrest	0,96	0,36	0,434	1,30 – 5,26	p = 0,007

D. Diskussion

D. 1 Einleitung zur Diskussion

Diese prospektive Studie analysiert die *TOP2A*-Expression im fortgeschrittenen Ovarialkarzinom. Das Primärziel ist die Evaluierung der differentiellen Überexpression des *TOP2A*-Gens in den Tumorzellen und den tumorassoziierten Stromazellen bei histologisch heterogenen Karzinomgewebeproben von malignen epithelialen Ovarialtumoren. Innovative molekularbiologische Methoden wie UV-Laser-Mikrodissektion, Echtzeit - Reverse - Transkriptase - Polymerasekettenreaktion, nichtradioaktive *in-situ* Hybridisierung sowie Immunhistochemie werden unter Anwendung hochspezifischer Messinstrumente, wie Intron-überspannende Primer, TaqMan-Sonden, cDNA-Sonden und monoklonalen Antikörper, gleichzeitig zu komplexen Expressionsanalysen in der Studie eingesetzt. Weiterer Fokus der Untersuchungen ist der Vergleich der zellulären Expression von *TOP2A* zwischen den Gruppen der primären und rezidierten Ovarialkarzinome und der Zusammenhang mit den wichtigsten klinisch-prognostischen Faktoren.

Im Rahmen der deskriptiven Auswertung wurden Expressionsdaten und klinische Parameter von 62 Patientinnen mit der Diagnose Ovarialkarzinom untersucht. Durch die sorgfältig konzipierten Untersuchungsreihen sind wir in der Lage, Subgruppen von Ovarialkarzinomen anhand des zellspezifischen Genexpressionsmuster zu differenzieren. Zum ersten Mal kann somit der Nachweis einer stromaspezifischen Expression des *TOP2A*-Gens beim Ovarialkarzinom erbracht werden. Wir präsentieren Ergebnisse, die ein verändertes Amplifikationsverhalten des *TOP2A*-Gens in den Stromazellen von rezidierten Ovarialkarzinomen sowie Unterschiede in der Überexpression von Tumorzellen zwischen primären und rezidierten Karzinomkrankungen erkennen lassen. Aufgrund der geringen Fallzahl und der heterogenen Zusammensetzung des Patientenkollektivs haben wir uns auf die Charakterisierung der zellulären Expressionsunterschiede konzentriert. Die Studie war nicht primär konzipiert, um einen prognostischen Zusammenhang der *TOP2A*-Überexpression mit den Überlebensdaten zu analysieren. Dennoch liefern unsere Daten qualitativ neue Erkenntnisse über zellspezifische Besonderheiten in der Molekularbiologie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms. In diesem Kontext sollen auch unsere Daten und Ergebnisse durch weitere prospektive Studien an größeren Studienkollektiven bestätigt werden.

D. 2 Diskussion der epidemiologischen Daten

In der statistischen Auswertung stellten wir einen relevanten Zusammenhang zwischen dem postoperativen Tumorrest und der Überlebenszeit fest. Der Tumorrest ist der stärkste unabhängige Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom [2, 26]. Der Erfolg der primären zytoreduktiven Chirurgie hat die stärkste prognostische Aussagekraft im Hinblick auf die Heilungschancen bzw. die Überlebenschancen einer Patientin mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom [6, 108, 109]. In unserer Studie konnte bei 55% der Operationen eine komplette R0-Resektion erreicht werden, in 29% war der Tumorrest bis max. 2 cm groß, andere 16% wiesen Tumorreste größer 2 cm auf. Makroskopisch tumorfrei operierte Patientinnen zeigten einen signifikanten Überlebensvorteil im kumulativen postoperativen Gesamtüberleben im Unterschied zu den Frauen, bei denen nur ein suboptimales Operationsergebnis (Tumorrest ≤ 2 cm oder > 2 cm) erzielt wurde. Diese Daten sind auch in der multivariaten Analyse signifikant. Die makroskopische Tumorfreiheit ist mit einem signifikanten Benefit an Überlebenszeit für unsere Patientinnen verbunden.

Das komplette Tumordebulking gehört heute als State-of-the-Art-Operation zum Goldstandard in der chirurgischen Behandlung des Ovarialkarzinoms [26]. Die operative Tumorreduktion ermöglicht eine effektive Überlebensverlängerung von Frauen mit primärem Ovarialkarzinom [6, 108]. Andererseits ist der Stellenwert der operativen Therapie bei Frauen mit Ovarialkarzinomrezidiv nicht ausreichend durch prospektive Studiendaten belegt [5, 29]. Retrospektive Daten sprechen für einen klinischen Benefit nur bei Patientinnen, die im Rahmen der Rezidivoperation tumorfrei operiert werden können [26]. Einen möglichen prädiktiven Vorhersagewert für eine erfolgreiche operative Therapie haben nach Studiendaten ein guter Allgemeinzustand, fehlender Aszites und im Rezidivfall die komplette Tumorfreiheit bei der Erstoperation. Molekulare Targets haben bisher keinen Einfluss in diesem Kontext. Auch unsere statistische Auswertung zeigte keinen Zusammenhang zwischen der *TOP2A*-Expression und dem postoperativen Tumorrest.

Wichtiger Prognosefaktor im Management des Ovarialkarzinoms ist die Stadieneinteilung [6, 26]. Diese beschreibt die Tumorausdehnung in der Primärsituation und ist nicht für die Rezidivsituation geeignet. In unserer Studie sind 82,2% der primär diagnostizierten Erkrankungen in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO III/IV). Die späte Manifestation der Erkrankung in unserem Patientinnenkollektiv ist

charakteristisch und konform mit Studien, welche bis zu 75% der Frauen zum Zeitpunkt der Diagnose mit einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium ermittelt haben [5, 6]. Das fortgeschrittene Tumorstadium korreliert mit einem kürzeren Überleben [2, 4]. In unserer Studie können wir eine günstigere Prognose für Patientinnen im FIGO-Stadium I/II gegenüber Stadium III/IV bestätigen. Frauen mit Karzinom in den Frühstadien haben einen Überlebenszeitgewinn, in der Auswertung konnte dieser Unterschied aufgrund der kleinen Patientinnenzahl aber nicht statistisch belegt werden. Diese Tendenz ist in Übereinstimmung mit Daten aus prospektiven Studienergebnissen [6, 10, 26, 110]. Auch in der Analyse der Abhängigkeit der *TOP2A*-Expression vom FIGO-Stadium haben wir keine signifikanten Zusammenhänge gefunden.

Die histologische Typisierung und das Tumorgrading nach Silverberg wurden auch im Rahmen der statistischen Analyse mituntersucht. Beide Faktoren gehören zu den etablierten histopathologischen Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom [26]. Schlecht differenzierte und undifferenzierte Tumoren sind prognostisch ungünstig und werden mit einem aggressiveren Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose assoziiert [6, 27]. Nach Auswertung der *TOP2A*-Expressionsprofile konnten unsere Daten keinen eindeutigen Aufschluss über die prognostische Bedeutung der differenziellen *TOP2A*-Expression geben. Für das postoperative Gesamtüberleben wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen schlecht und gut differenzierten Tumorproben ermittelt.

Die histologische Typisierung der Karzinomproben erfolgte leitliniengerecht nach der WHO-Klassifikation [26]. Von den invasiv epithelialen Ovarialkarzinomen sind 75-80% serös-papillär, 10% muzinös und 10% endometroid [6]. In unsere Studie sind bei Diagnosestellung 74% der Karzinome serös-papillär. Damit überwiegen auch bei unserem Patientinnenkollektiv die seröse Karzinome, entsprechend der histologischen Normalverteilung. Bezüglich der prognostischen Bedeutung der Tumorhistologie wurde in unseren Auswertungen kein Zusammenhang mit dem postoperativen Gesamtüberleben festgestellt. Zwar zeigen Tumoren mit einer muzinösen, endometroiden oder gemischten Histologie die Tendenz zu einem längeren medianen postoperativen Gesamtüberleben als die serös-papillären Gruppe, diese Differenz bleibt aber nicht statistisch signifikant. Ein Grund dafür könnte die ungleichmäßige Verteilung unter den verschiedenen Histologien sein, 46 serös-papilläre, 10 endometroide, 3 muzinöse und 3 gemischte Tumore, welche die statistische Auswertung erschwert. Diese Ergebnisse entsprechen einigen Untersuchungen, die eine bessere Prognose für Patientinnen mit muzinösen und endometroiden Tumoren, aber einer schlechteren

Prognose für seröse Tumoren ermittelt haben [25]. Histopathologisch wird allgemein eine ungünstigere Prognose der serösen und insbesondere der entdifferenzierten Karzinome von verschiedenen Autoren beschrieben [6]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nach Studiendaten für seröse Ovarialkarzinome 40-42%, für muzinöse 65-86% und für endometrioiden 53-65% [6, 27]. Aus unseren Ergebnissen konnte die Tumorphistologie nicht als prognostisch relevant bestätigt werden. Obwohl der histologische Typ ein wichtiger Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom ist [26], nimmt er einen begrenzten Stellenwert im Unterschied zum Tumorstadium und Tumorrest ein [10].

Der Aszites wird auch als ein vielversprechender Prognosefaktor für das Ovarialkarzinom diskutiert [110]. Unsere Daten bestätigen in der univariaten und der multivariaten Analyse eine unabhängige prognostische Bedeutung für den malignen Aszites. So weist eine Aszitesmenge von mehr als 500 ml ungünstigere Überlebensraten auf und prädisponiert die negative prognostische Bedeutung, vermutlich aufgrund einer aggressiveren Tumorbiologie. Auch andere Studien deuten auf die schlechtere Prognose von Frauen mit fortgeschrittener Erkrankung und größeren Aszitesmengen hin [28, 29]. Nach dem FIGO-Staging findet man Aszites bereits in den frühen Stadien Ic und IIc, ebenso wie in den fortgeschrittenen Stadien III und IV. Daten zeigen, dass es in etwa 50% der Fälle aller Stadien zur Ausschwämmung malignen Zellmaterial in die Peritonealflüssigkeit gekommen ist. Dadurch zeigt sich bei der Erstdiagnose, aber auch im Rezidiv durch die Zunahme der extrapelvinen Ausbreitung, in einer Mehrzahl der Patientinnen ein maligner Aszites [5, 110]. Diese Tatsache bedeutet für die Patientinnen eine entscheidende Verschlechterung der Prognose von ca. 80% bei FIGO-Stadium I auf 25% bzw. 5% in FIGO III und IV [6, 25]. Scheinbar liegt die prognostisch bedeutsame Grenze für das Überleben bei 500 ml Aszites [4, 29]. Eisenkop ermittelte ein signifikant günstigeres Überleben unter Patientinnen mit Aszitesvolumen kleiner 1 l gegenüber Frauen mit größeren Aszitesmengen [111]. Ähnliche Zusammenhänge werden auch in einer prospektiven, multizentrischen Auswertung an Patientinnen in der Rezidivsituation beschrieben [29]. Hier erweiste sich ein geringeres Aszitesvolumen als prognostisch begünstigend für das Erreichen einer makroskopischen Tumorfreiheit bei einer Rezidivlaparotomie.

Entsprechend dem durchschnittlichen Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines Ovarialkarzinoms betrifft diese Erkrankung hauptsächlich Frauen im Klimakterium und nach der Menopause [1, 6]. In der untersuchten

Studiengruppe liegt das mediane Alter der Karzinompatientinnen zum Zeitpunkt der Gewebeasservierung (Einschluss in die Studie) bei 55 Jahren und zeigt eine repräsentative Zusammensetzung unseres Patientinnenkollektivs. Beim Vergleich zwischen Patientinnen mit primären und rezidierten Karzinom zeigte sich, dass Frauen, die wegen einer Rezidiverkrankung operiert wurden, in einem jüngeren Alter mit 50,5 Jahren (Median) erkrankten. In mehreren GOG-Studien wird der unabhängige prognostische Wert des Alters auf das Überleben belegt [10, 26]. In der statistischen Auswertung der Kaplan-Meier-Analysen zeigen ältere Patientinnen ein längeres medianes Gesamtüberleben im Vergleich zu Frauen ≤ 50 Jahre. Anders als unsere Ergebnisse weisen Studien auf das signifikant längere Gesamtüberleben jüngerer Patientinnen im Vergleich zu älteren Frauen hin [2, 8]. Dieser Unterschied wird z. T. auf die höhere Inzidenz ovarieller Frühkarzinome FIGO I/II unter jungen Patientinnen zurückgeführt. Unsere Studie konnte keinen prognostischen Einfluss des Alters auf die Überlebenszeit zeigen, bei einem kleinen Untersuchungskollektiv. Auch bei der Analyse hinsichtlich einer Altersabhängigkeit der *TOP2A*-Überexpression lassen sich keine signifikanten Überlebensunterschiede feststellen.

D.3 Intrazellulärer Nachweis der *TOP2A*-mRNA beim Ovarialkarzinom

Die *TOP2A*-mRNA Amplifikation wird mittels *in-situ* Hybridisierung in den Tumor- und Stromazellen von 13 primären und rezidierten Ovarialkarzinomen, 2 Zystadenomen und 2 Normalgewebeproben evaluiert und differentiell nachgewiesen. Die Datenlage zur Genamplifikation der Topoisomerasen auf mRNA-Ebene ist sehr limitiert. Allgemein wurde die Überexpression der *TOP2A*-mRNA bei verschiedenen soliden Tumoren über RNA-Sensitivitätsassays, PCR oder Immunoblotting nachgewiesen [46, 112, 113]. Auch die Analysen zur *TOP2A*-mRNA Amplifikation beim Ovarialkarzinom sind begrenzt [38, 43, 74, 80-82].

Die RNA-Evaluation über den *in-situ* Hybridisierungsverfahren ermöglicht einen hochsensitiven Nachweis des Gentranskripts. Deshalb haben wir die Methode ausgewählt, um die gewebespezifische Validierung der *TOP2A*-mRNA Amplifikation zu analysieren. In der Tat bestätigte sich die spezifische mRNA-Amplifikation des *TOP2A*-Gens im untersuchten Ovarialkarzinomset. Die *TOP2A*-Expression wurde beim Mammakarzinom und anderen soliden Tumoren auch mittels *in-situ* Hybridisierung untersucht [40, 114, 115]. Auch die Hinweise über einen Zusammenhang zwischen der

TOP2A- und der *ERBB2*-Genamplifikation sind vielfältig [45, 46, 79]. Klinische Relevanz hat die Kombination von *TOP2A* mit dem HercepTest® für FISH - basierte Screeninguntersuchungen von Genaberrationen. Besonders wichtig für den klinischen Alltag erscheint die Koexpression des *TOP2A*- und *ERBB2*-Gens in Bezug auf die Chemosensitivitätsänderung zu zytotoxischen Substanzen wie Doxorubicin [40, 116]. Dadurch ist die Identifikation von z. B. Subgruppen von Patientinnen mit Hochrisiko - Mammakarzinomen, welche ein individualisiertes Ansprechen auf die Anthrazyklinbehandlung erfordern, möglich [117, 118]. Entsprechende Daten zur *TOP2A*-mRNA-Amplifikation beim Ovarialkarzinom mittels *in-situ* Hybridisierung und deren klinisch-prognostische Bedeutung konnten in keiner der großen Studiendatenbanken (Pubmed und Cochrane) gefunden werden, sind aber aus monozentrischen, retrospektiven Analysen bekannt [22, 40, 44].

Noch weniger Daten sind in der Literatur zur zellspezifischen Expression des *TOP2*-Gens bekannt [33, 61, 62, 70, 84]. In unserer Studie wird eindeutig die Überexpression der *TOP2A*-mRNA in den Tumorzellen der untersuchten Karzinomproben bestätigt. Ein positives, wenn auch deutlich schwächeres Amplifikationssignal der *TOP2A*-mRNA ist in den tumorassoziierten Stromazellen nachzuweisen. Diese Resultate sind für beide Zellarten bei den primären und rezidierten Ovarialkarzinomen erhoben. Entsprechend hohe mRNA-Levels von *TOP2A* sind meistens in stark proliferierenden Zellen und Geweben [62] oder auch soliden Tumoren [68, 79] bekannt. Bisher ist aber kaum etwas über das zelluläre Amplifikationsmuster des *TOP2A*-Gens bekannt [22, 40, 44].

Unsere Daten belegen *in-situ* die differentielle *TOP2A*-mRNA-Amplifikation in den Zellen von heterogenen Ovarialkarzinomen. Die Genamplifikation von *TOP2A* ist signifikant abfallend in der Reihenfolge Karzinomzellen, tumorassoziiertes Stroma, Zystadenomepithelien, Normalepithelien und Stroma des Ovars. Dieser Amplifikationsabfall weist auf die veränderte Proliferation des Karzinomgewebes im Laufe der Tumorpheriferation und Metastasierung hin. *TOP2A*-mRNA ist schließlich eng mit der Zellproliferation assoziiert und am höchsten in der S-Phase und dem Übergang zur G2/M-Phase anzutreffen [84].

Die Auswertung zeigt zudem relevante Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen der primären und rezidierten Karzinome. So besitzen Tumorzellen von chemotherapie-naiven Frauen einen höheren Gehalt an *TOP2A*-mRNA. Die *TOP2A*-Genamplifikation in den Karzinomzellen der Rezidivproben war abfallend. Ähnliche Daten zu einem Amplifikations- und Aktivitätsverlust der *TOP2A* in Abhängigkeit von der Vorbe-

handlung und dem Responsestatus mit Abfall in der Rezidivsituation sind mehrmals evaluiert worden [74]. Die Auswertung für das Stroma zeigte keine Unterschiede der *TOP2A*-Genamplifikation in Bezug auf den Behandlungsstatus der Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Hiermit konnten wir die ersten Daten zum zellulären Nachweis von *TOP2A*-mRNA in Tumor- und Stromazellen beim Ovarialkarzinom liefern.

D.4 Differentielle *TOP2A*-Genamplifikation in Tumor- und Stromazellen

Nach der Validierung der differentiellen *TOP2A*-Expression durch die *in-situ* Hybridisierungsreihe erfolgte im weiteren Schritt die lasergestützte Mikrodisektion mit einer quantitativen Auswertung der RNA-Amplifikation über TaqMan RT-PCR. Dafür wurde ein größeres Untersuchungsset von 23 Patientinnen mit Ovarialkarzinom ausgewählt. Wir konnten durch Mikrodisektion nach Visualisierung und Markierung nur ausgewählte Gewebeareale aus „reinen“ Fraktionen von Tumorzellen und Stromazellen gewinnen. Ein ähnliches Vorgehen ist beim Ovarialkarzinom bisher nicht beschrieben. Alle uns bekannte Expressionsstudien verwendeten für die PCR-Analyse den ganzen „unbearbeiteten“ Tumorblock, wodurch bei Gewebheterogenität eine Kontamination mit nicht malignen Zellen und eine Verzerrung der Amplifikationsergebnisse resultieren kann [119]. Das ist deswegen bedeutungsvoll, da die TaqMan® - PCR eine hochpräzise Quantifizierung von kleinen Mengen genomischer DNA ermöglicht [120]. Die Kombination der hochsensitiven quantitativen Real Time-PCR mit der Präzision der Mikrodisektion stellt eine optimale Voraussetzung zur Analyse der genetischen Expression in morphologisch heterogenen Tumorproben dar [119, 121]. Wir isolierten durch lasergestützte Mikrodisektion reine Zellpopulationen von Tumor und assoziiertem Stroma problemlos, unter deutlicher Reduktion der Gewebekontamination in den Lysaten. Aufgrund der biologischen Heterogenität der Ovarialtumoren stellt der methodische Einsatz der Mikrodisektion eine machbare und präzise Möglichkeit für Expressionsanalysen an Ovarialkarzinomproben dar.

Die Überexpression von *TOP2A* ist meist für stark proliferierende Zellen und Geweben sowie für diverse Malignome typisch [46, 81, 113]. Die Daten zum Ovarialkarzinom sind bezüglich des PCR-Nachweises trotzdem sehr limitiert, wobei in den Studien keine explizite Auswertung der differentiellen *TOP2A*-Expression zwischen Tumor und Stromazellen vorgenommen wurde. Wir konnten sowohl aus den mikrodisezierten Tumorzellen als auch aus den tumorassoziierten Stromazellen die *TOP2A*-mRNA

isolieren und amplifizieren. Dabei zeigte die gewonnene Gesamt-mRNA keinen wesentlichen Unterschied in der Qualität. Zur Auswertung wurden jedoch nur Proben nach Vergleich mit GAPDH als internen Standard zugelassen.

Die Überexpression der zellulären *TOP2A*-mRNA wurde von uns in beiden analysierten Zellgruppen, Tumorzellen und tumor-assoziierte Stromazellen, nachgewiesen. Insgesamt zeigten die Tumorzellen eine signifikant stärkere Amplifikation der *TOP2A*-mRNA als die Stromazellen. Neu ist hier die signifikante Erhöhung der Amplifikation von *TOP2A*-mRNA in dem Stroma. Für die phänotypischen und biologischen Eigenschaften der Ovarialkarzinome spielt die hohe Proliferationsaktivität der Karzinomzellen, meist Resultat genomischer Aberrationen und veränderter molekularer Signalwegen, eine ausschlaggebende Rolle, die Bedeutung des Stromas ist unklar [15, 122]. Unsere Daten weisen eine erhöhte Proliferationsaktivität auch in dem Stroma auf. Möglicherweise sind hier Zeichen für aktive interzelluläre Wechselwirkungen und Beteiligung der extrazellulären Matrix sichtbar. Studien zufolge wird auch den Fibroblasten ein tumorigenes Potential zugeschrieben [53, 57, 123]. So konnte im Prostatakarzinommodell zwischen den Fibroblasten und der Initiierung tumorigener Stimuli in den Epithelzellen eine Assoziation gezeigt werden [49]. Ein Mammakarzinom-Modell postuliert die mehrstufige Initiierung der Karzinogenese, wobei hier primär genetische Veränderungen an den Epithelien mit anschließenden LOH-Aberrationen im Stroma assoziieren [56]. Für die Tumorgenese des Ovarialkarzinoms werden als wesentliche Eckpunkte multiple Genomaberrationen identifiziert [10, 14]. Aus LOH-Analysen bei Ovarialtumoren wird die höchste Rate an Veränderungen in den Chromosomenbereichen 17p und 17q (62% und 56%) ermittelt [124]. Topographisch ist *TOP2A* auf 17q lokalisiert. Ihre mögliche Beteiligung an mehreren Signalübertragungswegen wird kontrovers diskutiert [125, 126], obwohl der Genexpression keine direkte tumorigene Potenz zugeschrieben wird [62, 63]. Analysen zur *TOP2A* Expression im Stroma und zu den zellulären Wechselwirkungen beim Ovarialkarzinom sind nach Literaturrecherchen nicht publiziert.

In der detaillierten Auswertung unserer Daten wurden deutliche Unterschiede zwischen den Patientinnengruppen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung (Chemotherapie-naiv und platinhaltige Vortherapie) erkennbar. Die Gewebeproben der Patientinnen mit rezidivierter Erkrankung (nach Platin-Chemotherapie) zeigten eine signifikant höhere Amplifikation des *TOP2A*-Gens besonders im Stroma. Bei chemotherapie-naiven Frauen war die *TOP2A*-Amplifikation wesentlich schwächer nachweisbar. Andererseits

weist die *TOP2A*-mRNA Amplifikation innerhalb der Tumorzellen in der Subgruppenanalyse deutliche Unterschiede auf. Bei Frauen in der Primärerkrankungssituation zeigten sich stärkere Amplifikationshöhen für die Gesamt-mRNA als unter den Patientinnen mit rezidivierter Erkrankung nach adjuvanter Chemotherapie. Diese Ergebnisse repräsentieren einen Chemotherapie-bedingten Aktivitätsverlust der Genaktivität von *TOP2A* wie schon aus anderen Studien bekannt [39, 74]. In primären Ovarialkarzinomen zeigten die Tumorzellen höchste *TOP2A*-Amplifikationsraten, im Stroma waren weniger Fibroblasten aktiv. Bei Patientinnen mit rezidivierter Erkrankung wurden Veränderungen in der genomischen Aktivität mit signifikantem Anstieg der Transkription der *TOP2A*-mRNA in Tumorzellen und im assoziierten Stroma festgestellt. Die Überexpression der *TOP2A*-mRNA ist beim Ovarialkarzinom mehrfach belegt [74, 80, 81]. Analysen an Chemotherapie-naiven Frauen zeigen sehr heterogene Ergebnisse. Die starke *TOP2A*-Amplifikation auf dem RNA-Level korreliert mit der Proteinüberexpression und ist ein Hinweis auf die zytostatische Bedeutung des *TOP2A*-Gens beim Ovarialkarzinom [81]. Andere Autoren beschreiben ebenfalls eine signifikante Überexpression der *TOP2A*-mRNA im Tumor im Vergleich zu benignem und Normalgewebe und eine Korrelation zum Chemotherapieansprechen. Das zytostatische Potenzial von Topoisomerase-Targets hängt von der Expressionshöhe ab, wobei die Überexpression in platin sensiblen Tumoren aus einer höheren Proliferationsaktivität des Gewebes resultiert [74]. Die schwache *TOP2A* Expression in benignen und normalen Gewebeproben wird unter anderem mit der Mehrzahl von Stromazellen in diesen Geweben erklärt, eine detaillierte Evaluation zur zellspezifischen Expression ist allerdings in dieser Arbeit nicht erfolgt [74]. Eine weitere Studiengruppe beschreibt einen Anstieg der *TOP2A*-Aktivität in primären Karzinomen, nach platinhaltiger Therapie in der Rezidivsituation fällt die Enzymaktivität ab [75].

Auch mittels PCR sind keine detaillierten Analysen zur *TOP2A*-mRNA-Amplifikation bei mikrodissezierten Ovarialkarzinomproben veröffentlicht. Die Kombination aus lasergestützter Mikrodissektion und der TaqMan Real-Time PCR scheint für uns eine machbare und sehr wichtige Methode zur Gewebeanalyse von Ovarialkarzinomen darzustellen. Durch dieses Vorgehen lässt sich eine sehr genaue Analyse des zellspezifischen Amplifikationsverhaltens des *TOP2A*-Gens vornehmen. Neben der Bestätigung der *TOP2A*-mRNA im Stroma konnten wir auch differentielle Veränderungen der Amplifikationsaktivität des *TOP2A*-Gens in Abhängigkeit von dem Erkrankungsstatus erkennen. Möglicherweise lassen sich damit an Studien mit einem

größeren Gewebeset Subpopulationen von Ovarialkarzinomen mit verändertem Chemosensitivitätsverhalten identifizieren.

D. 5 Differentielle TOP2A-Proteinexpression in Tumor und Stromazellen

Die zelluläre Evaluation der TOP2A-Proteinexpression wurde im nächsten Schritt der Studienuntersuchungen analysiert. Die Immunhistochemie wurde als häufig eingesetzte Methode zur histopathologischen Gewebeevaluation, mit höher Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von Genprodukten auf Proteinebene, ausgewählt [60]. Wir untersuchten die TOP2A an Gewebeproben von 53 Patientinnen mit Ovarialkarzinom unter dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern. Das TOP2A-Enzym ist mit dieser Standardmethode in diversen soliden Tumoren mehrmals analysiert worden [76, 79, 87, 127, 128]. Die Überexpression der TOP2A im Tumor verglichen zu Normalgewebe korreliert häufig mit einer aggressiveren Tumorbiologie [87] und bedingt eine stärkere Chemosensitivität der Tumoren, bedingt durch die hohe Anzahl proliferationsaktiver Zellen [71, 72, 76, 86, 127]. Auch Hinweise über einen Zusammenhang zwischen Höhe der zellulären Expression von TOP2A und Chemosensitivität sind bekannt [129]. So korreliert ein Abfall in der Expressionstärke von TOP2A mit der Resistenzentwicklung zur Zytostatika [130]. Trotzdem ist die Expressionshöhe nicht mit dem Ansprechen zur Chemotherapie korrelierbar [131]. Auch zwischen der Proteinüberexpression und der TOP2A-Enzymaktivität besteht kein direkter Zusammenhang [82]. In Ovarialtumoren wird die TOP2A Überexpression ebenfalls mit dem Ansprechen zur Chemotherapie [74, 81] sowie mit einem aggressiveren Tumorcharakter [38, 43, 83] und einer schlechteren Überlebensprognose assoziiert [33]. Die alleinige Evaluation der TOP2A-Expression scheint keine prognostische Bedeutung beim Ovarialkarzinom zu spielen und macht wenig Sinn in der Routine [18, 26]. Vielmehr konzentriert sich die klinische Forschung auf den Bezug der Koexpression von TOP2A und ERBB2 zum Therapieansprechen [38, 40, 44].

Das TOP2A-Enzym konnten wir auch in unserer Studie mit einer Überexpression nachweisen. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sowohl in den Karzinomzellen wie auch in den tumorassoziierten Stromazellen die Expression von TOP2A immunhistochemisch nachweisbar ist. Dieses Ergebnis stellt einen neuen Aspekt für das Expressionsverhalten des tumorassoziierten Stromas beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom dar. Beide Zelltypen exprimieren TOP2A signifikant stärker als im

Normalovar. Dabei zeigen die Tumorzellen meistens einen höheren Expressionslevel als die Fibroblasten im Tumorstroma. Diese zelltypischen Unterschiede wurden z. T. statistisch evaluiert, dürfen aber relevante zellbiologische Prozesse reflektieren.

Auch hier weisen Tumorzellen von platin-naiven Patientinnen eine stärkere TOP2A-Überexpression auf, welche unter den platin-vorbehandelten Frauen mit rezidivierter Erkrankung deutlich schwächer wird. Diese Beobachtung wurde, wie erwähnt, auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [74, 75]. So soll der Abfall der Expressionsstärke Hinweis auf eine Resistenzentwicklung geben und korreliert mit einem aggressiven Tumorwachstum [82]. Bei dem Stroma beobachten wir nach zytostatischer Platin-Vorbehandlung unter Frauen mit Rezidiv einen deutlichen Expressionsanstieg. Diese Umwandlung der TOP2A-Expression resultiert möglicherweise als Ergebnis der pathobiologischen Prozesse verantwortlich für die Resistenzentwicklung. Unsere immunhistochemischen Ergebnisse stimmen mit den Daten der mRNA-Amplifikationsanalysen überein und können sowohl in den Tumorzellen als auch in dem tumorassoziierten Stroma als Veränderung der Expressionlevel nachgewiesen werden.

D. 6 Interpretation der zellulären Differentialexpression von *TOP2A* beim Ovarialkarzinom

Die systematische Genexpressionsanalyse im Rahmen dieser prospektiven Studie präsentiert statistisch signifikante Unterschiede in der zellulären Expression des *TOP2A*-Gens. Die Daten bestätigen eine Genamplifikation und eine Proteinexpression in beiden untersuchten Zelltypen: Karzinomzellen und tumorassoziiertes Stroma. Insgesamt sind die *TOP2A*-mRNA und das TOP2A-Enzym stärker im Tumor als im benachbarten Stroma nachweisbar. Aus weiteren Studien ist bekannt, dass TOP2A meist in stark proliferierenden Gewebearealen mit vielen Zellen in der S/G2/M Phase des Zellzyklus identifizierbar ist [88]. Aus diesem Grund wird die TOP2A als ein vielversprechender Proliferationsmarker in soliden Tumoren angesehen [33, 65, 76, 77]. Immunhistochemische Studien identifizierten die TOP2A meist im Zellkern und in geringerem Maße im Zytoplasma, entsprechend der physiologischen Rolle des Enzyms [70]. Diese Arbeiten beschränkten sich auf die Auswertung der Tumorzellen, die Expression im Stroma wurde nicht analysiert. Unsere Studie liefert eine erste systematische Charakterisierung des Amplifikations- und Expressionsverhaltens der TOP2A auf mRNA- und Proteinebene.

Ferner wird das spezifische Verhalten der TOP2A Expression in Bezug auf eine Platinbasierten Chemotherapie evaluiert. Die Platinresistenz stellt weiterhin ein ungelöstes Problem beim Management des Ovarialkarzinoms dar [30]. In der Auswertung fanden wir relevante Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen der primären und rezidierten Karzinome. So zeigten Tumorzellen von chemotherapie-naiven Frauen einen höheren *TOP2A*-mRNA-Gehalt und stärkere Enzymexpression. Die *TOP2A*-Genamplifikation in der Rezidivsituation schien weniger aktiv und zeigte abfallende Tendenz. Bei Frauen mit rezidiertem Karzinom, nach platinhaltiger Chemotherapie in der Anamnese, nahmen die Amplifikation der *TOP2A*-mRNA und die Proteinüberexpression deutlich ab. Auch andere Arbeitsgruppen haben einen Amplifikations- und Aktivitätsverlust der TOP2A in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und dem Remissionsstatus mit Abfall in der Rezidivsituation evaluiert [74, 82]. Im tumorassoziierten Stroma zeichnet sich ein teils inhomogenes Bild mit deutlicher TOP2A-Überexpression ab. Die initial schwächere Überexpression der TOP2A in den Fibroblasten von Patientinnen mit primärem Karzinom wurde von z. T. kräftigeren Expressionsausschlägen im Stroma von Frauen nach platinhaltiger Chemotherapie gekennzeichnet. Diese Unterschiede wurden statistisch evaluiert. Bei den Auswertungen nach den Überlebenszeiten zeigte sich, wie von anderen Autoren berichtet, kein Zusammenhang der TOP2A-Überexpression mit der Erkrankungsprognose [18]. In der uni- und multivariaten Analyse ließ sich nur der Aszitesnachweis über 500 ml und der makroskopische Tumorrest als prognostisch ungünstig für das Gesamtüberleben identifizieren.

Quantitative Veränderungen in der *TOP2A*- Amplifikation sind bisher nur in Bezug auf die *ERBB2*-Amplifikation interessant, für den klinischen Einsatz dieser Targets fehlen große randomisierte Studien. Besonders problematisch für die Behandlung des rezidierten Ovarialkarzinoms ist die erworbene Platinresistenz [2, 3, 26]. Der Einsatz von anthrazyklinhaltigen Monotherapieregimen könnte bei einem möglichen Anstieg/Abfall der Sensitivität zu TOP2A-Inhibitoren wie Doxorubicin, wie bei Mammakarzinom schon beschrieben, bedeutsame therapeutische Konsequenzen haben [40]. Hier besitzt die Bestimmung der *TOP2A*-Amplifikationsstärke deshalb eine prädiktive Bedeutung [22, 44, 87]. Ebengleich bekannt ist der negative prognostische Einfluss der Überexpression von *TOP2A*-mRNA auf das Überleben [38, 43]. In diesem Kontext unterstreichen unsere Ergebnisse die Notwendigkeit von weiteren detaillierten zell- und gewebespezifischen *TOP2A*-mRNA-Analysen und weisen erneut auf die

schwierige Interpretation expressionsanalytischer Daten im biologisch heterogenen Ovarialkarzinomgewebe hin.

Der weitere Fokus unserer Arbeit richtete sich auf die Analyse der Stromalen Expression von TOP2A. Aus biologischer Sicht stellen Stromale Veränderungen, neben DNA-Mutationen und zellulären Dysfunktionen, ein wichtiger Faktor in der Entstehung und Entwicklung maligner Entartungen dar [57]. Aus der Literatur ist bekannt, wie wichtig Stromafibroblasten für die Tumorigenese sind, vor allem durch deren Auswirkungen auf Reparaturmechanismen, EGF-Faktoren und Modulation zellulärer Signaltransduktionswege [122, 132, 133]. Neue Daten bestätigen, dass Stromazellen über verschiedene Faktoren wie beispielsweise Stromelysin-1, PDGF, ionisierende Strahlen, eine Aktivitätssteigerung und Unterstützung der Tumorprogression bewirken können [51, 52, 58, 134, 135]. Unter den komplexen Tumor-Stroma-Interaktionen ist die Induktion von „reaktivem tumor-assoziierten Stroma“ durch freigesetzte Zytokine aus der Invasionsfront und Aktivierung über die Signaltransduktion bekannt. Im weiteren Verlauf der Karzinogenese generiert dieses Stromakompartiment dauerhafte Signale für das Tumorwachstum [122, 132, 133]. Bingham postulierte sogar die Hypothese vom „Ovarialkarzinom-anfälligen Gewebephänotyp“. Als Basis dienten Beobachtungen an Gewebeproben von Frauen mit genetischem Risiko für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms [13]. Er beschrieb einige histologische Besonderheiten des ovariellen Gewebes, wie Pseudostratifizierung des Oberflächenepitheliums, ovarielle Papillomatose, tiefe kortikale Invaginationen mit epithelialen Zysten sowie einen Anstieg der Stromalen Aktivität, alles Faktoren, die auf ein Hochrisiko - Entartungspotenzial vom Stromagewebe hindeuten. Unsere Expressionsergebnisse spiegeln auf RNA- und auf Proteinebene vermutlich ähnliche Veränderungen wieder, die auch als Ergebnis einer resultierenden Aktivierung des Stromas in den benachbarten Bereichen von der stark proliferationsaktiven Tumorinvasionsfront interpretiert werden können.

Aus klinischer Sicht könnten unsere Daten unterschiedliche Effekte einer platinbasierten Chemotherapie auf die Zellbiologie widerspiegeln. Unsere Ergebnisse stimmen mit diversen Daten zur TOP2A-Überexpression im Ovarialkarzinom überein. Die prognostische Bedeutung dieser Überexpression wird von mehreren Arbeitsgruppen unterschiedlich gewertet [38, 45, 46, 74]. Diese wird meistens mit einer höheren Aggressivität und insgesamt schlechteren Erkrankungsprognose assoziiert [43, 45]. Scheinbar existiert kein direkter Zusammenhang zwischen der TOP2A Überexpression auf mRNA- und Proteinebene und der Enzymaktivität [39, 81, 82]. Da die Topo-

isomerasen wichtige Targetmoleküle von klinisch relevanten Zytostatika darstellen, wird die Bedeutung der TOP2A auch in diesem Kontext analysiert [85, 90]. In der Literatur postulierten mehrere Studien eine mögliche Bedeutung des *TOP2A*-Gens bei der Resistenzentwicklung gegenüber zytostatischer Substanzen [34, 38, 58, 136]. TOP2A scheint als wesentlicher Kofaktor für die Entwicklung einer Multidrug-Resistenz zu agieren [62, 80]. Wie schon erwähnt, existieren Daten zum Zusammenhang zwischen der Chemosensitivitätentwicklung und der gleichzeitigen Koexpression von TOP2A nicht nur zu ERBB2, aber auch p53 oder Ki-67. Hieraus wird die prädiktive Vorhersagekraft der TOP2A für das Chemotherapieansprechen postuliert [33, 43, 62, 80, 137]. Unsere Ergebnisse zur differentiellen TOP2A-Überexpression im tumorassoziierten Ovarialstroma belegen und reflektieren den Expressionsnachweis im Rahmen von komplexen zellulären Wechselwirkungen. Um die prognostische und prädiktive Bedeutung zu evaluieren, sind weit größere Studien erforderlich.

D.7 Interpretation der klinischen und experimentellen Daten hinsichtlich des Überlebens

Primärziel unserer prospektiven Studie war die Identifikation, Charakterisierung und Analyse der zellulären Expression des *TOP2A*-Gens auf Molekularebene. In der Auswertung der klinisch-pathologischen Faktoren betrug das mediane postoperative Gesamtüberleben für alle untersuchten Patientinnen 22 Monate. Dieses Ergebnis lag deutlich unter der medianen Lebenserwartung von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovariakarzinom, die von verschiedenen Autoren zwischen 32 und 40 Monaten angegeben wird [2, 6]. Ein Grund für diese Diskrepanz liegt in dem verhältnismäßig kurzen Nachbeobachtungsintervall von 37,5 Monaten (Median).

In den univariaten Analysen der Überlebenszeiten sind hinsichtlich einer prognostischen Bedeutung der differentiellen Expression des *TOP2A* keine signifikanten Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit ermittelbar. Auch in Bezug auf die tendentiell unterschiedliche Amplifikation und Expression des *TOP2A*-Gens ließen sich keine relevanten Zusammenhänge mit dem Gesamtüberleben erfassen. Nur der Aszitesnachweis über 500 ml und der makroskopische Tumorrest wurden als prognostisch ungünstig identifiziert. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse. Heutzutage stellt das optimale Tumordebulking den stärksten unabhängigen Prognosefaktor bezüglich der Langzeitprognose von

Patientinnen mit Ovarialkarzinom dar [7, 26]. Der Nachweis von Aszites und deren prognostische Bedeutung werden weiterhin kontrovers diskutiert. Vor allem in Hinblick auf die prognostisch relevante Menge existieren z. T. unterschiedliche Meinungen [28, 29]. Unsere Ergebnisse identifizierten hier die Menge von 500 ml als prognostisch relevante Grenze.

Aufgrund des sehr kurzen medianen Follow-up-Intervalls besitzen alle Ergebnisse unserer Studie nur einen begrenzten Vorhersagewert. Andererseits stellt unser Untersuchungskollektiv aus 62 Patientinnen keine ausreichend große Studienpopulation, um statistisch bedeutsame Aussagen hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der Expressionsprofile des *TOP2A*-Gens identifizieren zu können. Aus dieser Sicht sind weitere prospektive Studien an einem größeren Untersuchungskollektiv erforderlich, um die tatsächliche prognostische Bedeutung der zellulären Überexpression von *TOP2A* zu evaluieren. Neue Perspektiven für die Gewebeasservierung bieten hier die multi-zentrischen Tumorbanks sowie Translational - Research - Protokolle zu aktuellen Chemotherapiestudien, die eine detaillierte Analyse an randomisierten Patientenkollektiven ermöglichen. Nichtsdestotrotz glauben wir, dass Untersuchungsansätze wie in dieser Arbeit dazu beitragen, über ein besseres Verständnis der molekularen Karzinogenese des Ovarialkarzinoms effektivere Therapiestrategien für den klinischen Alltag entwickeln zu können.

E. Zusammenfassung

Tab. 18

Zelluläre Differentialexpression des *TOP2A*-Gens in fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen.

Tabellarische Darstellungen der Unterschiede in der differentiellen Proteinexpression des *TOP2A*-Enzyms: diese werden mittels Immunhistochemie ermittelt (obere Tabellenhälfte). Die mRNA Amplifikation des *TOP2A*-Gens wird über TaqMan RT-PCR untersucht (unteren Hälfte). Die Unterschiede der *TOP2A*-Expression werden sowohl zwischen Primär- und Rezidivkarzinomen (gewebespezifisch) wie auch zwischen den Tumor- und tumorassoziierten Stromazellen (zellspezifisch) analysiert und deskriptiv ausgewertet.

Vergleich der zelltypischen, differentiellen <i>TOP2A</i> -Genexpression im primären und rezidierten Ovarialkarzinom				
		Tumorzellen (gesamt)	Tumorzellen	Stromazellen
Immunhistochemie	Stromazellen (gesamt)	Tumor > Stroma p = 0.0001 <i>TOP2A</i>		
	Tumorzellen		Primär > Rezidiv p = 0.023 <i>TOP2A</i>	
	Stromazellen			Rezidiv > Primär p = 0.056 <i>TOP2A</i>
TaqMan Real-time PCR	Stromazellen (gesamt)	Tumor >Stroma p = 0.804 <i>TOP2A</i>		
	Tumorzellen		Primär > Rezidiv p = 0.973 <i>TOP2A</i>	
	Stromazellen			Rezidiv > Primär p = 0.017 <i>TOP2A</i>

Wir haben in dieser Studie die Überexpression von *TOP2A* in den Tumorzellen und dem tumorassoziierten Stroma im Gewebe von fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen nachgewiesen. Sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene kann die zelluläre Differentialexpression des *TOP2A*-Gens wiederholt evaluiert und deskriptiv analysiert werden (Tab. 18). Unter dem Einsatz moderner molekulargenetischer Methoden wird mittels hochsensitiven cDNA-Sonden über nichtradioaktive *in-situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten und über TaqMan RT-PCR an mikrodisszierten Ovarialkarzinomproben die Amplifikation des *TOP2A*-Transkripts untersucht. Das

TOP2A-Gen zeigt die Tendenz zur Überexpression im malignen Gewebe: neben den Karzinomzellen auch im benachbarten Stroma. Durch den Einsatz dieser innovativen Nachweismethoden ist eine präzise qualitative und quantitative Evaluation der *TOP2A*-Amplifikation auf RNA-Ebene beim Ovarialkarzinom möglich. Die *TOP2A*-mRNA-Amplifikation zeigt in den Tumorzellen und in den benachbarten Stromazellen eine spezifische differentielle Überexpression.

Auch auf Proteinebene erfolgt der Nachweis der *TOP2A*-Überexpression. Neben den Tumorzellen weist auch hier das Stroma die deutliche Tendenz zur Überexpression auf. Offensichtlich wird die transkribierte Geninformation in einem ungebremsten Prozess weiter aufgearbeitet.

Insgesamt zeigt sich die stärkste *TOP2A* - Überexpression in den Tumorzellen, sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene. Zusätzlich weisen die Tumorzellen eine deutlich höhere Regulation der Gentranskription bei Frauen mit primärem, nicht vortherapierten Ovarialkarzinom. Unter den Patientinnen mit einem Platin-vorbehandelten rezidivierten Karzinom ist die *TOP2A* - Überexpression schwächer. Demgegenüber wird im Stroma eine entgegengesetzte Tendenz beobachtet. Frauen mit rezidivierter Erkrankung, nach platinhaltiger Chemotherapie, zeigen in den Fibroblasten eine stärkere Überexpression des *TOP2A*-Gens im Vergleich zu Fibroblasten von Frauen mit einer Primärerkrankung. Diese Tendenz bleibt auf mRNA- und auf Proteinebene bestehen. Vermutlich repräsentiert diese Beobachtung eine Steigerung in der Regulation der *TOP2A*-Genaktivität im Verlauf der Tumorerkrankung. Auch eine Art Reaktion auf die Tumorprogression und die damit verbundenen zellulären Veränderungen, wie z. B. Entwicklung einer Chemotherapieresistenz, oder eine Mediator-vermittelte Aktivierung von Stromaanteilen können für diese Überexpression verantwortlich sein. Eindeutig kommt es zu einer massiven Ausbreitung der *TOP2A* Genaktivität innerhalb der heterogenen Zelltypen der epithelialen Ovarialkarzinome. Andererseits können wir die stromaspezifische Überexpression des *TOP2A*-Gens nur in einem Teil der Karzinome finden, was eher auf die Diversifizierung des Expressionsverhaltens nur innerhalb bestimmter Karzinomgruppen i. S. einer Subgruppeneigenschaft auf molekularer Ebene hindeuten kann. Die Ergebnisse der zellulären Differentialexpression des *TOP2A*-Gens korrelieren weder mit klinisch-pathologischen Parametern, noch haben sie eine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeitwahrscheinlichkeit der Patientinnen. Einzig die etablierten Faktoren makroskopischer Tumorrest und Vorhandensein von Aszites haben in der Multivarianzanalyse einen ungünstigen prognostischen Einfluss auf die Überlebenszeit.

Zusammenfassend liefern unsere systematischen Analysen in allen drei unabhängig eingesetzten Methoden einen deutlichen Nachweis der zellulären Überexpression des *TOP2A*-Gens auch in den tumor-assoziierten Stromazellen. Die Unterschiede in der zellulären *TOP2A*-Überexpression zwischen Patientinnen mit Chemotherapie-naiver Primärerkrankung und Patientinnen mit Platin-vorbehandeltem Ovarialkarzinomrezidiv können wir weder mit dem zytotoxischen Chemotherapieeffekt noch mit der biologischen Natur der Erkrankung erklären. Wir können durch die detaillierte molekularbiologische Charakterisierung fortgeschrittener Ovarialkarzinome unser Verständnis für die Tumorgenese präzisieren und eventuell therapeutische Effekte für die Optimierung der Behandlung durch Identifizierung von Karzinomsubgruppen erreichen.

F. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18(3):581-92. Epub 2007 Feb 7.
2. Pfisterer J, du Bois A. *Das Ovarialkarzinom: therapeutische Standards - klinische Empfehlungen*. 1st ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag, 2002.
3. Bookman MA. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15(Suppl 3):212-20.
4. Sehouli J. "IMO"--intraoperative mapping of ovarian cancer. *Zentralbl Gynakol* 2003; 125(3-4):129-35.
5. Lichtenegger W. Operative results after primary and secondary debulking-operations in advanced ovarian cancer (AOC). *J Obstet Gynaecol Res* 1998; 24(6):447-51.
6. Heintz AP. Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006; 95(Suppl 1): S161-92.
7. Bristow RE. 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.
8. Friedrich M. *Manual Gynäkologische Onkologie*. In: K. Diedrich, ed. 1st ed. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2005.
9. Mahdavi A, Pejovic T, Nezhat F. Induction of ovulation and ovarian cancer: a critical review of the literature. *Fertil Steril* 2006; 85(4):819-26.
10. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19(1):3-10.
11. Helzlsouer KJ. Serum gonadotropins and steroid hormones and the development of ovarian cancer. *Jama* 1995; 274(24):1926-30.
12. Cramer, DW. Genital talc exposure and risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* 1999; 81(3):351-6.
13. Bingham C, Roberts D, Hamilton TC. The role of molecular biology in understanding ovarian cancer initiation and progression. *Int J Gynecol Cancer* 2001. 11(Suppl 1):7-11.
14. Runnebaum IB, Stickeler E. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127(2):73-9.

15. Diebold J. Molecular genetics of epithelial ovarian neoplasms: correlations with phenotype and biological behavior. *Pathologe* 1998; 19(2):95-103.
16. Berek JS, Schultes BC, Nicodemus CF. Biologic and immunologic therapies for ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(10 Suppl):168-74.
17. Wen WH. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18(1):29-41.
18. Schindlbeck C. Prognostic impact of KI67, p53, human epithelial growth factor receptor 2, topoisomerase IIalpha, epidermal growth factor receptor, and nm23 expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 12:12-17.
19. Jacobson KK. Gene copy mapping of the ERBB2/TOP2A region in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40(1):19-31.
20. Stratton JF. Contribution of BRCA1 mutations to ovarian cancer. *N Engl J Med* 1997. 336(16):1125-30.
21. Slamon DJ. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905):707-12.
22. Mayr D. HER-2/neu gene amplification in ovarian tumours: a comprehensive immunohistochemical and FISH analysis on tissue microarrays. *Histopathology* 2006; 48(2):149-56.
23. Kulozik A. *Molekulare Medizin: Grundlagen - Pathomechanismen - Klinik*. 1st ed. Berlin: W. de Gruyter, 2000.
24. Rodriguez C. Body mass index, height, and the risk of ovarian cancer mortality in a prospective cohort of postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(9):822-8.
25. Brun JL. Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 78(1):21-7.
26. 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.
27. Schildkraut JM. Prognostic factors in early-onset epithelial ovarian cancer: a population-based study. *Obstet Gynecol* 2000; 95(1):119-27.
28. Puls LE. The prognostic implication of ascites in advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 61(1):109-12.

29. Harter P. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann Surg Oncol* 2006; 13(12):1702-10.
30. Helleman J. Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006; 118(8):1963-71.
31. See HT, Kavanagh JJ. Novel agents in epithelial ovarian cancer. *Cancer Invest* 2004; 22(Suppl 2):29-44.
32. Heck MM, Earnshaw WC. Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* 1986; 103(6 Pt 2):2569-81.
33. Gotlieb WH. Topoisomerase II immunostaining as a prognostic marker for survival in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001; 82(1):99-104.
34. Licitra E. Phase I evaluation of sequential topoisomerase targeting with irinotecan/cisplatin followed by etoposide in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1673-79.
35. Burden DA, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400(1-3):139-54.
36. Larsen AK, Skladanowski A. Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400(1-3): 257-74.
37. Koshiyama M. Immunohistochemical expression of topoisomerase IIalpha (Topo IIalpha) and multidrug resistance-associated protein (MRP), plus chemosensitivity testing, as chemotherapeutic indices of ovarian and endometrial carcinomas. *Anticancer Res* 2001; 21(4B):2925-32.
38. Tanner B, et al. [Expression of c-erbB-2 and topoisomerase II alpha in relation to chemoresistance in ovarian cancer]. *Zentralbl Gynakol* 2002; 124(3):176-83.
39. van der Zee AG. Quantitative and qualitative aspects of topoisomerase I and II alpha and beta in untreated and platinum/cyclophosphamide treated malignant ovarian tumors. *Cancer Res* 1994; 54(3):749-55.
40. Jarvinen TA, Liu ET. Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase IIalpha (TOP2A) genes--molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6(7):579-602.
41. Serrano-Olvera A. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 2006; 32(3):180-90. Epub 2006 Feb 17.

42. Tuefferd M. HER2 Status in Ovarian Carcinomas: A Multicenter GINECO Study of 320 Patients. *PLoS ONE* 2007; 2(11):e1138.
43. Hengstler JG. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 1999; 59(13):3206-14.
44. Mano MS. Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92(3):887-95.
45. Simon R. HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 2003; 107(5):764-72.
46. Varis A. Coamplified and overexpressed genes at ERBB2 locus in gastric cancer. *Int J Cancer* 2004; 109(4):548-53.
47. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 2000; 6(8):324-9.
48. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411(6835):375-9.
49. Olumi AF. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59(19):5002-11.
50. Moinfar F. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 2000; 60(9):2562-6.
51. Sternlicht MD. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999; 98(2):137-46.
52. Barcellos-Hoff MH, Ravani SA. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res* 2000; 60(5):1254-60.
53. Tuxhorn JA. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 2002; 8(9):2912-23.
54. Tuhkanen H. 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.
55. Tlsty TD. Searching for targets: the power of somatic cell genetics. *Genome Res* 2001; 11(2):187-8.

56. Kurose K. Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions. *Hum Mol Genet* 2001; 10(18):1907-13.
57. 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.
58. Giavazzi R, Bani MR, Taraboletti G. Tumor-host interaction in the optimization of paclitaxel-based combination therapies with vascular targeting compounds. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(3-4):481-8.
59. Joncourt F. Multiple drug resistance parameter expression in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1998; 70(2):176-82.
60. Deavers MT, Malpica A, Silva EG. Immunohistochemistry in gynecological pathology. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13(5):567-79.
61. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:369-413.
62. Austin CA, Marsh KL. Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays* 1998; 20(3):215-26.
63. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(6):430-40.
64. Schoeffler AJ, Berger JM. Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 6):1465-70.
65. Osheroff N. DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400(1-3):1-2.
66. Chung TD. Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(23):9431-5.
67. Tsai-Pflugfelder M. Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(19):7177-81.
68. Lang AJ. Structural organization of the human TOP2A and TOP2B genes. *Gene* 1998; 221(2):255-66.
69. Capranico G. Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1132(1):43-8.

70. Nitiss JL. Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400(1-3):63-81.
71. Turley H. The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer* 1997; 75(9):1340-6.
72. Negri C. DNA topoisomerase II beta: stability and distribution in different animal cells in comparison to DNA topoisomerase I and II alpha. *Exp Cell Res* 1993; 206(1):128-33.
73. Holden JA, Rolfson DH, Wittwer CT. The distribution of immunoreactive topoisomerase II Protein in human tissues and neoplasms. *Oncol Res* 1992; 4(4-5):157-66.
74. Cornarotti M. Gene expression of DNA topoisomerases I, II alpha and II beta and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 67(4):479-84.
75. van der Zee AG. P-glycoprotein expression and DNA topoisomerase I and II activity in benign tumors of the ovary and in malignant tumors of the ovary, before and after platinum/cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Res* 1991; 51(21):5915-20.
76. Wilson CS. DNA topoisomerase IIalpha in multiple myeloma: a marker of cell proliferation and not drug resistance. *Mod Pathol* 2001; 14(9):886-91.
77. Roessler K, Gatterbauer B, Kitz K. Topoisomerase II alpha as a reliable proliferation marker in meningiomas. *Neurol Res* 2002; 24(3):241-3.
78. McLeod HL. Topoisomerase I and II activity in human breast, cervix, lung and colon cancer. *Int J Cancer* 1994; 59(5):607-11.
79. Liang ZY. Topoisomerase IIalpha and HER2/neu gene alterations and their correlation in pancreatic ductal adenocarcinomas]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2007; 36(2):102-6.
80. Codegoni AM. Expression of genes of potential importance in the response to chemotherapy and DNA repair in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1997; 65(1):130-7.
81. Withoff S. DNA topoisomerase IIalpha and -beta expression in human ovarian cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(5-6):748-53.
82. van der Zee AG. Molecular analysis of the topoisomerase II alpha gene and its expression in human ovarian cancer. *Ann Oncol* 1994; 5(1):75-81.

83. Tanoguchi K. Immunohistochemical and two-parameter flow cytometric studies of DNA topoisomerase II alpha in human epithelial ovarian carcinoma and germ cell tumor. *Mod Pathol* 1998; 11(2):186-93.
84. Heck MM, Hittelman WN, Earnshaw WC. Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(4):1086-90.
85. Kaufmann SH. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400(1-3):195-211.
86. Holden JA. Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1995; 104(1):54-9.
87. Depowski PL. Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol* 2000; 13(5):542-7.
88. Villman K. Topoisomerase II-alpha expression in different cell cycle phases in fresh human breast carcinomas. *Mod Pathol* 2002; 15(5):486-91.
89. Gerdes J. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168(1):85-6.
90. Dingemans AM, Pinedo HM, Giaccone G. Clinical resistance to topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400(1-3):275-88.
91. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7(6):1513-23.
92. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992; 24:104-8.
93. John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969; 223(206):582-7.
94. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 63(2):378-83.
95. Komminoth P. Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1(2):142-50.
96. Kassavetis GA. Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. II. Mapping of SP6 DNA and selective in vitro transcription. *J Biol Chem* 1982; 257(10):5779-88.
97. Sirivatanauksorn Y. Laser-assisted microdissection: applications in molecular pathology. *J Pathol* 1999; 189(2):150-4.

98. Fend F, Kremer M, Quintanilla-Martinez L. Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection. *Pathobiology* 2000; 68(4-5):209-14.
99. Schutze K, Lahr G. Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine. *Cell Mol Biol* 1998; 44(5):735-46.
100. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987. 162(1):156-9.
101. Higuchi R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11(9):1026-30.
102. Holland PM. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(16):7276-80.
103. Nakane PK. Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 254:203-11.
104. Moll I. Cytokeratins. Markers of epithelial differentiation. *Hautarzt* 1993; 44(7): 491-501; quiz 501.
105. 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; 8(3):138-40.
106. Pospeschill M. SPSS für Fortgeschrittene - Durchführung fortgeschrittener statistischer Analysen. In: RRZN-Handbücher. 4 ed. Hannover, 2004.
107. Lobeck H. Heterogeneity of cytokeratins of epithelial cells in relation to cell differentiation (the example of laryngeal epithelium). *Verh Dtsch Ges Pathol* 1988; 72:229-32.
108. Du Bois A. Pattern of care and impact of participation in clinical studies on the outcome in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15(2):183-91.
109. Fader AN, Rose PG. Role of surgery in ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2007, 25(20):2873-83.
110. Sehoul J. Conventional and experimental prognostic factors in ovarian cancer. *Zentralbl Gynakol* 2004; 126(5):315-22.
111. Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ. Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol* 1998; 69(2):103-8.

112. Liu D. Topoisomerase IIalpha gene expression is regulated by the p53 tumor suppressor gene in nonsmall cell lung carcinoma patients. *Cancer* 2002; 94(8):2239-47.
113. Guerin E. Modification of topoisomerase genes copy number in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; 17(3):532-40.
114. Buzdar AU. Topoisomerase IIalpha gene amplification and response to anthracycline-containing adjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(16):2409-11. Epub 2006 May 8.
115. Olsen KE. Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol* 2004; 43(1):35-42.
116. Harris LN. Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1497-504.
117. Tanner M. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol* 2006; 24(16):2428-36. Epub 2006 May 8.
118. Piccart-Gebhart MJ. Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354(20):2177-9.
119. Lehmann U. Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2000; 156(6):1855-64.
120. Yajima T. Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. *Clin Chem* 1998; 44(12):2441-5.
121. Glockner S. Detection of gene amplification in intraductal and infiltrating breast cancer by laser-assisted microdissection and quantitative real-time PCR. *Pathobiology* 2000; 68(4-5):173-9.
122. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(1):54-9.
123. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6):442-54.
124. Bartlett JMS. Ovarian Cancer: Methods and Protocols. In Bartlett JMS ed. *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 39. Totowa: Humana Press, 2002.

125. Geisler JP. Quantification of p53 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1997; 66(3):435-8.
126. Zweemer RP. Survival analysis in familial ovarian cancer, a case control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 98(2):219-23.
127. Vidal S. Topoisomerase IIalpha expression in pituitary adenomas and carcinomas: relationship to tumor behavior. *Mod Pathol* 2002; 15(11):1205-12.
128. Berney DM. DNA topoisomerase I and II expression in drug resistant germ cell tumours. *Br J Cancer* 2002; 87(6):624-9.
129. Houlbrook S. Relationship between expression of topoisomerase II isoforms and intrinsic sensitivity to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 1995; 72(6):1454-61.
130. Koshiyama M. Correlation between Topo II alpha expression and chemosensitivity testing for Topo II-targeting drugs in gynaecological carcinomas. *Anticancer Res* 2001; 21(2A):905-10.
131. Lodge AJ. Topoisomerase II alpha and II beta expression in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relation to prognostic factors and clinical outcome. *J Clin Pathol* 2001; 54(1):31-6.
132. van den Hooff A. Stromal involvement in malignant growth. *Adv Cancer Res* 1988; 50:159-96.
133. Chrenek MA, Wong P, Weaver VM. Tumour-stromal interactions. Integrins and cell adhesions as modulators of mammary cell survival and transformation. *Breast Cancer Res* 2001; 3(4):224-9.
134. Koensgen D. Expression analysis and RNA localization of PAI-RBP1 (SERBP1) in epithelial ovarian cancer: association with tumor progression. *Gynecol Oncol* 2007; 107(2):p. 266-73. Epub 2007 Aug 14.
135. Skobe M, Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(3):1050-5.
136. Matsumoto Y, Tamiya T, Nagao S. Resistance to topoisomerase II inhibitors in human glioma cell lines overexpressing multidrug resistant associated protein (MRP). *J Med Invest* 2005; 52:41-48.
137. Simon R. [HER-2 and TOP2A gene amplification in urinary bladder cancer]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2002; 86:176-83.

G. Anhang

G.1 Verwendete Lösungen und Reagenzien:

DNA-Gelladepuffer, 6x:	0,25% (w/v) Bromphenolblau BPB (low) 0,25% (w/v) Xylen-Cyanol (high) 30% (v/v) Glycerin 60mM EDTA in H ₂ O bidest
GCS-Lösung:	100g Guadinium-Isothiocyanat (Serva, Heidelberg) 124,8ml H ₂ O bidest 7ml Natriumcitrat ,0,75M, pH7,0 3ml Natrium-Lauroylsarkosin (Serva, Heidelberg) lösen bei 65°C und abkühlen lassen.
Hybridisierungslösung: (ISH)	50% Formamid (low conductivity) 0,75M NaCl 1x PE (10mM PIPES pH 6.8, 1mM EDTA pH 8.0) 0,1mg/ml tRNA 0,05% Heparin 0,1% BSA 1% SDS in H ₂ O bidest (DNAse/RNAse frei)
LB-Medium:	1% (w/v) Bacto-Tryptone 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) NaCl mit 1M NaOH auf pH 7,5 einstellen
Maleinsäure Puffer:	0,1M Maleinsäure 0,15M NaCl in 1L in H ₂ O , pH 7,5 mit 10N NaOH einstellen
Mops-Puffer, 10x:	200 mM 3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA, mit 10M NaOH auf pH 7.0 einstellen, lichtgeschützt
PBS-Puffer, 10x:	11,5g Na ₂ HPO ₄ 2g KH ₂ PO ₄ 80g NaCl 2g KCl in 1L H ₂ O bidest
SOC-Medium:	20g/L Bacto-Trypton 5g/L Hefeextrakt 0,5g/L NaCl 0,186g/L KCl 10mM MgCl ₂

SSC, 20x:	87,7g NaCl 44,1g Natriumcitrat in 500ml H ₂ O bidest mit HCl auf pH 7,2 einstellen
TBE-Puffer, 10x:	0,89M Tris-Base 0,89M Borsäure 0,02M EDTA (pH 8,3)
TBS-Puffer, 10x:	80g NaCl 2g KCl, 25ml 1M Tris-HCl in 1L H ₂ O bidest, pH7,4
TE-Puffer, 1x:	50mM Tris-HCl, pH 8,0 1mM EDTA

G.2 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bp	Basenpaare
BRCA	Breast Cancer
CA125	Cancer Antigen 125
cDNA	Komplementäre DNA
CGH	Comparative Genome Hybridization
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERBB2 (HER-2/NEU)	Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
EST	Expressed Sequence Tag
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	Genome Assembly Program
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HSC70	Heat Shock Cognate 70
kb	Kilobasen
LOH	Loss Of Heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PBL	Periphere Blut-Leukozyten
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription / Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	Natriumzitat-Puffer
SSCP	Single-Strand Conformational Polymorphism
STS	Sequence Tagged Site
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TP53	Tumor Protein 53
TSG	Tumorsuppressorgen(e)
UICC	International Union Against Cancer
UNG	Uracil-N-glycosylase
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside
ZNF202	Zinc Finger Protein 202

Danksagung:

Als erstes möchte ich meinen Eltern meiner Mutter Vojka Chekerova und meinem Vater Jordan Chekerov († 2003), für die unendliche Liebe, den unerschöpflichen Glauben und das volle Vertrauen in mir in allen Jahren meiner Ausbildung von ganzen Herzen danken.

Einen ganz herzlichen Dank geht an meinen Doktorvater und Lehrer Prof. Dr. Jalid Sehouli für die einzigartige wissenschaftliche und emotionale Betreuung, für das Vertrauen und die unzählige Motivationsschübe auch in manch verzweifelter Situation.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Mentoren und Betreuer Dr. Edgar Dahl und Fr. Dr. Irina Klaman für die unermüdlichen Diskussionsrunden, Korrekturen und Hilfevorschläge bei der Konzipierung und Durchführung dieses Studienprojektes.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Werner Lichtenegger aussprechen für das Vertrauen und die Unterstützung, die er unserer Arbeitsgruppe immer geleistet hat.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Mitstreitern: Dominique Könsgen, Alexander Mustea, Anja Dietrich, Cristina Pirvulescu und Ioana Braicu bedanken.

Besonderen Dank an Frau Beate Petschke und Dr. Ruprecht Kuner für die menschliche Hilfe in vielen methodisch schwierigen Momenten sowie an Frau Nicole Kreuzburg für die exzellente technische Unterstützung.

Dem Herrn Claudio Conti möchte ich mich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die konstruktiven Gestaltungsvorschläge bedanken.

Eigenständigkeitserklärung

Ich, Radoslav Chekerov, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Differenzielle Expression von Topoisomerase II alpha (TOP2A) in Tumorzellen und tumor-assoziierte Stromazellen von malignen Ovarialtumoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutz, 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.

Datum 10.11.2008

Unterschrift

Curriculum Vitae

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