

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat, FRCOG

**Expressionsanalyse von Aurora-Kinase A, Aurora-Kinase B,
Repp 86, Cyclin-Dependent-Kinase 1 und Cyclin-
Dependent-Kinase 2 bei Mamma- und Ovarialkarzinomen**

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

vorgelegt von
Linda Dittmann, geboren am 18.11.1983 in Berlin

Kiel, Januar 2014

1. Berichterstatter: PD Dr. Christian Schem, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
2. Berichterstatter: PD Dr. Carsten Maik Naumann, Klinik für Urologie und Kinderurologie
Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2014
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.09.2014

gez. PD Dr. Felix Hilpert, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Vorsitzender der Prüfungskommission

Nicht Kunst und Wissenschaft allein,
Geduld will bei dem Werke sein.
Ein stiller Geist ist jahrelang geschäftig;
Die Zeit nur macht die feine Gärung kräftig.
(Mephistopheles, Faust I)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1. Ziele dieser Arbeit.....	7
1.2. Das Mammakarzinom.....	8
1.3. Das Ovarialkarzinom.....	10
1.4. Der Zellzyklus.....	10
1.5. Die Aurora-Kinasen.....	12
1.6. Repp86.....	16
1.7. Ki67.....	17
1.8. CDK1.....	18
1.9. CDK2.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Untersuchungsgut.....	20
2.2. Real-Time PCR.....	20
2.3. Immunhistochemie.....	23
2.4. Statistische Auswertung.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Ergebnisse Mammakollektiv.....	29
3.2. Ergebnisse Ovarkollektiv.....	42
4. Diskussion.....	51
4.1. Beschreibende Parameter im Mammakollektiv.....	51
4.2. Beschreibende Parameter im Ovarkollektiv.....	51
4.3. Limitierende Faktoren dieser Arbeit.....	52
4.4. Fehlende Korrelation von RT-PCR-Daten mit Immunhistochemischen Daten.....	52
4.5. Höhere Expression in Malignomen.....	53
4.6. Korrelation der untersuchten Proteine und mRNAs untereinander.....	54
4.7. Korrelation mit dem Grading.....	55
4.8. Korrelation mit dem Tumorstadium und dem Nodalstatus.....	55
4.9. Korrelation mit Hormonrezeptorstatus.....	56
4.10. Korrelation mit den intrinsischen Subtypen.....	56
4.11. Diskussion der Überlebensanalysen.....	57
4.12. Ausblick.....	59
5. Zusammenfassung.....	61
6. Literaturverzeichnis.....	62
7. Danksagung.....	79
8. Lebenslauf.....	80

Abkürzungsverzeichnis

28S-rRNA	28S-Untereinheit der Ribosomalen Ribonukleinsäure
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Anaphase Promoting Complex
Aurora A	Aurora Kinase A
Aurora B	Aurora Kinase B
Aurora C	Aurora Kinase C
AURKA	Gen, das für Aurora Kinase A kodiert
AURKB	Gen, das für Aurora Kinase B kodiert
BRCA1/2	Breast Cancer Type 1/2 Susceptibility Protein
CAK	Cyclin-Dependent-Kinase-aktivierende Kinase
CDC25B	Cell Division Cycle 25 B-Gen
CDH 1	Cadherin 1
CDK1	Cyclin dependent Kinase 1
CDK2	Cyclin dependent Kinase 2
CDK11	Cyclin dependent Kinase 11
CDKN1A	Cyclin-Dependent-Kinase-Inhibitor 1a
CDKN1B	Cyclin-Dependent-Kinase-Inhibitor 1b
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CENP A	Centromere Protein A
CHK 1	Checkpoint Kinase 1
CIN	Chromosomale Instabilität
CISH	Chromogen-in-situ-Hybridisierung
CPC	Chromosomal passenger Complex
CT-Wert	Crossing Threshold Wert
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G0-Phase	Gap 0 Phase
G1-Phase	Gap 1 Phase
G2-Phase	Gap 2 Phase
GIN	Genetische Instabilität
Hef1	Focal adhesion scaffolding Protein
Hklp2	Human Kinesin like Protein 2
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HP1	Heterochromatin Protein 1

HRP	Horseradish Peroxidase
INCENP	Inner Centromere Protein
IRS	Immunreaktiver Score
IUD	Intrauterine Device
Ki67	Antigen, das durch den monoklonalen Antikörper Ki67 entdeckt wurde
KIF 11	Kinesin family member 11
LATS2	Large Tumor Suppressor Homolog 2
M-Phase	Mitose-Phase
MCAK	Mitotic Centromere-associated Kinesin
Mib-1	Paraffin-gängiger Antikörper gegen Ki67
MPF	Maturation Promoting Faktor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Myt1-Kinase	Membrane associated Tyrosin/Threonin 1 Protein Kinase
NDEL1	Nude Nuclear Distribution E homolog 1
p21	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
p27	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B
p53	Tumor Protein p53
PCR	Polymerase Chain Reaction
Plk1	Polokinase 1
PP1	Proteinphosphatase 1
Rad51	Rad51 homolog
Ran-GTP	Ras-related nuklear Protein-Guanosin-Triphosphat
RB-Protein	Retinoblastom Protein
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Chain-Reaction
S-Phase	Synthese-Phase
Ser28	Serin 28
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TACC	Transforming acidic coiled-coil containing Protein
Thr288	Threonin 288
TMA	Tissue Micro Array
TNM	Tumor Lymphknoten Metastasen
TPX2	Repp86
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1. Ziele dieser Arbeit

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen und auch verantwortlich für die meisten Krebstodesfälle. Eierstockkrebs liegt auf Platz fünf der krebsbedingten Todesursachen bei Frauen. Von allen gynäkologischen Malignomen hat Eierstockkrebs noch immer die schlechteste Prognose (1-3).

Tumorzellen sind durch eine unregelmäßige Proliferation und eine gestörte Differenzierung gekennzeichnet. Dabei stellen Veränderungen in der Kontrolle des Zellzyklus einen wesentlichen Unterschied zwischen gesunden Zellen und Tumorzellen dar. Die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle Aurora A, Aurora B, Repp86, Cyclin dependent Kinase 1 (CDK1) und Cyclin dependent Kinase 2 (CDK2) sind alle an unterschiedlichen Stellen entscheidend für den Fortgang und die Regulation des Zellzyklus verantwortlich. In Tumorzellen finden sich gehäuft Mutationen, die wesentliche mitogene Effekte haben können, zu einer mangelhaften Antwort auf anti-mitogene Einflüsse führen können und so zur unregelmäßigen Proliferation beitragen (4, 5). Zusätzlich erlangen die meisten Tumoren genetische Instabilität (GIN), die zu weiteren Mutationen und chromosomaler Instabilität (CIN) führt (6, 7). Diese Schäden resultieren nicht nur in einem Proliferationsvorteil, sondern führen auch zu einer erhöhten Anfälligkeit für weitere genetische Abänderungen, die eine weitere Tumorumprogression und aggressivere Phänotypen mit sich bringen. Diese drei basalen Zellzyklusdefekte – unregelmäßige Proliferation, GIN und CIN – werden direkt oder indirekt durch Fehlregulation von Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin-Dependent Kinasen, Aurorakinasen oder auch Repp86 vermittelt (8-11). Entsprechend wurde für viele Tumoren bereits eine erhöhte Expression von Aurorakinasen, Repp86, dem Interaktionspartner der Aurora A, und Cyclin-Dependent Kinasen nachgewiesen.

Da Aurorakinasen und Cyclin-Dependent-Kinasen an entscheidenden Positionen im Zellzyklus agieren und da Aurora A eine Taxolresistenz vermitteln kann (12), eignen sie sich auch besonders als Ziele einer Antikörpertherapie in der Tumorbehandlung. Aurorakinaseinhibitoren und Inhibitoren von Cyclin-Dependent Kinasen sind bereits in der klinischen Erprobung und könnten auch für Mamma- und Ovarialkarzinompatientinnen eine Behandlungsoption darstellen, sofern ihre Zielproteine in Mamma- und Ovarialtumoren exprimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine erhöhte Expression dieser Zellzyklus-Regulatoren auch in Mamma- oder Ovarialkarzinomen nachweisbar ist. Da Tumoren immer mehr als eine heterogene Gruppe angesehen werden, war es interessant, welche Tumoren eine besonders hohe Expression zeigen, und ob den Expressionsunterschieden auch eine prognostische Bedeutung zukommt. Zusätzlich wurde die Expression von Ki67, einem etablierten Proliferationsmarker, untersucht, um zu prüfen, ob diese im Zellzyklus aktiven Proteine ebenfalls mit der Proliferation korrelieren.

Um sowohl eine Aussage auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene treffen zu können, wurden Immunhistochemie und Real-Time PCR (RT-PCR) verwendet. Dabei lagen die RT-PCR-Daten zu Beginn

dieser Doktorarbeit bereits vor, sodass im Rahmen dieser Arbeit nur deren Auswertung erfolgte. Für Ki67 wurden keine RT-PCR-Daten erhoben.

Die Daten der Immunhistochemie sollten mit denen der RT-PCR verglichen werden, auch um zu prüfen, welche Methode zur Charakterisierung eines Tumors besser geeignet ist.

Alle erhobenen Expressionsdaten wurden mit klinischen Merkmalen der Tumoren, wie ihrem Tumorstadium verglichen. Auch eine mögliche Korrelation mit histopathologischen Merkmalen, wie der klassischen Tumordifferenzierung, dem Grading, aber auch mit speziellen Merkmalen, wie der Hormonrezeptorexpression oder der Her2neu-Überexpression bei Mammakarzinomen, sollten untersucht werden. Dabei wurde auch die Expression bezogen auf die intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms evaluiert. So sollte untersucht werden, ob Tumoren unterschiedlicher Aggressivität und mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften sich auch in Bezug auf die Expression der hier untersuchten Proteine und Gene unterscheiden. So könnten die hier erhobenen Daten helfen, Subtypen genauer zu bestimmen.

Um eine Aussage zur Prognose treffen zu können, wurden die Daten zum (rezidivfreien) Überleben der Patientinnen mit den hier untersuchten Proteinen und Genen korreliert.

Folgende Fragen sollten mit dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Wie werden Aurora A und B, CDK1 und CDK2 sowie Repp86 bei Mamma- und Ovarialtumoren exprimiert?
2. Welche Korrelationen ergeben sich zu klinischen und pathologischen Merkmalen beider Tumorentitäten?
3. Welche prognostische Relevanz hat die Expression der Proteine und mRNAs für das rezidivfreie bzw. Gesamtüberleben?

1.2. Das Mammakarzinom

1.2.1. Epidemiologie

Brustkrebs ist die häufigste bösartige Neubildung bei Frauen in Deutschland und weltweit. Im Jahr 2000 erkrankten nach Schätzungen der WHO weltweit über eine Million Frauen an einem Mammakarzinom, 370.000 Frauen verstarben daran (1). In Deutschland erkrankten im Jahr 2008 etwa 72.000 Frauen neu an Brustkrebs (3). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren (1). Bei Frauen macht das Mammakarzinom 29% aller Krebsneuerkrankungen aus. Auch bei der Krebssterblichkeit belegt das Mammakarzinom mit 18% den ersten Rang (1). Das mittlere Lebenszeitrisko an Brustkrebs zu erkranken beträgt in Deutschland 13,3%, d.h. dass jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt (3). Ende 2006 lebten in Deutschland 242.000 Frauen, bei denen innerhalb der letzten fünf Jahre ein Mammakarzinom diagnostiziert wurde (5-Jahres-Prävalenz). Die Inzidenz der Brustkrebserkrankung steigt seit 1980 an, während die Mortalität seit 1990 sinkt (1, 3, 13).

1.2.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Als Risikofaktoren für Brustkrebs gelten eine frühe Menarche, eine späte Menopause, Kinderlosigkeit sowie ein höheres Alter bei der ersten Geburt (1, 14). Auch eine Hormonersatztherapie in der Menopause gilt als Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms. Außerdem belegen Studien einen negativen Einfluss von Alkoholkonsum (15), Übergewicht (16, 17), Bewegungsmangel (18, 19) und Rauchen (20). Auch Frauen, in deren naher Verwandtschaft Brustkrebserkrankungen aufgetreten sind, tragen ein erhöhtes Risiko (1). Eine besondere Rolle kommt dabei den BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgerinnen zu, deren Lebenszeitrisiko an einem Mammakarzinom zu erkranken bei 75% liegt (21).

Dagegen senken ausgetragene Schwangerschaften in jungen Jahren, längere Stillzeiten sowie regelmäßige Bewegung und Sport das Risiko zu erkranken (1, 14).

1.2.3. Therapie

Bei der Behandlung von Brustkrebs kommen eine operative Behandlung, Strahlentherapie sowie systemisch wirksame Verfahren zum Einsatz. Zu Letzteren zählen Chemotherapie, Hormontherapie sowie molekularbiologisch begründete Therapien.

1.2.4. Prognose

Brustkrebs wird immer mehr als eine heterogene Erkrankung angesehen. Die Identifikation neuer prognostischer Marker ist wichtig, um individuelle Therapieentscheidungen zu treffen und eine Über- oder Untertherapie zu vermeiden. Klassische Prognosefaktoren sind die Größe des Primärtumors, die Ausbreitung des Tumors in regionäre Lymphknoten und das Vorliegen von Fernmetastasen (1, 22). Weitere etablierte Prognosefaktoren sind die Tumordifferenzierung (23), der Hormonrezeptorstatus (24, 25) und eine Her2neu-Überexpression (26, 27). Die letzten beiden sind zusätzlich Ansatzpunkte für eine spezifische Therapie (28-30). Basierend auf Gen-Expressionsstudien wurden unterschiedliche Risikogruppen identifiziert (31, 32). Auf immunhistochemischer Ebene werden diese Tumoren am besten durch die Untersuchung der Hormonrezeptoren, des Her2neu-Status sowie der Ki67-Expression unterschieden (33-35). Gemäß der St. Gallen Konferenz von 2011 sollten Luminal A (ER+ und/ oder PR+, Her2neu- und Ki67 niedrig), Luminal B Her2neu negativ (ER+ und/ oder PR+, Ki67 hoch und Her2neu-), Luminal B Her2neu positiv (ER+ und/ oder PR+, jedes Ki67 und Her2-neu+), Her2neu-überexprimierende (ER-, PR-, jedes Ki67, Her2neu+) und Triple-negative Tumoren (ER-,PR-, Her2neu-) unterschieden werden (36). Diese Einteilung dient der Einschätzung des Risikos für ein Rezidiv der Erkrankung und anhand dessen werden Therapieentscheidungen bezüglich einer (neo)adjuvanten Chemotherapie gefällt.

Über alle Stadien beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland derzeit 83-87% (3).

1.3. Das Ovarialkarzinom

1.3.1. Epidemiologie

Nach Daten des Robert Koch Instituts traten 2008 bei 7.790 Frauen in Deutschland Krebserkrankungen der Eierstöcke auf. Damit entfallen 3,5% aller bösartigen Neubildungen und 5,6% aller Krebssterbefälle bei Frauen auf diese Entität (3).

Das Ovarialkarzinom ist eine typische Krebserkrankung des höheren Lebensalters. Dennoch treten etwa 10% aller malignen Ovarialtumoren bereits bei Frauen unter 45 Jahren auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren (3).

1.3.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, zählen wie auch beim Mammakarzinom eine frühe Menarche und eine späte Menopause, Kinderlosigkeit und fehlende Stillzeiten. Protektiv wirken dagegen hormonelle Ovulationshemmer, die Verwendung eines Intrauterinpressars (IUD), eine Tubenligatur, eine späte Menarche, Geburten und Stillen (2, 37). Es wird angenommen, dass die Anzahl der Ovulationen der Grund für diesen Einfluss ist, wobei häufigere Ovulationen das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, erhöhen (37-40). Ein erhöhtes Risiko haben außerdem Frauen mit Verwandten ersten Grades, die an Eierstock- oder Brustkrebs erkrankt sind. Ein weiteres Risiko stellen ein vorangegangenes Endometrium- oder Kolonkarzinom dar (2). Nur 5-10% aller Ovarialkarzinome sind familiär bedingt (41). Hierbei sind Mutationen im BRCA1- oder BRCA2-Gen mit 90% der hereditären Karzinome der häufigste Grund. Von den übrigen 10% entfallen die meisten auf das HNPCC-Syndrom (Lynch-II-Syndrom) (42).

1.3.3. Therapie

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht vor allem in der chirurgischen Therapie sowie in systemisch wirksamen Verfahren. In der Standardtherapie kommen dabei vor allem Chemotherapeutika zum Einsatz. Angiogenesehemmer und andere Antikörper befinden sich derzeit in klinischer Erprobung.

1.3.4. Prognose

Eierstockkrebs ist noch immer die gynäkologische Krebserkrankung mit der höchsten Mortalität. Die wichtigsten prognostischen Faktoren sind das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, der postoperativ verbliebene Tumorrest sowie der Allgemeinzustand und das Alter der Patientin (41, 43).

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten differieren in den unterschiedlichen Tumorstadien stark. Der Median wird derzeit mit 40% angegeben (3).

1.4. Der Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt den Zeitraum zwischen der Entstehung einer Zelle aus einer Mutterzelle und ihrer Teilung in zwei Tochterzellen. Der Zellzyklus ist ein sehr komplex regulierter Vorgang. Wie Eingangs erwähnt können Fehler in der Regulation des Zellzyklus zur Entstehung von Tumoren beitragen.

Der Zellzyklus wird in die Interphase, die Phase zwischen zwei Teilungen, die Mitose und die Zytokinese unterteilt. Die Interphase selbst kann weiter in die G1-, S- und G2-Phase unterteilt werden. Die G1-Phase bezeichnet diejenige Phase nach einer erfolgten Teilung, während der die Zelle ihrer Aufgabe im Organismus nachkommt, Proteine synthetisiert und wächst. Ausgehend von der G1-Phase kann die Zelle in eine teilungsinaktive G0-Phase eintreten. Sie kann sich weiter ausdifferenzieren oder aber in einen neuen Teilungszyklus eintreten. Wichtig an dieser Stelle ist das Protein p27, das sowohl Cycline als auch Cyclin dependent Kinasen hemmen kann und so über den Ein- und Austritt in die G0-Phase entscheidet (44, 45).

Am Ende der G1-Phase liegt der G1-Restriktionspunkt, bei dem vor allem äußere Faktoren darüber entscheiden, ob eine Zelle in die S-Phase eintreten kann. Hier kann das Protein p53 den Eintritt in die S-Phase verhindern, wobei Aurora A in die Regulation von p53 eingebunden ist (44, 46). Danach ist die Zelle von äußeren Einflüssen weitgehend unabhängig. Genau in dieser Phase des Zellzyklus beginnen E-Cyclin/CDK2-Komplexe in den Zellzyklus einzugreifen, indem sie das RB-Protein phosphorylieren, das seinerseits den Transkriptionsfaktor E2F aus der Bindung entlässt und somit zur Aktivierung etlicher Gene führt, die für Proteine kodieren, die für die nun einsetzende S-Phase notwendig sind (44).

Die S-Phase ist die Synthese-Phase, in der die Zelle ihr Erbgut verdoppelt. In der G2-Phase wächst die Zelle weiter und kontrolliert, ob die Erbgutverdopplung korrekt stattgefunden hat. In dieser Phase finden auch Reparaturvorgänge am verdoppelten Genom statt. Vor Eintritt in die Mitose liegt der G2/M-Kontrollpunkt. Dauert die Reparatur zu lange, wird über p53 die Apoptose eingeleitet, indem die Aktivierung des B-Cyclin-CDK1-Komplexes verhindert wird. Denn der Übergang von der G2- in die M-Phase wird wesentlich durch Cyclin-B/CDK1 beeinflusst (44, 45). CDK1 phosphoryliert verschiedene Proteine und es kommt zum Zerfall der Kernlamina und zur Reorganisation des Zytoskeletts (47-49). Auch Aurora A ist an diesem Kontrollpunkt und seiner Überwindung beteiligt (50).

Auf die Interphase folgt die Mitose, die wiederum in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase unterteilt ist. Die gesamte Mitose dauert etwa eine Stunde (44, 45). Während der Prophase werden die Chromosomen verdichtet, woran Aurora B beteiligt ist (51-53). Die Zentriolen wandern zu den Spindelpolen. Die Kernhülle wird aufgelöst. In der Metaphase bildet sich von den Zentriolen ausgehend der Spindelapparat (44). An der Spindelbildung sind Aurora A und Repp86 maßgeblich beteiligt (54-56). Dabei lagern sich Spindelmikrotubuli an, bis die Äquatorialebene erreicht ist. Durch die Bewegung der Mikrotubuli werden die Chromosomen in die Äquatorialebene gebracht. Beim Spindelkontrollpunkt wird überprüft, ob die Chromosomen korrekt verteilt sind. Tubulinpolymere beginnen mit der Teilung der Zentromere. In der Anaphase werden die Chromatiden voneinander getrennt, was durch Aurora B vermittelt wird (57). Die Chromosomen sammeln sich an den Kernpolen. Als letzte Phase der Mitose folgt die Telophase, bei der die Kernhülle wiederhergestellt wird. Die Chromosomen beginnen sich zu entspiralisieren. Die Telophase geht fließend in die Zytokinese über. Dabei kommt es unter Mitwirkung von Aktinfilamenten und Endoplasmatischem Retikulum für die Membran-Biosynthese durch Ausbildung einer Teilungsfurche zur Entstehung von zwei Tochterzellen; ein Prozess, an dem wiederum Aurora B beteiligt ist (44, 45, 58).

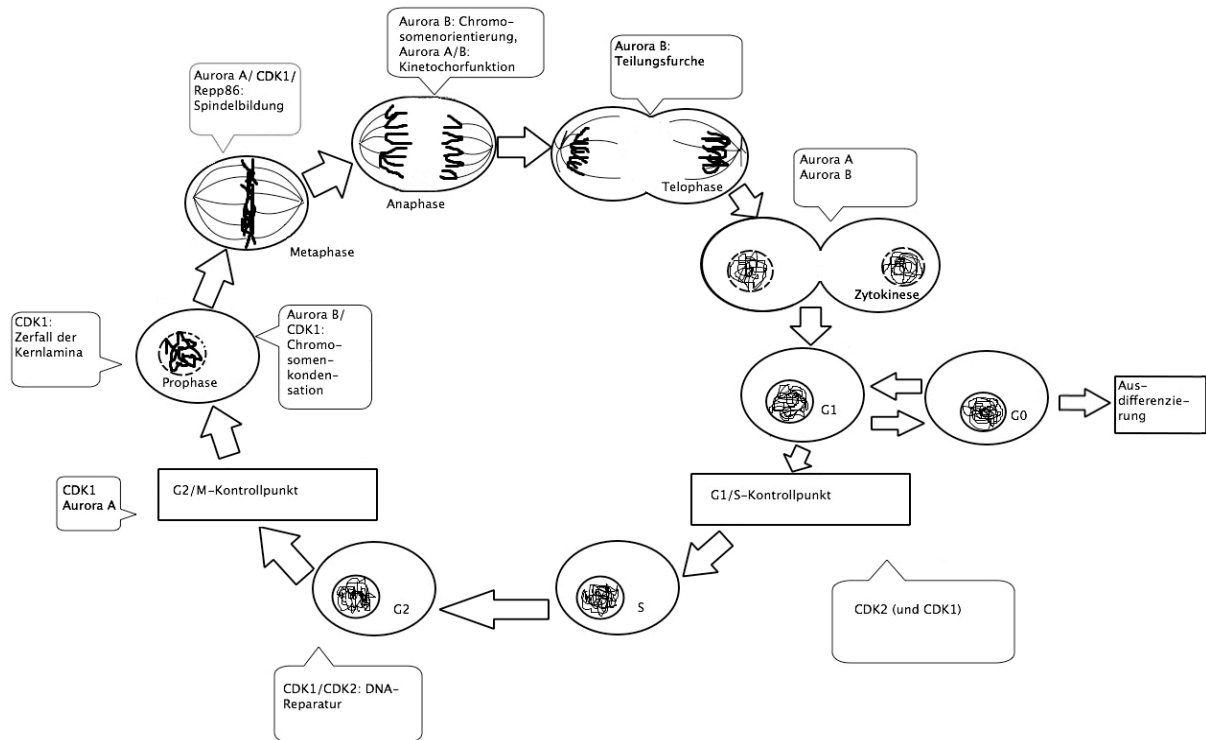


Abbildung 1.4. Der Zellzyklus (schematisch) mit ausgewählten Funktionen der untersuchten Moleküle.
 Legende: G0= G0-Phase; G1= G1-Phase; S= S-Phase; G2= G2-Phase.

1.5. Die Aurora-Kinasen

Säugetiere besitzen mindestens drei Aurorakinasen: Aurora A, B und C (59). Aurora A und B werden in somatischen Zellen exprimiert, sind in die Mitose involviert und spielen eine wichtige Rolle in der Genom-Stabilität (55). Über Aurorakinase C ist nur wenig bekannt. Sie wird vorwiegend im Hoden nachgewiesen (60, 61) und ist während der Spermatogenese und Meiose exprimiert (62). Eine Überexpression von Aurora C wird inzwischen mit Zelltransformation und Tumorentstehung in Verbindung gebracht (62). Auf Aurora C soll im Weiteren nicht eingegangen werden.

Die Aurorakinase A ist eine in der Evolution konservierte Serin/Threonin-Kinase (63). Sie ist wichtig für die Zentrosomenreifung und -trennung, die Spindel-Anordnung, die Kinetochor-Funktion, die Zytokinese und bestimmt mit über den Fortlauf des Zellzyklus (55).

Die Aurorakinase B ist ebenfalls eine Serin-Threonin-Kinase und wird für die Chromosomenorientierung und -kondensation benötigt sowie für die Zytokinese und wirkt an den Kinetochoren (55, 64-66).

1.5.1 Aurora-Kinase A

In der frühen Mitose, bevor sich die Spindeln ausbilden, initiieren die sich duplizierenden Zentrosomen mehrere Proteine. Dieser Prozess wird als Zentrosomenreifung bezeichnet (67). Sowohl dieser Prozess als

auch die Ausbildung einer bipolaren Spindel wird von der Aurora-A-Kinase reguliert. Ist die Funktion von Aurora A beeinträchtigt, kommt es zur Ausbildung von abnormalen Mitosespindeln (54, 68, 69). Entsprechend erleiden humane Zellen schwere Verzögerungen beim Eintritt in die Mitose, wenn die Funktion von Aurora-A gestört ist (70, 71).

Das Aurora-A Gen (*AURKA*) ist auf dem Chromosom 20q13.2 lokalisiert, einer Region, die in Mammakarzinomen und anderen Tumoren häufig überexprimiert ist (72-74). Möglicherweise spielt dieses Gen eine Rolle in Tumor-Entstehung und –Fortschreiten (63).

Die meisten Normalgewebe, auch Mamma- und Ovargewebe, sind für Aurora A negativ. Sie wurde jedoch nachgewiesen im Pankreas, im Hippocampus, im Gastrointestinaltrakt sowie in Tonsillen (63), welche deswegen in der Immunhistochemie als Positivkontrollen verwendet wurden. Aurora-A lässt sich in vielen Malignomen, so auch in Mamma- oder Ovarialtumoren, nachweisen (63).

Die Expression und Lokalisation der Aurora-A steht im Einklang mit ihrer Funktion als mitotisch-zentrosomale Kinase. Während der G1/S-Phase ist sie nur auf niedrigem Niveau exprimiert, aber in der G2-Phase steigen die mRNA-Mengen und die Protein-Kinase-Aktivität rapide an und erreichen einen Höhepunkt in der frühen Mitose (72, 74, 75). Der Anaphase-vermittelnde-Komplex/Cyclosom (APC/C) initiiert den Abbau der Aurora-A über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (76). Die Halbwertszeit von Aurora A beträgt etwa zwei Stunden (77).

Aurora A ist zunächst ein nukleäres Protein, das jedoch während der S- und G2-Phase an den Zentrosomen akkumuliert (67, 78), und in der Mitose an den Spindelpolen und Mikrotubuli nachweisbar ist (63, 78). Der rasche Umsatz von Aurora-A an diesen Strukturen spricht eher für eine Signalaktivität als für eine strukturelle Rolle (78). Da das Zentrosom als wichtige Signalplattform agiert (79), ist Aurora A in idealer Position um die mitotischen Ereignisse zu koordinieren (55).

1.5.1.2. Regulation von Aurora A

Die Aktivität von Aurora-A wird durch autokatalytische Phosphorylierung an Thr288 im katalytischen Zentrum reguliert (72, 76, 80). Daran beteiligt sind weitere Cofaktoren wie Ajuba und Repp86 (70, 81), das im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde.

Ran-GTP löst das nukleär lokalisierte Repp86 vor Beginn der Mitose aus seinem inhibierenden Komplex mit Importin- α . Das freie Repp86 bindet daraufhin an Aurora-A und bringt sie zu den Mikrotubuli der Mitosespindel (82). Dort bindet Ajuba die akkumulierenden Aurora-A Moleküle und induziert die Autophosphorylierung von Aurora A (67, 83). Dabei wird auch Ajuba, das ebenfalls eine Rolle bei der Zentrosomenreifung spielt, durch Aurora A phosphoryliert (70).

Die Bindung von Repp86 an Aurora-A induziert nicht nur eine aktive Konformation, sondern verhindert auch die Dephosphorylierung von Thr288 durch die Protein Phosphatase 1 (PP1) (84). Somit wird Aurora-A in ihrer aktiven Form stabilisiert. PP1 kann an Aurora A binden (85) und an Thr 288 dephosphorylieren (84). Die Autophosphorylation von Aurora A und die Dephosphorylation durch PP1 konkurrieren miteinander und resultieren in einer wechselseitigen Regulation der Aurora-Kinase-Aktivität (85). Mit beteiligt an der Regulation von Aurora sind weitere Proteine, die selbst eine Rolle bei der

Zentrosomenreifung spielen. Darunter sind die Polo Kinase 1 (Plk1), die Cyclin dependent kinase 11 (CDK11) und Hef 1 (86-89).

Bei DNA-Doppelstrangbrüchen wird die Aktivität von Aurora A durch Phosphorylation von Checkpoint Kinase 1 (CHK1) beim Übergang von der G2 in die M-Phase inhibiert (90). Wahrscheinlich vermittelt Aurora A so einen Stopp im Zellzyklus bei DNA-Doppelstrangbrüchen, bis diese durch Reparatur behoben sind.

1.5.1.2. Ziele von Aurora A

Aurora A reguliert selbst einige für die Zentrosomenreifung wichtige Proteine. Darunter sind LATS2 (Large Tumor Suppressor Homolog 2), das wiederum Ajuba phosphoryliert, NDEL1 (Nude Nuclear Distribution E homolog 1), Zentrosomin und TACC (Transforming acidic coiled-coil containing Protein) (55, 70, 83, 91-93). Ein weiteres Substrat von Aurora A ist Kinesin family member 11 (KIF11) das an der Positionierung der Chromosomen, der Zentrosomen-Trennung und der Bildung einer bipolaren Spindel während der Mitose mitwirkt (94-97). Über die Phosphorylierung von CDC25B, das wiederum Cyclin-B1-CDK1 am Zentrosom aktiviert, kann Aurora A an einer weiteren Stelle den Fortgang des Zellzyklus regulieren (98).

Das BRCA1-Gen kodiert für das Breast cancer type 1 susceptibility protein, ein DNA-Reparaturprotein. Trägerinnen mit einer Mutation in diesem Gen haben ein extrem hohes Risiko, im Laufe ihres Lebens an einem Mamma- oder Ovarialkarzinom zu erkranken (21, 42). Die Inaktivierung von BRCA1 führt zum Verlust des wichtigen G2/M-Kontrollpunkts. Aurora A bindet an und phosphoryliert BRCA1 und reguliert so den Übergang von der G2- in die M-Phase (50).

Aurora-A nimmt auch eine Schlüsselfunktion in der Regulation von p53 ein. Das Protein p53 reagiert auf zellulären Stress indem es Gene induziert, die einen Zell-Zyklus Arrest, Apoptose oder DNA-Reparatur bewirken. Mutationen von p53 wurden in vielen Tumoren gefunden (63). Aurora A phosphoryliert p53, was zur Ubiquitinylierung und damit zum Abbau von p53 führt (46). Eine Überexpression von Aurora A führt zum vermehrten Abbau von p53 und könnte so eine onkogene Transformation bewirken.

1.5.2. Aurora-Kinase B

Das für Aurora-B kodierende Gen AURKB ist auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert (99).

Wie bei Aurora A sind auch die Proteinmengen von Aurora B Zellzyklus-reguliert. Die Aurora-B Kinase-Aktivität erreicht ihr Maximum nach dem von Aurora A (72). Der Abbau von Aurora-B geht wie bei Aurora A über den APC (Anaphase Promoting complex)-Proteasom-Weg vonstatten (100, 101).

In Normalgeweben findet sich Aurora-B in einzelnen Zellen, wobei proliferierende Zellen eine stärkere Färbung in der Immunhistochemie aufweisen. Auch in den meisten malignen Geweben wurde Aurora B nachgewiesen (63).

Die Aurora-B-Kinase ist während der Prophase zunächst an den Chromosomen lokalisiert. Während der Prometaphase und Metaphase konzentriert sie sich auch an den Zentrosomen. In der Anaphase findet sie

sich in der zentralen Spindelzone und in der Telophase in der postmitotischen Brücke zwischen den Zellen (67, 102, 103).

Der Verlust der Aurora-B verursacht multiple Defekte in der mitotischen Maschinerie, einschließlich des Verlusts der Kinetochor-Bindung an die Mikrotubuli und des Ausstiegs aus der Mitose ohne Anaphase oder Zytokinese (57).

Eine solche Vielzahl von Effekten ist durch die vielen Reaktionswege bedingt, die Aurora B beeinflusst. So ist Aurora-B die katalytische Domäne des „Chromosomal Passenger Complex“ CPC. Sie formt zusammen mit den Proteinen Survivin, Borealin und INCENP (Inner Centromere Protein) einen Komplex. Gemeinsam werden sie häufig als „Chromosome Passenger Proteins“ bezeichnet (67). Aurora B selbst wird nach Interaktion mit INCENP durch Autophosphorylierung aktiviert (104-106).

Ein wichtiger Aspekt in der Funktion von Aurora B ist die Phosphorylierung von Histon H3 an Ser10 und Ser28 (51-53, 107). Die Phosphorylierung an Ser10 beginnt in der perizentromeren Region während der G2-Phase, setzt sich in der Metaphase über die gesamte Länge des Chromosoms fort (108) und ist notwendig für die Initiation der Chromosomenkondensation (109). Östrogen kann im experimentellen Design in Ovarfollikelzellen und Brustkrebszellen Aurora B induzieren und via Phosphorylierung von Histon H3 zur Zellproliferation führen (110).

Es wurde in Studien gezeigt, dass die Phosphorylierung von Histon H3 durch Aurora B ein dynamischer Weg ist, um das Heterochromatin Protein 1 (HP1) in der M-Phase von Chromatin zu lösen (111, 112). HP1 ist ein Protein, das sich in der Interphase mit Histon H3 assoziiert und eine Rolle in der Chromatinarchitektur spielt. Die Wichtigkeit von Aurora B für die Chromosomenkondensation lässt sich damit bekräftigen, dass Zellen mit funktionell fehlerhafter Aurora B nicht in der Lage sind, Chromosomen zu kondensieren (113, 114).

Auch das Centromere Protein A (CENP A) wird von Aurora B phosphoryliert (115). CENP A hat eine ähnliche Struktur wie Histon H3 und ist notwendig für die Zentromerfunktion und Chromosomenkondensation (116).

Zudem reguliert Aurora B die Aktivität und Lokalisation des Mitotic Centromer-associated Kinesin (MCAK) am Zentromer und Kinetochor (117, 118). MCAK ist ein Kin-I Kinesin, das Mikrotubuli depolymerisieren kann. Es wird angenommen, dass Aurora B eine korrekte Bioorientierung der Chromosomen gewährleistet, indem sie MCAK dazu bringt, inkorrekt orientierte Kinetochor Mikrotubuli zu depolymerisieren (118, 119).

Ein weiteres Substrat von Aurora B ist Vimentin, ein wichtiges Strukturprotein der Zelle, das unter anderem in die Formung der Teilungsfurche involviert ist (58).

1.5.3. Aurora Kinasen und Tumoren

Aurora A und Aurora B sind in Tumoren oft überexprimiert oder mutiert (120-122). Sie wurden mit der Entstehung von Tumoren und deren Fortschreiten in Verbindung gebracht (72, 103). Ihre Überexpression konnte für etliche Tumoren nachgewiesen werden, so für Mamma- und Ovarialtumoren,

aber auch für Tumoren von Colon, Prostata, Pankreas, Leber, Haut, Magen, Oesophagus, Endometrium, Cervix uteri, Blase und Schilddrüse (121, 122).

Die Inhibition von Aurorakinasen führt im Xenograft-Model zur Tumorregression (123). Aurorakinaseinhibitoren sind derzeit in klinischer Erprobung.

AURKA-Polymorphismen sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Mammakarzinomen assoziiert (124, 125). Für AURKB-Polymorphismen wurde ebenso ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs nachgewiesen (126).

Haibe-Kains et al. schlagen nach einer Untersuchung eines Kollektivs von über 5700 Mammakarzinomen sogar vor, die Unterscheidung der molekularen Subtypen mit Hilfe von drei Genen durchzuführen: Dem Östrogenrezeptor-Gen, dem Her2-Gen und AURKA. Denn AURKA hat in dieser Arbeit eine starke prognostische Bedeutung (127).

Eine Überexpression von Aurora A führt zum Überwinden des Spindel-Kontrollpunkts und resultiert in Taxolresistenz (12), was Tumorzellen einen erheblichen Proliferationsvorteil verschafft. Im Mausmodell bei Zhang et al. führt die Überexpression zwar zur fehlerhaften Mitose. Allerdings kommt es nicht zur Entstehung von Tumoren, was nahelegt, dass Aurora A allein keine onkogene Transformation bewirken kann (128). Eine andere Forschungsgruppe zeigt dagegen, dass eine Überexpression von Aurora A zur Transformation von Zelllinien führt, die dann im Mausmodell als Tumor wachsen können (72). Außerdem wurde gezeigt, dass die ektope Expression von Aurora-A zu Zentrosomen-Vervielfältigung, Aneuploidie und Chromosomaler Instabilität führt (12, 74, 129).

Ma und Weimer et al. behandelten platinresistente Ovarialkarzinomzelllinien mit dem Aurorakinase-Inhibitor AZD1152, der vor allem Aurora B inhibiert. Dabei konnte einen Vorteil der Behandlung durch die Kombination aus Platin und AZD1152 gezeigt werden (130).

1.6. Repp86

Das Gen, das für das 86kDa schwere Repp86 kodiert, liegt auf Chromosom 20q11.21 (63, 131). Repp86 wird während der S-, G2- und M-Phase exprimiert (131).

In Normalgewebe findet sich Repp86 in Drüsen- und Plattenepithelien, im Knochenmark und in Lymphknoten. Repp86 wird in den meisten Malignomen exprimiert oder sogar überexprimiert, so auch in Mamma- und Ovarialkarzinomen (9, 63, 132). Eine Überexpression von Repp86 korreliert hochgradig mit chromosomaler Instabilität (11). Eine komplette genetische Ablation von Repp86 führt zu defekter Mikrotubuliformation und Spindelanomalien (56). Eine Repp86 Haploinsuffizienz führt zu Aneuploidien *in vitro* und *in vivo*. Es führt außerdem zu einer kürzeren Lebensspanne wegen sich entwickelnder Tumoren, was suggeriert, dass die Überwachung der Spindelintegrität durch Repp86 genetische Instabilität *in vivo* verhindert (56).

In intakten Zellen kontrolliert Ran den nukleocytoplasmatischen Transport und fördert die Polymerisation und Stabilität der Mikrotubuli (133). Ran-GTP reguliert die Spindelbildung, indem es zu Beginn der Mitose die Freilassung der Spindelbildungsproteine aus ihrer Verbindung mit nukleären Import-Faktoren veranlasst (134-136). So wird auch Repp86 reguliert: Es ist während der Interphase nukleär lokalisiert, aber

sobald es durch Ran-GTP freigelassen wird, bindet es an die Mikrotubuli und Zentrosomen (134, 137). Der Abbau von Repp86 wird, wie auch bei den Aurorakinasen, über den APC-Proteasom-Weg vermittelt (101).

Repp86 wird benötigt, um Aurora A zu den Mikrotubuli der Mitosespindel zu bringen (82), und steuert ihre Kinase-Aktivität während der Mitose (81, 138).

Repp86 reguliert neben Aurora A weitere Proteine, die in die Spindelbildung eingebunden sind. Darunter ist die auch von Aurora A regulierte KIF11 (139) sowie Hklp2, das auch mit Ki67 interagiert (140, 141).

1.7. Ki67

Ki67 wurde als etablierter Zellproliferationsmarker für diese Arbeit ausgewählt. Es wurde erstmalig von Gerdes et al. in Kiel (daher auch der Name **Ki67**) als nukleäres Protein identifiziert (142), nachdem der korrespondierende Antikörper zuvor von der selben Gruppe beschrieben wurde (143).

Dass Ki67 lediglich in proliferierenden Zellen während der Zellteilung, nicht aber in ruhenden Zellen der G0-Phase nachweisbar ist, generierte großes Interesse an seiner potentiellen Rolle als Proliferationsmarker (144, 145). Die Eignung von Ki67 als Proliferationsmarker wurde durch Vergleiche mit etablierten Proliferationsstests überprüft: Für Ki67 wurde eine Korrelation mit der S-Phase-Fraktion, gemessen durch Flow-Zytometrie (146-152), eine Korrelation mit dem mitotischen Index (148, 149, 153-155) sowie eine Korrelation mit der in-vivo-Aufnahme von Bromdesoxyuridin (153, 156-158) nachgewiesen.

Das Ki67 Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (10q25) (159) und kodiert für das 359 kDa schwere Protein „Antigen Ki-67“ (63).

Die Halbwertszeit von Ki67 wird mit 60 bis 90 Minuten angenommen (160, 161).

Die zelluläre Lokalisation von Ki67 während des Zellzyklus ist nicht homogen. Während der frühen G1-Phase wird in der Regel eine schwache Färbung von kleineren Foki im Karyoplasma gefunden (162). Es kondensiert zunehmend in der späten G1-Phase zu größeren perinukleären Granula (163, 164). Während der S- und G2-Phase wird Ki67 hauptsächlich in Assoziation mit Heterochromatin sowie der nukleolären Region gefunden. Wenn die nukleäre Membran sich in der frühen Mitose auflöst, zeigt Ki67 eine intensive Expression assoziiert mit der Oberfläche der kondensierten Chromosomen im Zytoplasma. Diese Intensität verschwindet rapide in der Ana- und Telophase (165).

Trotz intensiver Forschung ist vergleichsweise wenig bekannt über die Funktion von Ki67. Es wurde gezeigt, dass Ki67 via Serin und Threonin phosphoryliert wird (161). Zudem scheint Ki67 eine wichtige Rolle in der Zellteilung zu haben, denn die Zellproliferation wird gestoppt durch Inhibition seiner Dephosphorylierung (161) oder durch Injektion von blockierenden Antikörpern (163).

Der für diese Arbeit verwendete Antikörper MIB-1 ist bei in Paraffin eingebetteten Geweben anwendbar (166) und wird auch in der Routine zur Ermittlung der Proliferation in Tumorgewebe eingesetzt. Als Proliferationsindex werden MIB-1 positive Zellen in 100 Tumorzellen angegeben, wobei ein hoher Index ein schnelles Wachstum anzeigt (167).

Entsprechend seiner Eigenschaft als Proliferationsmarker ist Ki67 in Geweben abhängig von deren Proliferation nachweisbar. Einige hochproliferative Gewebe, wie das Knochenmark, die Lymphknoten-,

Tonsillen- und die Drüsengewebe von Rektum und Duodenum sowie das Epithel der Vagina, zeigen physiologisch eine erhöhte Expression (63). In malignen Tumoren, auch in Mamma- und Ovarialtumoren, ist die Ki67 Expression dagegen häufig deutlich erhöht (63).

Wie oben erwähnt ist Ki67 momentan der von der St. Gallen Konferenz als entscheidend erachtete Marker, um zwischen Luminal A und Luminal B Tumoren zu unterscheiden (36). Damit hängt an diesem einen Marker häufig die Entscheidung über die weitere Therapie.

1.8. CDK1

CDK1 und CDK2 sind Cyclin-Dependent-Kinasen und ebenfalls Serin-Threonin-Kinasen. Zusammen mit ihren regulierenden Cyclin-Untereinheiten spielen sie eine entscheidende Rolle im Zellzyklus (168).

Das Gen, das für CDK1 kodiert, liegt auf Chromosom 10q21.2 (63). CDK1 ist die katalytische Untereinheit des Maturation Promoting Factor (MPF, bestehend aus CDK1 und CyclinB), der essentiell für die G1/S- und G2/M- Phasen Transition des eukaryoten Zellzyklus ist (169).

Als subzelluläre Lokalisation wird vor allem das Zytoplasma aber auch der Nukleus angegeben. In Normalgewebe findet sich CDK1 in einzelnen Zellen in proliferierenden Geweben. Für normales Mamma- und Ovargewebe wurde allenfalls eine schwache Anfärbung beschrieben (63). Dagegen wird CDK1 in den meisten Malignomen stark exprimiert, so auch in Mamma- und Ovarialkarzinomen (63).

1.8.1. Regulation von CDK1

CDK1 ist während des ganzen Zellzyklus über vorhanden, aber ihre Aktivität wird subtil durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert (170).

Cyclin-Dependent-Kinasen haben eine zweilappige Struktur. Das Reaktionszentrum ist mit der C-Helix des kleinen Lappchens blockiert (171). Die Bindung eines Cyclins verändert die Konformation, ist aber nicht ausreichend für die vollständige Aktivierung der CDK (95). Die Phosphorylierung des T-Lobus, welcher die CDK aktiviert, wird durch eine CDK-aktivierende-Kinase (CAK) durchgeführt (172, 173). Dabei sind Cyclin A und Cyclin B die Interaktionspartner von CDK1 (169). Die Kinase-Aktivität von CDK1 wird u.a. reguliert durch Cyclin-Akkumulation und -Abbau während des Zellzyklus (63).

Noch vor der Hauptwelle der Cyclin-B1-CDK1 Aktivierung erscheint der Cyclin-B1-CDK1-Komplex während der Prophase am Zentrosom (174, 175). Diese initiale Aktivierung scheint für den Eintritt in die Mitose wichtig zu sein (176). Für die Lokalisation von Cyclin-B1-CDK1 während der Zentrosomenreifung wird Aurora-A benötigt (70, 71). Eine positive Rückkopplung zwischen Aurora-A und Cyclin-B1-CDK1 involviert die Aktivierung der Protein Phosphatase 1 (PP1) durch Cyclin-B1-Cdk1 am Zentrosom (71, 85). Schäden in der DNA führen zur Inhibition der CDK1 durch die Wee-1- und Myt1-Kinase (95).

1.8.2. Ziele von CDK1

CDK1 phosphoryliert über 70 Substrate um den Zellzyklus zu koordinieren (177). So wird der Cyclin-B1-CDK1-Komplex in der späten Prophase aktiviert und beeinflusst die Mitose, indem er durch Phosphorylierung von Laminen die Auflösung der Kernlamina bewirkt (47, 55). CDK1 phosphoryliert auch Mikrotubuli-assoziierte Proteine und Kinesin-verwandte Motorproteine, die für den Aufbau der

mitotischen Spindel notwendig sind (48, 49). Ein weiteres Substrat der CDK1 sind Condensine, welche die Chromosomenkondensation kontrollieren (178, 179). Der Beginn der Kondensation der Chromosomen in der G2-Phase benötigt die Aktivität von Cyclin-A-CDK1. Die weitere Kondensation hängt von Cyclin-B1-CDK1 ab (55).

CDK1 beeinflusst zusätzlich den Anaphase-Promoting-Complex (APC). Der APC hat einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus, indem er Cycline, Aurora A und B sowie andere Proteine abbaut (101, 180). Zudem sind sowohl CDK1 als auch CDK2 in der Lage BRCA2 zu phosphorylieren und so seine Interaktion mit Rad51 zu modulieren (181). Diese Interaktion stimuliert wiederum die DNA-Reparatur während der S-Phase und G2-Phase, sofern notwendig.

1.9. CDK2

Die Cyclin dependent Kinase 2 wurde als Interphase CDK für diese Arbeit ausgewählt. Das CDK2-Gen liegt auf Chromosom 12 q13.2 (63). Die CDK2 ist ein Mitglied der Serin/Threonin Protein Kinase Familie. Sie ist eine katalytische Untereinheit des Cyclin dependent Protein Kinase Komplexes, der essentiell für den G1-S-Phase-Übergang im Zellzyklus ist. Dieser Komplex enthält die regulatorischen Untereinheiten Cyclin A oder E sowie die CDK-Inhibitoren p21 und p27. Die CDK2-Menge bleibt während des Zellzyklus relativ konstant. Allerdings wird ihre Aktivität durch Cyclin A, Cyclin E, CDK aktivierende Kinase (CAK), CDK inhibierende Kinasen und CDK-Inhibitoren wie p21 und p27 reguliert (170).

Ein Teil der Zellen des lymphatischen Gewebes, Plattenepithelien und Drüsenzellen des Gastrointestinaltrakts zeigen eine starke nukleäre Färbung für CDK2, teilweise kombiniert mit gefärbtem Zytoplasma. Die meisten anderen normalen Gewebe sind negativ oder zeigen eine schwache nukleäre und cytoplasmatische Positivität für CDK2. Auch normales Mamma- und Ovarialgewebe sind als negativ für CDK2 beschrieben. Für Mamma- und Ovarialkarzinome wird eine mäßige bis schwache Färbung beschrieben (63).

Für somatische Zellen scheint CDK2 überflüssig, da sich CDK2-Knockoutmäuse, abgesehen von kleineren Verzögerungen im Zellzyklus und der Unfähigkeit sich fortzupflanzen, normal entwickeln (182, 183).

CDK2 kann die Zellalterung durch das Onkogen Myc unterdrücken (184).

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsgut

Für die vorliegende Arbeit wurden 93 Gewebeproben von Ovarialtumoren aus dem Zeitraum von 1996 bis 2004 untersucht. Zusätzlich wurden insgesamt 76 Mamma-Gewebeproben aus den Jahren 2000, 2001 und 2006 verwendet.

Für die Real-Time-PCR wurden von den OP-Präparaten jeweils kleine Gewebeproben eingefroren. Für die Immunhistochemie wurden Gewebeproben aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Kiel verwendet. Es wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Präparate verwendet. Von allen Präparaten lagen außerdem bereits befundete Routinefärbungen mit Hämatoxylin-Eosin vor.

Die Formalinfixierung und Paraffineinbettung des Operationspräparates sowie die anschließende histologische Diagnosestellung am Präparat, die Bestimmung des pathologischen Tumor- und Lymphknotenstatus nach TNM-Klassifikation, die routinemäßige Bestimmung des histologischen Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus für die Mammakarzinome nach dem Immunreaktiven Score (IRS) (185, 186) sowie die Bestimmung des Her2-neu Status erfolgte durch das Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie im Universitätsklinikum Kiel. In Fällen mit einer mittleren Färbeintensität für Her2neu (Score 2+) wurde zusätzlich eine Chromogen-in-situ-Hybridisierung (CISH) durchgeführt (187, 188).

Teile des Ovarialkollektivs waren auf TMAs (Tissue Micro Arrays) zusammengestellt.

Die retrospektiv erhobenen klinischen Daten sowie das Überleben der Patientinnen wurde den Krankenakten der Universitäts-Frauenklinik Kiel entnommen.

Alle Daten wurden nach den Datenschutzrichtlinien vertraulich behandelt und die Patientinnen waren mit der wissenschaftlichen Nutzung des Gewebes einverstanden.

Folgende Merkmale wurden für alle Patientinnen mit Mammakarzinom erhoben: Geburtsdatum, OP-Datum, Histologie, Tumorstadium nach TNM, Nodalstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, Her2neu-Status, Rezidivstatus und Überlebensstatus.

Folgende Merkmale wurden für alle Patientinnen mit Ovarialkarzinom oder Borderlinetumor erhoben: Geburtsdatum, OP-Datum, Histologie, Tumorstadium nach FIGO, postoperative Chemotherapie und Ansprechen darauf, Rezidivstatus und Überlebensstatus.

Keine der Patientinnen hat eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten.

Für die Patientinnen mit benigner Histologie wurden keine weiteren Daten erhoben.

2.2. Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ermöglicht die Amplifikation und Quantifizierung einer spezifischen Nukleinsäuresequenz durch Detektion des PCR-Produktes in Echtzeit. Die Amplifikation des PCR-Produktes kann entweder durch Fluoreszenz-markierte, Sequenz-spezifische Sonden oder mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs, in dieser Arbeit SYBR-Green® (Life Technologies, Darmstadt), gemessen

werden. Dabei nimmt die Fluoreszenz mit steigender Menge an PCR-Produkten zu. Der Amplifikationszyklus, bei dem die interpolierte, lineare Log-Phase der PCR-Vervielfältigung die Null-Linie kreuzt, ist der Crossing Threshold Wert (CT-Wert), der zur weiteren Berechnung herangezogen wird.

Der Vorteil eines fluoreszierenden Farbstoffes besteht in der generell sensibleren Datenerhebung auch bei geringen PCR-Produktmengen. Zudem müssen keine Fluoreszenz-markierten Sonden speziell für jedes zu untersuchende Gen hergestellt werden.

Der interkalierende Farbstoff SYBR Green® bindet an doppelsträngige DNA-Moleküle. Dabei kommt es zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz. In Lösung dagegen fluoresziert der Farbstoff nur gering. Die Fluoreszenz-Emission steigt mit jedem PCR-Zyklus, da immer mehr doppelsträngige PCR-Produkte anfallen, an die der Farbstoff binden kann. Der genaue Interaktionsmechanismus zwischen SYBR Green® und DNA ist dabei unbekannt.

Der Nachteil dieser Methode ist, dass auch unspezifische PCR-Produkte, v.a. Primer-Dimere, zu einem Anstieg der Fluoreszenz führen. Daher wurden nach abgeschlossener PCR Schmelzkurvenanalysen durchgeführt, wobei unspezifische Bindungen durch ihren niedrigeren Schmelzpunkt identifiziert werden können.

2.2.1. Gewinnung von RNA (RNA-Extraktion)

Alle folgenden Schritte wurden von den Mitarbeitern des onkologischen Labors der Frauenklinik gemäß den unten stehenden Angaben durchgeführt.

Zunächst wurde mithilfe des RNeasy mini Kits von QIAGEN (Hilden, Deutschland) die Gesamt-RNA aus gefrorenem Gewebe gewonnen. Hierzu wurden 30 mg gefrorenes Gewebe mit 600µl RLT-Puffer (im RNeasy mini Kit enthalten) und 6µl β-Mercaptoethanol in ein Lysing-Matrix Röhrchen gegeben und die Probe im Homogenisator zerkleinert. Die Röhrchen wurden für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Danach wurden die Proben mit dem RNeasy mini Kit nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet.

Anschließend wurde der Gehalt an Gesamt-RNA gemessen, um die gewünschte Menge an RNA weiterverwenden zu können. Dafür wurden 2µl der Probe mit 98µl RNase-freiem Wasser in ein neues Röhrchen gegeben. Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA wurden am UV-Spektrometer der Firma Pharmacia bei einer Wellenlänge von 260 / 280 nm gemessen. Die restliche RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2. Umschreiben in cDNA (Synthese der cDNA)

Für die vorliegende Arbeit wurde eine zweischrittige Methode verwendet, d.h. die gewonnenen RNA wurde für die eigentliche PCR mittels reverser Transkription zunächst in cDNA umgeschrieben. Dabei wird zur vorhandenen RNA ein DNA-Hybridstrang gebildet und die RNA abgebaut. Hierzu wurden 500 ng der gewonnenen RNA mit dem Quantitect Reverse Transcription Kit der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Zur Inkubation wurde jeweils der Peltier Thermal Cycler

(Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) verwendet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene cDNA bei -20°C gelagert.

2.2.3. Durchführung der RT-PCR und Schmelzkurvenanalyse

Die PCR wurde mit dem Quanti-Tect-SYBR-Green-PCR-Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde eine 96-well-PCR-Platte für iCycler (Biorad, München) mit 2 µl cDNA, 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix, 8 µl RNase-freiem Wasser und den genspezifischen Primern befüllt (siehe Tabelle 2.2.3.). Ein Probenplatz wurde jeweils als Negativkontrolle mit Wasser und ein Platz mit genomischer DNA befüllt.

Die PCR wurde, gemäß den Angaben im Quanti-Tect-SYBR-Green-Kit, mit einer 15-minütigen Aktivierungsphase bei 95°C begonnen. Anschließend folgten für alle QIAGEN-Primer 40 PCR-Zyklen mit jeweils 15 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 30 Sekunden Annealing bei 55°C und 30 Sekunden Elongation bei 72°C. In der anschließenden Schmelzkurvenanalyse wurden beginnend bei 55°C 80 Zyklen mit einer Erhitzung um je 0,5°C pro Zyklus durchgeführt. Für die PCR von 28S-rRNA wurden die Annealing-Temperatur bei 59°C gewählt und entsprechend auch die Schmelzkurvenanalyse bei 59°C gestartet. Anschließend folgten 72 Zyklen mit einer Erhöhung der Temperatur um 0,5°C je Zyklus bis auf 95°C. Zeigten sich in einer Schmelzkurvenanalyse Primer-Dimere, so wurden die Daten der entsprechenden PCR verworfen.

Für jedes Gewebe wurden o.g. Schritte (RNA-Gewinnung, Umschreiben in cDNA und RT-PCR) mindestens zweimal durchgeführt um Fehler zu minimieren.

Untersuchte mRNA	Verwendeter Primer
Aurora A	QuantiTect Primer Assay Hs_STK6_1_SG Catalog No QT00038213 von Qiagen, Germantown, USA
Aurora B	QuantiTect Primer Assay Hs_AURKB_1_SG Catalog No QT00067403 von Qiagen, Germantown, USA
TPX2	QuantiTect Primer Assay Hs_TPX2_1_SG Catalog No QT00029169 von Qiagen, Germantown, USA
CDK1	QuantiTect Primer Assay Hs_CDC2_1_SG Catalog No QT00042672 von Qiagen, Germantown, USA
CDK2	QuantiTect Primer Assay Hs_CDK2_1_SG Catalog No QT00005586 von Qiagen, Germantown, USA
28S-rRNA	28SrRNA-sense 5'-AAC CAT CTA GTA GCT GGT TC-3' 28SrRNA-antisense 5'-ATA GGT TGA GAT CGT TTC GG-3' von Metabion, Martinsried, Deutschland

Tabelle 2.2.3. Verwendete Primer

2.2.4. Auswertung der Real-Time PCR-Daten

Der CT-Wert beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals oberhalb eines vorab festgelegten Schwellenwertes liegt. Umso mehr mRNA von dem untersuchten Gen exprimiert wird,

umso schneller wird dieser Schwellenwert erreicht, umso kleiner ist also der entsprechende CT-Wert. Um die Effizienz der PCR zur berücksichtigen wurden Standardkurven mit unterschiedlichen Verdünnungen erstellt und die CT-Werte entsprechend korrigiert.

Neben den zu untersuchenden Genen wurde ebenfalls für 28S-rRNA ein CT-Wert ermittelt. Es handelt sich hierbei um ribosomale RNA, die gemeinsam mit den Proteinen des Ribosoms an der Proteinbiosynthese beteiligt ist und nicht für ein bestimmtes Protein kodiert (sog. non-coding-gene). 28S-rRNA wurde für diese Arbeit als Referenzgen (auch Housekeeping-Gene) ausgewählt. Um die normalisierte Menge der Ziel-DNA zu berechnen, wurden die Mittelwerte der erhobenen CT-Werte gegenüber dem gemittelten CT-Wert von 28S-rRNA normalisiert.

2.3. Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren haben bei der Untersuchung von Geweben zunehmende Bedeutung erlangt und gehören heute bei zahlreichen histopathologischen Fragestellungen zum Standard. Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung besteht in der Bindung eines Antikörpers (AK) an das für ihn spezifische Antigen (AG). Im Gewebe vorhandene antigene Determinanten können mit spezifischen Primärantikörpern reagieren, an die wiederum enzymgekoppelte (für die vorliegende Arbeit die Meerrettichperoxidase) Sekundärantikörper binden können. Die dabei entstehenden AG-AK-Komplexe können Lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Dafür werden Chromogene, die von entsprechenden Enzymen katalysiert werden, eingesetzt.

2.3.1. Bestimmung der Färbeparameter und Kontrollen

Sofern keine standardisierte Methode der immunhistochemischen Anfärbung der gesuchten Antigene beschrieben war, wurden zunächst im Rahmen von Vorversuchen die wichtigsten Färbeparameter aufeinander abgestimmt. Hierzu zählten die Auswahl des primären AK selbst, die Stärke seiner Verdünnung und die Dauer seiner Inkubationszeit. Außerdem wurde eine optimale Antigen-Wiederherstellung (AG-Retrieval) ermittelt sowie eine geeignete Detektionsmethode. Im Rahmen der Etablierung der immunhistochemischen Färbemethoden wurden Positivkontrollen an Geweben durchgeführt, die das Antigen ebenfalls enthalten. Hierfür wurden Tonsillen aus dem Bestand des Universitätsklinikums Kiel verwendet. Bei jeder Färbung wurden Substitutionskontrollen als Negativkontrollen mitgeführt. Bei den Negativkontrollen kamen die Präparate nicht mit dem spezifischen AK, sondern mit dem Verdünnungsmedium des primären AK zur Inkubation.

2.3.2. Zusammensetzung der Puffer

Für die folgenden Schritte wurden verschiedene Puffer verwendet. Die entsprechenden Inhaltsstoffe und pH-Werte sind in der Tabelle 2.3.2. aufgeführt. Alle Puffer wurden auf die unten aufgeführte Menge mit Aqua dest. aufgefüllt und auf den jeweiligen pH-Wert adjustiert.

Puffer	Inhaltsstoffe	Menge	pH-Wert
Citrat Puffer	6,3 g Citrat (Merck, Darmstadt)	3 l	6,0
TBS-Puffer (Waschpuffer)	83,6 g NaCl (Walter GmbH, Kiel), 12 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, Darmstadt), 11 ml 25% HCl (Merck, Darmstadt)	10 l	7,4
TEC-Puffer	2,5 g TrisBASE (Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Merck, Darmstadt), 5 g EDTA (Merck, Darmstadt)	10 l	7,8
Tris-EDTA-Puffer mit Tween	12,1 g TrisBASE, 3,7 g EDTA, 3,2 g Tri-Natrium-Citrat (Merck, Darmstadt), 5 ml Tween 20 (Polysorbat 20, Merck, Darmstadt)	10 l	9,0

Tabelle 2.3.2. Verwendete Puffer mit Inhaltsstoffen und pH-Wert.

2.3.3. Herstellung von Paraffin-Schnitten

Zur Herstellung der Schnittpräparate wurden von den gekühlten Präparat- und Arrayblöcken an einem Mikrotom (Reichert und Jung, Nussloch) 2-3 μm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden zunächst in ein Wasserbad bei Raumtemperatur gebracht und dann in ein auf 38°C erwärmtes Wasserbad überführt. Nach Ausdehnung und Glättung der Schnitte wurden diese auf Objektträger (Superfrost®, Menzel, Braunschweig) aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht in einem Brutschrank (Memmert GmbH und CoKG, Schwabsch) bei 37°C.

2.3.4. Vorbereitende Schritte zur Immunhistochemie

Zur Vorbereitung für die Immunhistochemischen Arbeitsschritte mussten die Paraffinschnitte zur Entfernung des Paraffins für 20 Minuten in Xylol (Walter GmbH, Kiel) eingebracht und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (3x100%, 2x96%, 2x70% Ethanol (Merck, Darmstadt) für jeweils 2 Minuten) rehydriert werden. Nach Abschluss der letzten Stufe wurden die Präparate in frischen Waschpuffer überführt. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurden die Schnittpräparate zwischen den folgenden Schritten stets in Waschpuffer aufbewahrt.

Formalin-induziert kommt es zu einer Veränderung vieler Epitopstrukturen in den Präparaten durch die Bildung chemischer Quervernetzungen. Diese können unter Verwendung eines geeigneten Puffers durch Hitze einwirkung wieder aufgebrochen werden (HIER = heat induced epitope retrieval). Dieser Begriff bezeichnet den Prozess der Wiederherstellung der Immunreaktivität eines Antigens.

Hierbei wurden die Schnittpräparate in einem Liter des entsprechenden Puffers (siehe Tabelle 3.4.) für 20 min bei 900 Watt in der Mikrowelle (Modell R-332, Sharp Electronics, Hamburg) erhitzt. Nach einer Abkühlungsphase von 20 min Dauer wurden die Schnittpräparate unter langsam fließendem Leitungswasser in 5 min bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Präparate dreimal für je eine Minute mit frischem Waschpuffer gewaschen.

Nach den vorbereitenden Schritten erfolgte die Blockierung der Endogenen Peroxidase mit DAKO Cytomation Endogene Peroxidase Blocking Reagent für 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Danach wurden die Präparate wiederum drei mal eine Minute lang mit frischem Waschpuffer gewaschen.

Zur Minderung von unspezifischen Bindungsreaktionen der Primärantikörper an freien reaktiven Gewebsantigenen erfolgte, wenn nötig, eine Inkubation mit einem verdünnten Serum. Zu den verwendeten Seren, deren Verdünnung und Inkubationszeiten siehe Tabelle 2.3. Die Seren wurden anschließend nicht abgewaschen, sondern lediglich abgegossen, bevor der Primäre AK aufgebracht wurde. Alternativ wurde, bei Verwendung des ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kits der zugehörige Protein-Block verwendet, der nach 5 min wieder mit Waschpuffer abgewaschen wurde.

2.3.5. Primäre Antikörper

Zur Anwendung kommen polyklonale und monoklonale AK verschiedener Spezies oder Zellkulturüberstände. Die Paraffinschnitte wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper in der feuchten Kammer inkubiert. Zu den verwendeten primären Antikörpern, ihrer Inkubationszeit, der Inkubationstemperatur und der jeweiligen Verdünnung siehe Tabelle 2.3. Danach wurden die Präparate wiederum drei mal eine Minute mit frischem Waschpuffer gewaschen.

2.3.6. Sekundäre Antikörper

HRP-Methode (EnVision)

HRP steht für Horseradish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase) und wird aus der Wurzel der Meerrettichpflanze gewonnen. HRP besitzt eine Eisenhaltige Häm-Gruppe als aktives Zentrum und hat die Fähigkeit in Anwesenheit eines Elektronen-Donors einen lichtmikroskopisch sichtbar braunen, unlöslichen Komplex zu bilden. Bei der HRP-Methode bindet der Primärantikörper an einen HRP-gekoppelten (konjugierten) Sekundärantikörper. Als Chromogen wurde 3'3-Diaminobenzidin (DAB) eingesetzt.

Das Aufbringen des Sekundärantikörpers erfolgte nach Inkubation mit dem unkonjugierten primären AK und anschließender Waschung in TBS. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Nach weiteren Waschungen in TBS folgte die Entwicklung mit DAB für 1-10 min bis zu einer sichtbaren Braunfärbung der Positivkontrolle (DAB+Chromogen X 50, Dako, Glostrup, Dänemark). Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt.

HRP-Methode (Zymed)

Bei Verwendung des ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kits wurden die Präparate zur Verstärkung des Signals nach dem primären Antikörper mit dem im Kit enthaltene PostBlock-Reagenz für 20 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das HRP-Polymer, in dem Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Meerrettich-Peroxidase kovalent verbunden sind, aufgetragen und die Präparate für 30 min damit inkubiert. Die Entwicklung erfolgte wie oben beschrieben wieder mit DAB. Dabei wurde eine noch größere Verstärkung des Signals erreicht als mit dem EnVision-Kit.

2.3.7. Gegenfärbung und Eindeckeln

Nach Abschluss der immunhistochemischen Färbung wurden die Präparate mit Leitungswasser gespült und zur sichtbaren Darstellung des umliegenden Gewebes einer Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalan (Roth, Karlsruhe) für 10 min unterzogen. Eine 30-minütige Spülung mit Leitungswasser zum

Nachbläuen schloss sich an. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x70%, 2x96%, 3x100% Ethanol für jeweils 2 Minuten) wurden die Präparate zügig dehydriert und anschließend wieder in ein Xylolbad eingebracht. Zur Einbettung wurden die Präparate mit LEIKA-Eindeckmedium betropft und dann mit einem Eindeckgläschen (Menzel, Braunschweig) luftfrei verschlossen. Zuletzt erfolgte die Aushärtung des Eindeckmediums für mindestens zwei Stunden unter dem Abzug.

Antigen	HIER	Hintergrund Block	Primärer Antikörper	Verdünnung in DAKO Cytomation Antibody Diluent	Inkubationszeit und -temperatur	Detektionssystem
Aurora A	TEC pH7,8	Goat Serum (Dako, Glostrup, Dänemark)10 % in TBS	Rabbit Monoclonal IgG Anti Human Clone ID: EP1008Y Epitomics Catalog#: 1800-1	1:500	30 Minuten bei Zimmer-temperatur	EnVision (Dako, Glostrup, Dänemark)
Aurora B	TEC pH7,8	keine	Polyclonal Rabbit Anti Human Lot No. ICH-00003-1 Bethyl Laboratories Catalog No. ICH-00003	1:250	Über Nacht bei 4°C	Envision
Repp86	Citrat pH6	Goat Serum 20% in TBS	Cell Culture Supernatant from the Department of Pathology, Schleswig-Holstein University Hospitals, Kiel Clone: 04.11.04	Unverdünnt	30 Minuten bei Zimmer-temperatur	Envision
Ki67	TEC pH 7,8	keine	Monoclonal Mouse Anti-Human Clone MIB-1 DAKO Code No. M7240 18.12.02	1:50	30 Minuten bei Zimmer-temperatur	Envision
CDK1	TEC pH7,8	Protein Block (Zytomed systems, Berlin), 5 Minuten	Rabbit monoclonal IgG Anti Human Clone ID: YE324 Epitomics Lot#: YC062102	1:50	Über Nacht bei 4°C	ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (Zytomed systems, Berlin)
CDK2	Tris-EDTA mit Tween pH9,0	Protein Block, 5 Minuten	Mouse Monoclonal Anti Human, Mouse, Rat Clone: 2B6 Lot No. ab2363	1:25	30 Minuten bei Zimmer-temperatur	ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit

Tabelle 2.3. Verwendete Antikörper, Retrieval, Verdünnungen und Inkubationszeiten.

2.3.8. Mikroskopische Auswertung

Die immunhistochemischen Färbungen wurden ohne Kenntnis der klinischen Daten ausgewertet. Eine stichprobenartige Kontrolle der Ergebnisse erfolgte unabhängig durch Herrn Prof. Dr. Wolfram Klapper (Leiter der Sektion Hämatopathologie im Institut für Pathologie der Universität Kiel). Die Übereinstimmung der Auszählungen konnte statistisch nachgewiesen werden.

Die Bewertung der Schnittpräparate wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Diastar Nr. 26595, Reichert) in 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Bei einer positiven Farbreaktion stellten sich die Zellkerne bzw. das Zytoplasma braun da. Sie ließen sich deutlich von negativen Zellen und Stroma abgrenzen. Eine Negativität bewies sich durch eine Blaufärbung.

Mit Hilfe eines Zellzählgerätes konnte der Anteil der Zellen mit einer positiven Kernreaktion ermittelt werden. Als positiv wurden nur Zellkerne gewertet deren Kernfärbung eindeutig war und den gesamten Kern umfasste. So wurden pro Objektträger 500, bzw. pro Punkt auf dem Tissue-Mikro-Array (TMA) 400 Zellen, ausgezählt und davon der prozentuale Anteil der für das Antigen positiven Zellen ermittelt. Die Intensität der Anfärbung wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Unten findet sich eine exemplarische Auswahl an immunhistochemischen Färbungen, die für diese Doktorarbeit verwendet wurden.

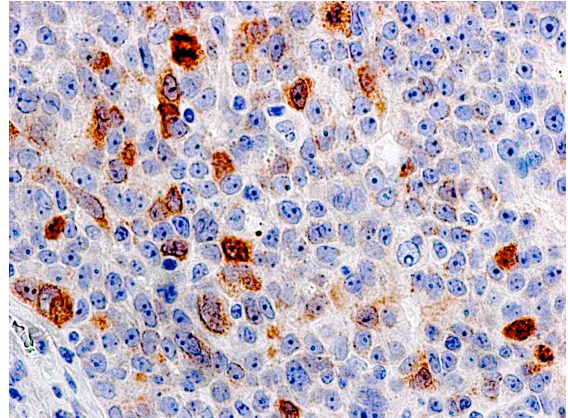
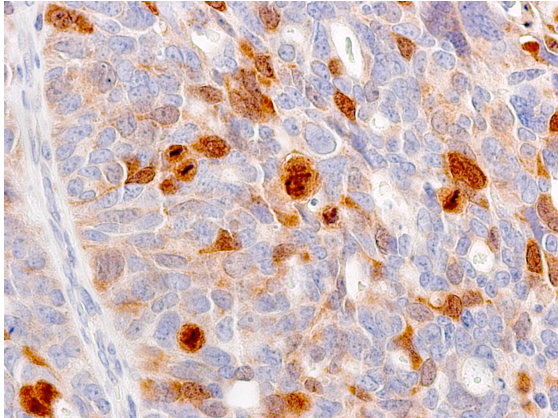


Abbildung 2.3.a. Immunhistochemische Färbung von Aurora A an Ovarialkarzinomen. Deutlich sind die eingefärbten Mitosefiguren im linken Bild zu erkennen.

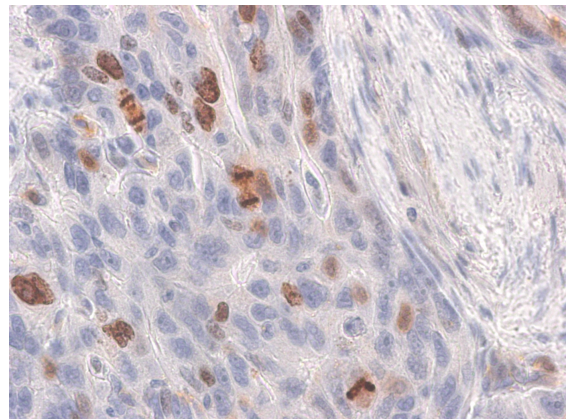
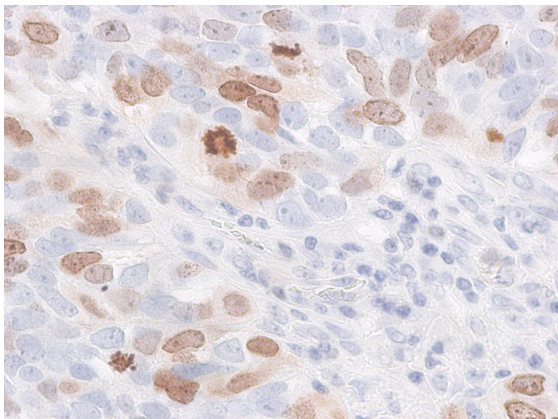


Abbildung 2.3.b. Immunhistochemische Färbung von Aurora B an Ovarialkarzinomen. In beiden Bildern sind deutlich eingefärbte Mitosefiguren zu sehen.

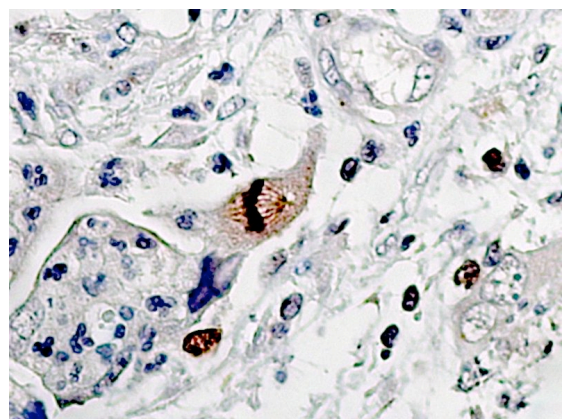
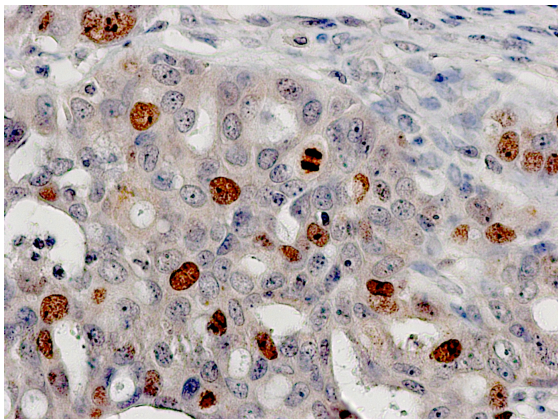


Abbildung 2.3.c. Immunhistochemische Färbung von Repp86 an Ovarialkarzinomen. Im rechten Bild lässt sich gut die angefärbte Mitosespindel erkennen.

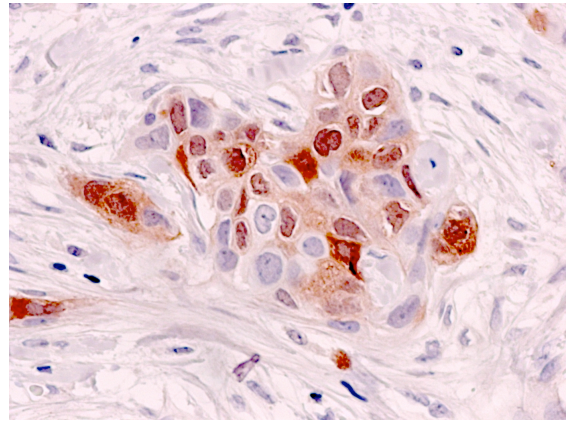
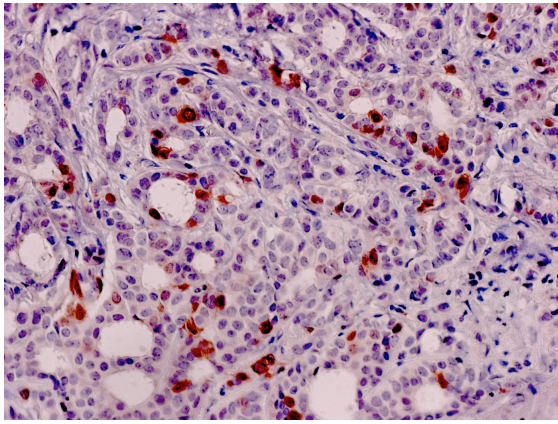


Abbildung 2.3.d. Immunhistochemische Färbung von CDK 1 an Mammakarzinomen.

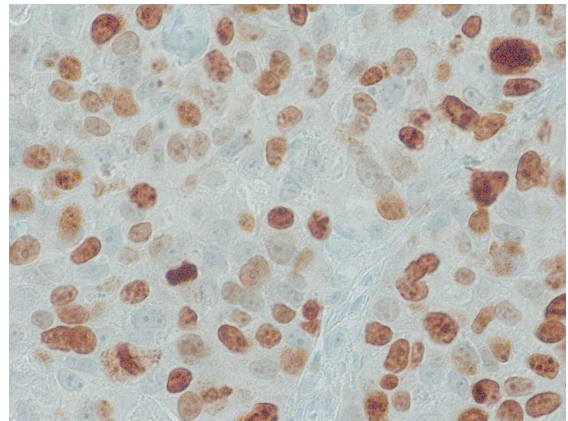
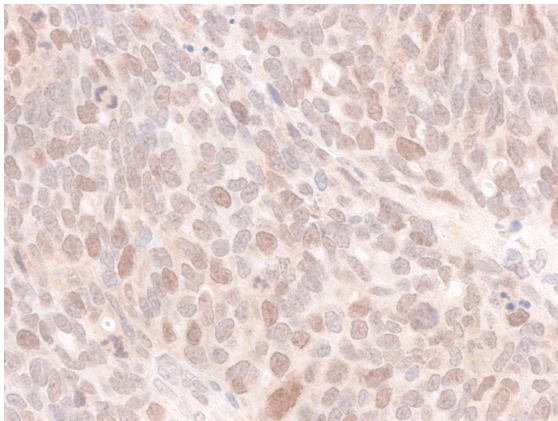


Abbildung 2.3.e Immunhistochemische Färbung von CDK2 beim Ovarialkarzinom (links) und Ki67 beim Mammakarzinom (rechts).

2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 20. Für die Korrelationen der einzelnen Marker untereinander wurde der Pearsons-Korrelationskoeffizient ermittelt. Um zu ermitteln, ob sich die Expression in benignem Mammagewebe und Mammakarzinomen unterscheidet, wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Für die Unterscheidung zwischen benignem Ovarialtumor, Borderlinetumor und Ovarialkarzinom wurde der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Um die Verbindung einzelner Marker mit dem Grading, der Tumorgöße, dem FIGO-Stadium oder dem Hormonrezeptorstatus darzustellen, wurde der Jonckheere-Terpstra-Test nach geordneten Alternativen bei unabhängigen Stichproben angewendet. Ein möglicher Zusammenhang mit dem Nodalstatus (Mammakarzinome), der Her2neu-Expression (Mammakarzinome) oder dem Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie (Ovarialkarzinome) wurde ebenfalls mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Die Ergebnisse für das Überleben der Patientinnen wurden mit der Kaplan-Meyer Methode für die univariate Überlebensanalyse ermittelt. Mit dem Logranktest wurden die verschiedenen Überlebenskurven verglichen. Eine Signifikanz wurde für p-Werte $<0,05$ angenommen. p-Werte von $>0,05$ bis $<0,10$ wurden im Sinne eines Trends interpretiert. Für die Darstellung von Unterschieden in einzelnen Gruppen wurden Balkendiagramme verwendet. Für die Darstellung der Überlebensanalysen wurden Kaplan-Meyer-Kurven verwendet.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Evaluation der Protein- und mRNA-Expressionen von Aurora A, Aurora B, Repp86, Ki67, CDK1 und CDK2 in einem Kollektiv aus Mammakarzinomgeweben und einem Vergleichskollektiv benigner Mammaproben. Die gleichen Untersuchungen wurden auch an einem Kollektiv von Ovarialmalignom-, Borderlinitumor- und benignen Ovarialtumorgeweben durchgeführt.

Es erfolgte eine Korrelation der immunhistochemischen sowie der Real-Time-PCR-Daten mit klinisch pathologischen Parametern sowie dem Gesamtüberleben (Ovarkollektiv) bzw. dem rezidivfreien Überleben (Mammakollektiv) um die Frage einer möglichen diagnostischen oder prognostischen Bedeutung der untersuchten Marker zu klären.

3.1. Ergebnisse Mammakollektiv

3.1.1. Altersverteilung und Vorbehandlung im Mammakollektiv

Als Zeitpunkt der Diagnosestellung wurde das Datum der primären OP festgesetzt. Das mediane Alter aller Patientinnen bei Diagnosestellung betrug 54 Jahre. Die jüngste Patientin war 31 Jahre alt, die älteste 77 Jahre.

Keine der Patientinnen hat eine medikamentöse Vorbehandlung erhalten.

3.1.2. Tumorstadium, Nodalstatus und Fernmetastasen

Das gesamte Mammakollektiv umfasste 76 Patientinnen, davon 22 (28,9%) mit benigner und 54 (71,1%) mit maligner Histologie. Zum genauen Tumorstadium siehe Tabelle 3.1.2. Bezüglich des Nodalstatus wurde erfasst, ob tumorbefallene Lymphknoten vorlagen oder nicht. Der genaue Nodalstatus wurde für die weiteren Untersuchungen nicht verwendet. Im hier vorliegenden Kollektiv waren 12 (22,2%) Patientinnen nodal-positiv und 34 (63%) nodal-negativ. Von 8 (14,8%) Patientinnen fehlten Angaben zum Nodalstatus. Eine Patientin hatte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits ossäre Metastasen. Die Daten gingen in die weitere Auswertung ein, allerdings wurde die Patientin von Überlebensanalysen ausgeschlossen.

Tumorgröße gemäß TNM	Anzahl	Prozentualer Anteil
Benigne	22	28,9%
T1a	1	1,3
T1b	6	7,9%
T1c	23	30,3%
T2	17	22,4%
T2m	2	2,6%
T3	1	1,3%
Unbekanntes T	4	5,3%
Gesamt	76	100%

Tabelle 3.1.2. Tumorstadium „T“ des Mammakollektivs

3.1.3. Histologische Zusammensetzung des Kollektivs

Die größte Gruppe der malignen Tumoren bildeten die invasiv-ductalen Tumoren mit N=47 (61,8% aller Proben bzw. 87% der malignen Tumoren). Die zweitgrößte Gruppe waren die invasiv-lobulären Tumoren mit N=6 (7,9% aller Proben bzw. 11,1% der malignen Tumoren). Ein maligner Tumor wurde nicht genauer differenziert (1,3% aller Proben bzw. 1,9% der malignen Tumoren). Die restlichen 22 Gewebeproben waren benigner Natur (28,9%). Histologisch lagen dem fibrös zystische Mastopathien (N=11, 14,5%), einfache Hyperplasien ohne Atypien (N=3, 3,9%), Fibroadenome (N=2, 2,9%), ein Milchgangspapillom (N=1, 1,3%), eine sklerosierende Adenose (N=1, 1,3%) oder altersentsprechendes Mammagewebe (N=4, 5,3%) zu Grunde.

3.1.4. Einteilung des Kollektivs nach dem Grading

Das Mammakollektiv wurde nach dem Tumorgrading nach Elston und Ellis eingeteilt. Bei den 22 (28,9%) benignen Gewebeproben entfiel diese Einteilung. Acht (10,5% aller Proben) Tumorproben wurden als gut differenziert (G1), die Mehrzahl mit 30 (39,5% aller Proben) Proben war mäßiggradig differenziert (G2) und 15 (19,7% aller Proben) wurden als schlecht differenziert eingestuft (G3). Für ein Karzinom (1,3% aller Proben) fehlte die Angabe zum Grading.

3.1.5. Hormonrezeptorstatus der Mammakarzinome

Für die Mammakarzinome wurde der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus nach dem Immunreaktiven Score nach Remmele und Stegner (IRS) erfasst. Zum detaillierten Hormonrezeptorstatus siehe Tabelle 3.1.5.

IRS Hormonrezeptor	ER Anzahl	ER prozentualer Anteil	PR Anzahl	PR prozentualer Anteil
0	4	7,4%	8	14,8%
1	3	5,6%	4	7,4%
2	2	3,7%	7	13%
3	0	0%	1	1,9%
4	0	0%	4	7,4%
6	8	14,8%	12	22,2%
8	7	13%	1	1,9%
9	1	1,9%	4	7,4%
12	22	40,7%	6	11,1%
Fehlend	7	13%	7	13%
Gesamt	54	100%	54	100%

Tabelle 3.1.5. Hormonrezeptorstatus der Mammakarzinome

3.1.6. Her2neu-Status der Mammakarzinome

Die Mammakarzinome wurden hinsichtlich einer Her2neu-Überexpression untersucht. Als „Her2neu-positiv“ galten Tumoren mit dem Score 3+ in der Immunhistochemie oder mit dem Score 2+, bei denen in der CISH-Analyse eine Überexpression des Her2neu-Gens nachgewiesen wurde. Von den 54

Mammakarzinomen waren 6 (11,1% der malignen Tumoren) Her2neu-positiv und 43 (79,6% der malignen Tumoren) Her2neu-negativ. Für 5 (9,3% der malignen Tumoren) Karzinome fehlten die Angaben.

3.1.7. Einteilung der Mammakarzinome nach den intrinsischen Subtypen

Wie oben erwähnt wurde von der St. Gallen Konferenz eine Einteilung der Mammakarzinome in intrinsische Subtypen empfohlen. Dabei werden Luminal A (Hormonrezeptor positiv, Her2neu negativ, Ki67<14%), Luminal B (Hormonrezeptor positiv, Her 2 neu negativ, Ki67>14%), Luminal B Her2neu positiv (Hormonrezeptor positiv, Her2neu positiv), Her2neu überexprimierende (Hormonrezeptor negativ, Her2neu positiv) und Triple negative Tumoren (Hormonrezeptor negativ, Her2neu negativ) unterschieden.

Intrinsischer Subtyp	Anzahl	Prozentualer Anteil
Luminal A	8	14,8%
Luminal B	25	46,3%
Luminal B Her2neu positiv	5	9,3%
Her2neu überexprimierend	1	1%
Triple negativ	6	6%
Fehlend	9	16,7%
Gesamt	54	100%

Tabelle 3.1.7. Intrinsischer Subtyp der Mammakarzinome.

3.1.8.1. Immunhistochemische Expression in benignem Mammagewebe

Insgesamt zeigte sich in den benignen Mammageweben nur eine schwache Expression der untersuchten Proteine. Für alle Proben wird der prozentuale Anteil der für den untersuchten Marker positiven Zellen angegeben. Die Anzahl, Mediane, Mittelwerte, Standardabweichung sowie die minimale und die maximale Expression sind in Tabelle 3.1.8.1. aufgelistet.

Protein	Anzahl	Mittelwert	Median	Standardabw.	Min.	Max.
Aurora A	22	0,31	0	0,44	0	1,0
Aurora B	22	0,99	0,50	1,47	0	5,0
Repp86	21	0,29	0,50	0,30	0	0,8
Ki67	22	1,59	0,50	2,94	0	13,8
CDK1	22	2,64	1,50	2,90	0	9,0
CDK2	20	0,80	0,50	1,11	0	4,0

Tabelle 3.1.8.1. Immunhistochemische Expression von Aurora A, Aurora B, Repp86, Ki67, CDC2 und CDK2 in benignem Mammagewebe. Die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichung, Minimum und Maximum sind in Prozent positiver Tumorzellen angegeben.

3.1.8.2. Immunhistochemische Expression in Mammakarzinomen

In den Karzinomen zeigte sich eine höhere Expression als im benignen Gewebe. Für alle Proben wird der prozentuale Anteil der für den untersuchten Marker positiven Zellen angegeben. Die Anzahl der

untersuchten Proben, Mediane, Mittelwerte, Standardabweichung sowie die minimale und die maximale Expression sind in Tabelle 3.1.8.2. aufgelistet.

Protein	Anzahl	Mittelwert	Median	Standardabw.	Min.	Max.
Aurora A	50	17,59	14,30	14,82	0,8	54,4
Aurora B	50	13,58	13,50	9,78	1,4	38,3
Repp86	49	13,24	13,24	9,80	0,4	36,4
Ki67	48	31,42	31,42	19,93	3,2	69,0
CDK1	41	33,24	33,24	18,43	4,0	75,0
CDK2	41	29,80	29,80	15,57	0,5	89,0

Tabelle 3.1.8.2. Immunhistochemische Expression von Aurora A, Aurora B, Repp86, Ki67, CDK1 und CDK2 in Mammakarzinomen. Die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichung, Minimum und Maximum sind in Prozent positiver Tumorzellen angegeben.

3.1.9.1. mRNA in benignem Mammagewebe

Für alle Proben wird die gegen 28s-rRNA normalisierte Menge der Ziel DNA angegeben. Die Anzahl der untersuchten Proben, Mediane, Mittelwerte, Standardabweichung sowie die minimale und die maximale Expression sind in Tabelle 3.1.9.1. aufgelistet.

Marker	Anzahl	Mittelw.	Median	Stand.	Minim.	Maxim.
Aurora A	2	0,4939	0,4939	0,0057	0,4899	0,4980
Aurora B	2	0,5163	0,5163	0,0002	0,5162	0,5165
Repp86	2	0,4657	0,4657	0,0137	0,4561	0,4754
CDK1	2	0,5169	0,5169	0,0242	0,4997	0,5340
CDK2	2	0,5572	0,5572	0,0050	0,5537	0,5607

Tabelle 3.1.9.1. mRNA in benignem Mammagewebe. Angegeben ist für Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum jeweils die normalisierte Menge der Ziel-DNA.

3.1.9.2. mRNA in Mammakarzinomen

Für alle Proben wird die gegen 28s-rRNA normalisierte Menge der Ziel DNA angegeben. Die Anzahl der untersuchten Proben, Mediane, Mittelwerte, Standardabweichung sowie die minimale und die maximale Expression sind in Tabelle 3.1.9.2. aufgelistet.

Marker	Anzahl	Mittelw.	Median	Stand.	Minim.	Maxim.
Aurora A	40	0,5270	0,5154	0,0548	0,3866	0,7093
Aurora B	40	0,5561	0,5439	0,0564	0,4422	0,7420
Repp86	40	0,5671	0,5662	0,0573	0,4220	0,7197
CDK1	40	0,5740	0,5642	0,0601	0,4283	0,7358
CDK2	40	0,5449	0,5348	0,0566	0,3991	0,7108

Tabelle 3.1.9.2. mRNA in Mammakarzinomen. Angegeben ist für Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum jeweils die normalisierte Menge der Ziel-DNA.

3.1.10.1. Korrelation der Proteinexpressionen untereinander

Bei der Korrelationsanalyse der einzelnen immunhistochemischen Marker untereinander ergab sich, dass alle signifikant miteinander korrelieren. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson sowie die der Korrelationsanalyse zugehörigen p-Werte sind in Tabelle 3.1.10.1. aufgelistet.

Pearsons K./ p-Wert	Aurora A	Aurora B	Repp86	Ki67	CDK1	CDK2
Aurora A	-	0,925	0,914	0,861	0,733	0,808
Aurora B	p<0,001	-	0,966	0,909	0,785	0,866
Repp86	p<0,001	p<0,001	-	0,940	0,773	0,838
Ki67	p<0,001	p<0,001	p<0,001	-	0,710	0,801
CDK1	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	-	0,796
CDK2	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	-

Tabelle 3.1.10.1. Korrelation der Proteinexpressionen untereinander. Dabei ist in der rechten oberen Hälfte jeweils der Pearsons-Korrelationskoeffizient (fett gedruckt) und in der linken unteren Hälfte der zugehörige p-Wert angegeben.

3.1.10.2. Korrelation der mRNA-Mengen untereinander

Die Korrelation der einzelnen Real-Time-PCR-Ergebnisse untereinander ergab, dass alle mRNA-Mengen untereinander korrelieren. Die genauen Korrelationskoeffizienten und die dazugehörigen p-Werte sind in Tabelle 3.1.10.2. aufgelistet.

Pearsons K./ p-Wert	Aurora A	Aurora B	Repp86	CDK1	CDK2
Aurora A	-	0,951	0,823	0,918	0,920
Aurora B	<0,001	-	0,850	0,939	0,856
Repp86	<0,001	<0,001	-	0,870	0,697
CDK1	<0,001	<0,001	<0,001	-	0,838
CDK2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-

Tabelle 3.1.10.2. Korrelation der mRNA-Mengen untereinander. Dabei ist in der rechten oberen Hälfte jeweils der Pearsons-Korrelationskoeffizient (fett gedruckt) und in der linken unteren Hälfte der zugehörige p-Wert angegeben.

3.1.10.3. Korrelation der Proteinexpressionen mit den mRNA-Mengen

Die Korrelation der Real-Time-PCR-Ergebnisse mit den immunhistochemischen Expressionen ergab nur in einem Fall eine signifikante Korrelation. Und selbst hierbei sprach der Korrelationskoeffizient nicht für einen sehr engen Zusammenhang der untersuchten Variablen.

3.1.11. Unterscheidung von benignem Mammagewebe und Mammakarzinom

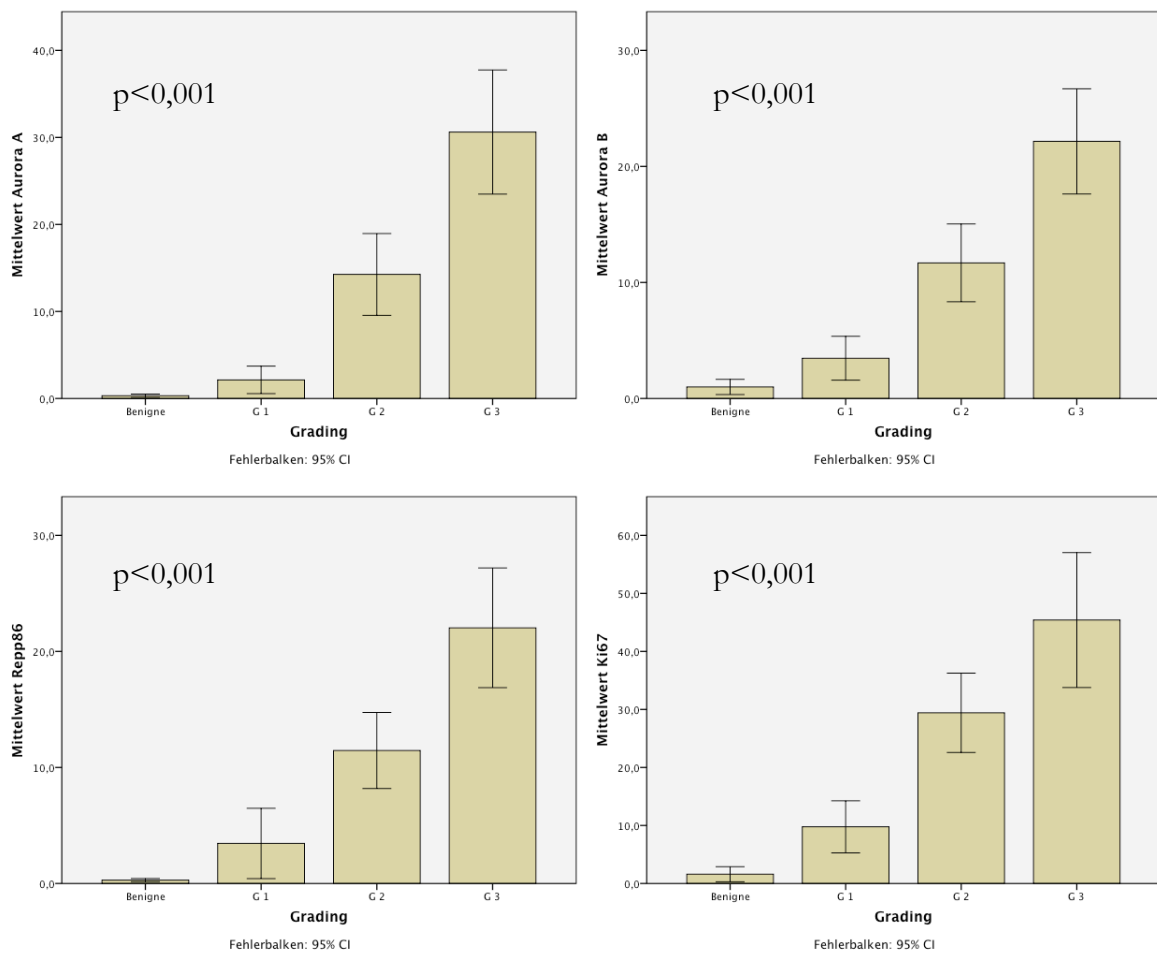
Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde ermittelt, ob sich die Proteinexpression in benignem und malignem Mammagewebe unterscheidet. Hierbei ergab sich, dass alle untersuchten Proteine (Aurora A, Aurora B, Repp86, Ki67, CDC2 und CDK2) in Karzinomgewebe höher exprimiert sind als in benignem Mammagewebe (p<0,001).

Bei den Real-Time-PCR-Daten ergab sich, dass Repp86 in benignem Gewebe signifikant höher exprimiert ist als in Karzinomgewebe. Für CDK1 ergab sich ein Trend, dass auch dort eine höhere Expression in Karzinomgewebe vorlag ($p=0,098$). Für alle anderen Marker ergab sich keine unterschiedliche Expression: Aurora A ($p=0,231$), Aurora B ($p=0,149$) und CDK2 ($p=0,771$).

3.1.12. Korrelation mit dem Grading des Mammakollektivs

Die statistische Auswertung ergab, dass alle untersuchten Proteine (Aurora A, Aurora B, Repp86, Ki67, CDK1 und CDK2) stark mit dem Tumorgrading korrelieren ($p<0,001$). Abbildung 3.1.12. zeigt die Expression der einzelnen Marker aufgeteilt nach dem Grading.

Für die Real-Time-PCR-Daten konnte eine solche Korrelation nicht gezeigt werden: Aurora A ($p=0,277$), Aurora B ($p=0,107$), Repp86 ($p=0,288$), CDK1 ($p=0,783$), CDK2 ($p=0,326$).



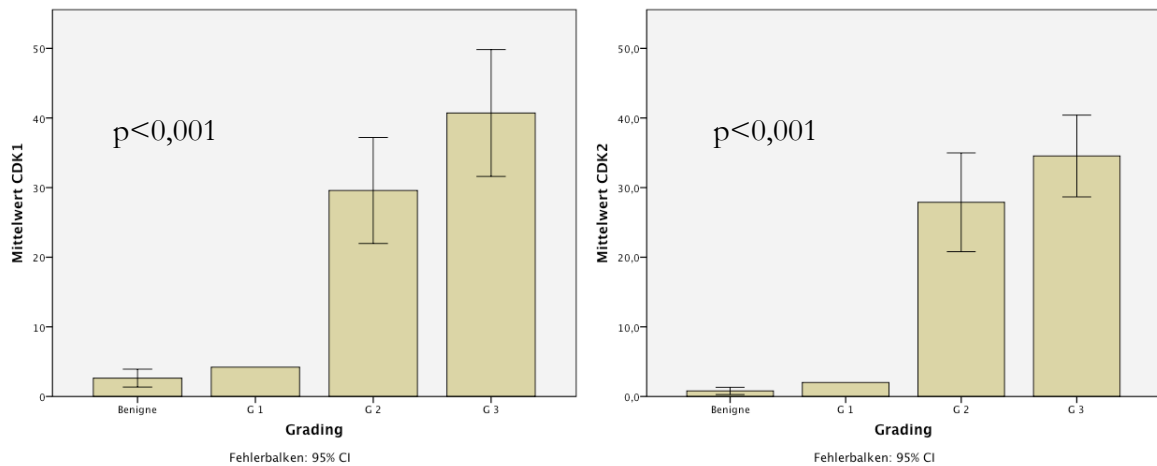


Abbildung 3.1.12. Proteinexpression (Immunhistochemie) in Bezug auf das Grading bei Mammakarzinomen. Auf der Y-Achse ist jeweils der Mittelwert des untersuchten Proteins in Prozent abgebildet, Auf der X-Achse die Unterteilung der Karzinome je nach Grading. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall. Bei unendlichem Ergebnis wurden die Fehlerbalken entfernt.

3.1.13. Korrelation mit der Tumorgröße

Um die Korrelation mit dem Tumorstadium zu ermitteln, wurden die Stadien T1a-T1c unter „T1“, sowie T2 und T2m unter „T2“ zusammengefasst. Bei der Analyse ergab sich, dass die Expression der untersuchten Proteine (Aurora A ($p=0,224$), Aurora B ($p=0,253$), Repp86 ($p=0,253$), Ki67 ($p=0,328$), CDK1 ($p=0,501$) und CDK2 ($p=0,432$)) nicht mit dem Tumorstadium korrelierte. Bei der gleichen Korrelationsanalyse mit den Real-Time-Daten ergab sich ein Trend dafür, dass ein höheres Tumorstadium mit einer höheren Expression von Repp86 einhergeht ($p=0,060$). Für die anderen Marker (Aurora A ($p=0,448$), Aurora B ($p=0,200$), CDK1 ($p=0,108$) und CDK2 ($p=0,377$)) ergab sich keine Korrelation mit der Tumorgröße.

3.1.14. Korrelation mit dem Nodalstatus

Um die Korrelation mit dem Nodalstatus zu untersuchen wurden die Mammakarzinome in nodalpositiv und nodalnativ unterteilt. Bei der Analyse zeigte sich eine signifikant höhere Expression von Aurora A ($p=0,048$) und CDK1 ($p=0,049$) in nodalpositiven Tumoren. Es fand sich ebenso ein Trend, dass auch die Expression von Repp86 ($p=0,065$) in nodalpositiven Tumoren höher ist. Für Aurora B ($p=0,151$), Ki67 ($p=0,221$) und CDK2 ($p=0,285$) ließ sich eine solche Korrelation nicht nachweisen. In der Korrelationsanalyse mit den Real-Time-Daten fand sich ein Trend, dass nodalpositive Tumoren mehr mRNA für Repp86 ($p=0,080$) und CDK1 ($p=0,058$) bereitstellen. Für die anderen mRNA-Mengen ließ sich kein Zusammenhang nachweisen (Aurora A ($p=0,683$), Aurora B ($p=0,327$), CDK2 ($p=0,582$)).

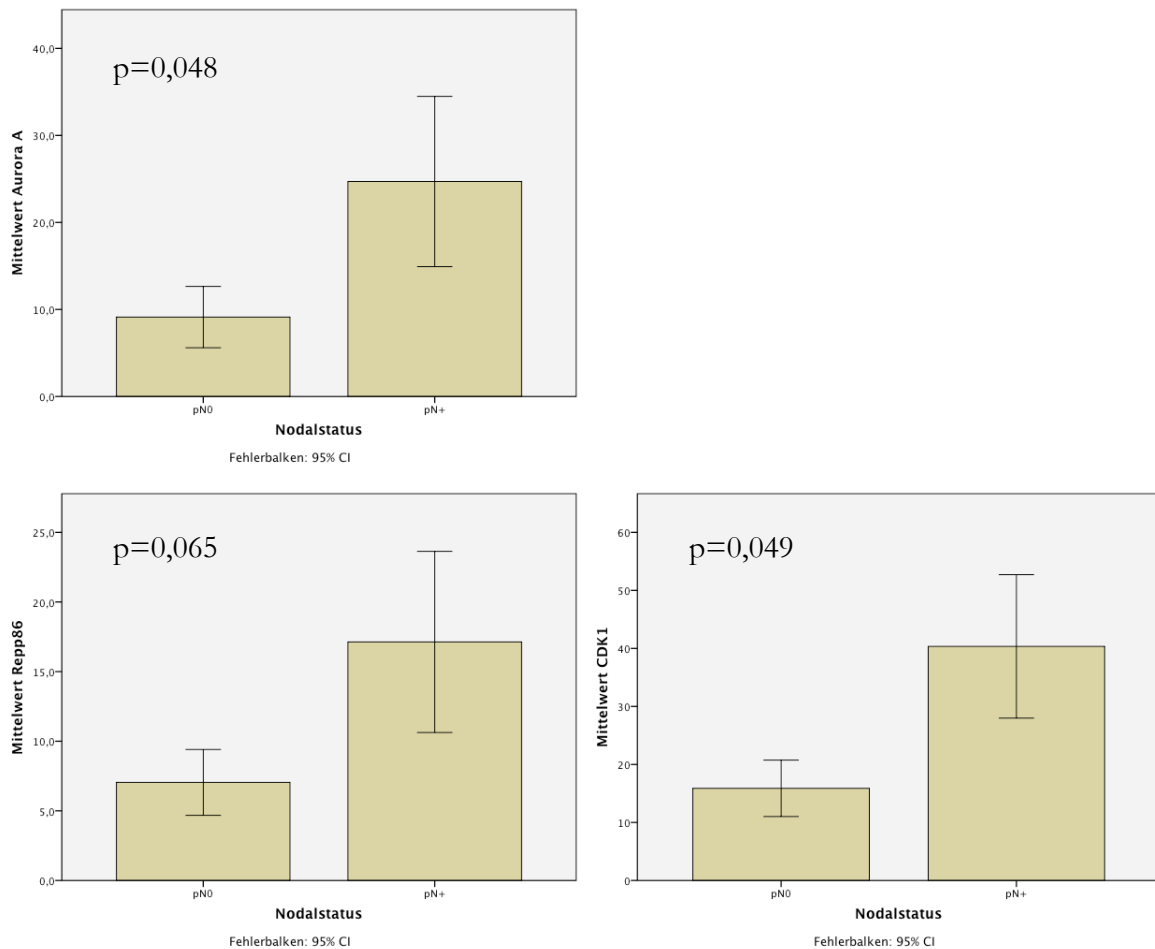


Abbildung 3.1.14. Proteinexpression in Bezug auf den Nodalstatus bei Mammakarzinomen. Auf der Y-Achse ist jeweils der Mittelwert für das untersuchte Protein abgebildet, auf der X-Achse sind die Gruppen nach dem Nodalstatus unterteilt.

3.1.15. Korrelation mit dem Hormonrezeptorstatus

Für die Korrelationsanalyse mit dem Hormonrezeptorstatus wurde ein IRS von 0-1 als „negativ“, ein IRS von 2-4 als „schwach positiv“, ein IRS von 6-8 als „mäßig positiv“ und ein IRS von 9-12 als stark positiv zusammengefasst. Der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus wurden dabei getrennt betrachtet.

Es ergab sich, dass ein höherer Östrogenrezeptorstatus mit einer niedrigeren Proteinexpression von Aurora A ($p=0,017$), Aurora B ($p=0,010$), Repp86 ($p=0,006$), Ki67 ($p=0,011$) und CDK2 ($p=0,010$) einhergeht. Es ergab sich keine Korrelation mit der Expression von CDK1 ($p=0,186$).

Bei der Korrelation mit dem Progesteronrezeptor ergab sich, dass ein höherer Progesteronrezeptorstatus mit einer niedrigeren Expression von Aurora A ($p=0,028$), Aurora B ($p=0,009$), Repp86 ($p=0,012$) und Ki67 ($p=0,005$) einhergeht. Für CDK1 ($p=0,218$) und CDK2 ($p=0,138$) ergab sich keine Korrelation mit dem Progesteronrezeptorstatus.

Für die Real Time Daten zeigte sich, dass ein höherer Östrogenrezeptorstatus mit einer niedrigeren mRNA-Expression von Aurora B ($p=0,038$) einhergeht. Für Aurora A ergab sich ein Trend dafür ($p=0,056$). Es ergab sich keine Korrelation mit der mRNA-Expression von Repp86 ($p=0,116$), CDK1 ($p=0,198$) und CDK2 ($p=0,420$). Bei der Korrelation der mRNA-Mengen mit dem

Progesteronrezeptorstatus ergab sich keine Korrelation für einen der untersuchten Marker: Aurora A ($p=0,523$), Aurora B ($p=0,363$), Repp86 ($p=0,615$), CDK1 ($p=0,775$) und CDK2 ($p=0,694$).

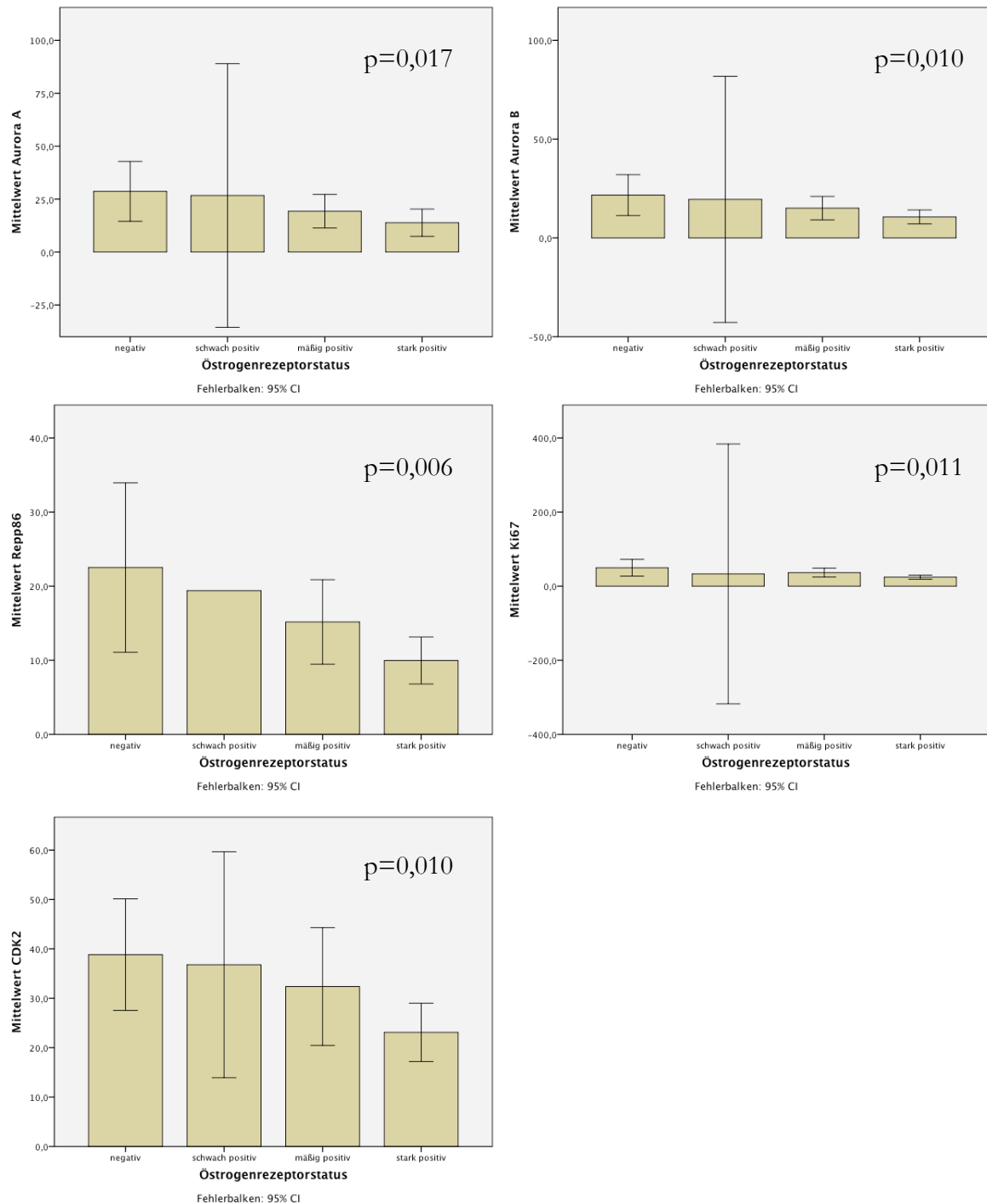


Abbildung 3.1.15. Proteinexpression in Bezug auf den Östrogenrezeptorstatus in Mammakarzinomen. Auf der Y-Achse ist jeweils der Mittelwert der prozentualen Expression des Proteins angegeben, auf der X-Achse sind die Mammakarzinome in Gruppen nach dem Hormonrezeptorstatus unterteilt. Bei unendlichem Ergebnis wurden die Fehlerbalken entfernt.

3.1.16. Korrelation mit der Her2neu-Expression

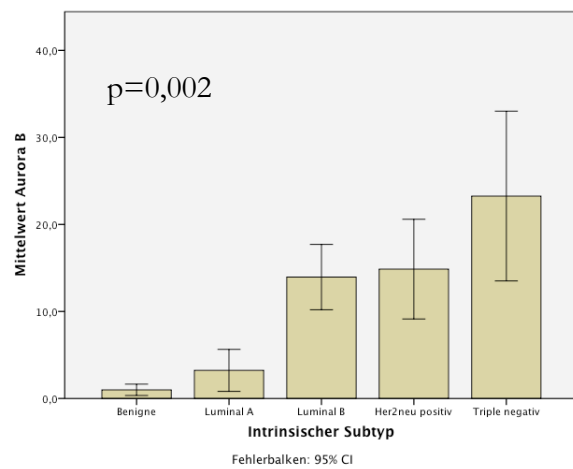
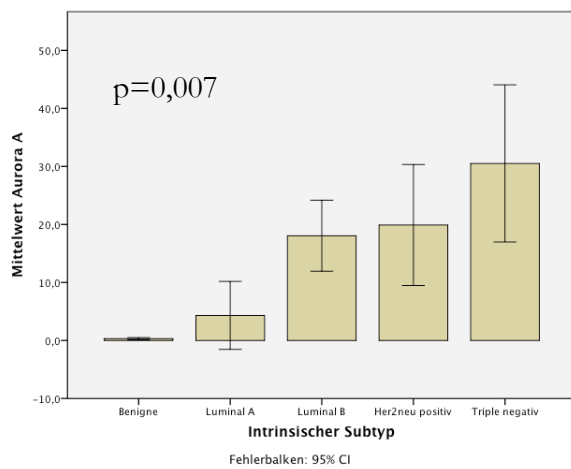
Bei der Analyse bezüglich der Her2neu-Expression ergab sich, dass sich die Proteinexpression in Her2neu-positiven nicht von der in Her2neu-negativen Tumoren unterscheidet: Aurora A ($p=0,561$), Aurora B ($p=0,521$), Repp86 ($p=0,577$), Ki67 ($p=0,840$), CDK1 ($p=0,656$) und CDK2 ($p=0,381$). Auch

bezüglich der Real-Time-Daten fand sich keine signifikante Korrelation mit der Her2neu-Expression: Aurora A ($p=0,384$), Aurora B ($p=0,563$), Repp86 ($p=0,956$), CDK1 ($p=0,625$) und CDK2 ($p=0,476$).

3.1.17. Korrelation mit dem intrinsischen Subtyp

Für die Korrelation mit dem intrinsischen Subtyp wurden alle Her2neu-überexprimierenden Tumoren in einer Gruppe zusammengefasst. Bei der Analyse ergab sich, dass sich die Expression von Aurora A ($p=0,007$), Aurora B ($p=0,002$), Repp86 ($p=0,005$), Ki67 ($p=0,017$) und CDK2 ($p=0,003$) auf Proteinebene in den einzelnen intrinsischen Subtypen signifikant unterscheidet. Für CDK1 ergab sich keine Korrelation ($p=0,157$).

Für die Real-Time Daten ergab sich keine Korrelation mit den intrinsischen Subtypen: Aurora A ($p=0,300$), Aurora B ($p=0,292$), Repp86 ($p=0,356$), CDK1 ($p=0,256$) und CDK2 ($p=0,436$).



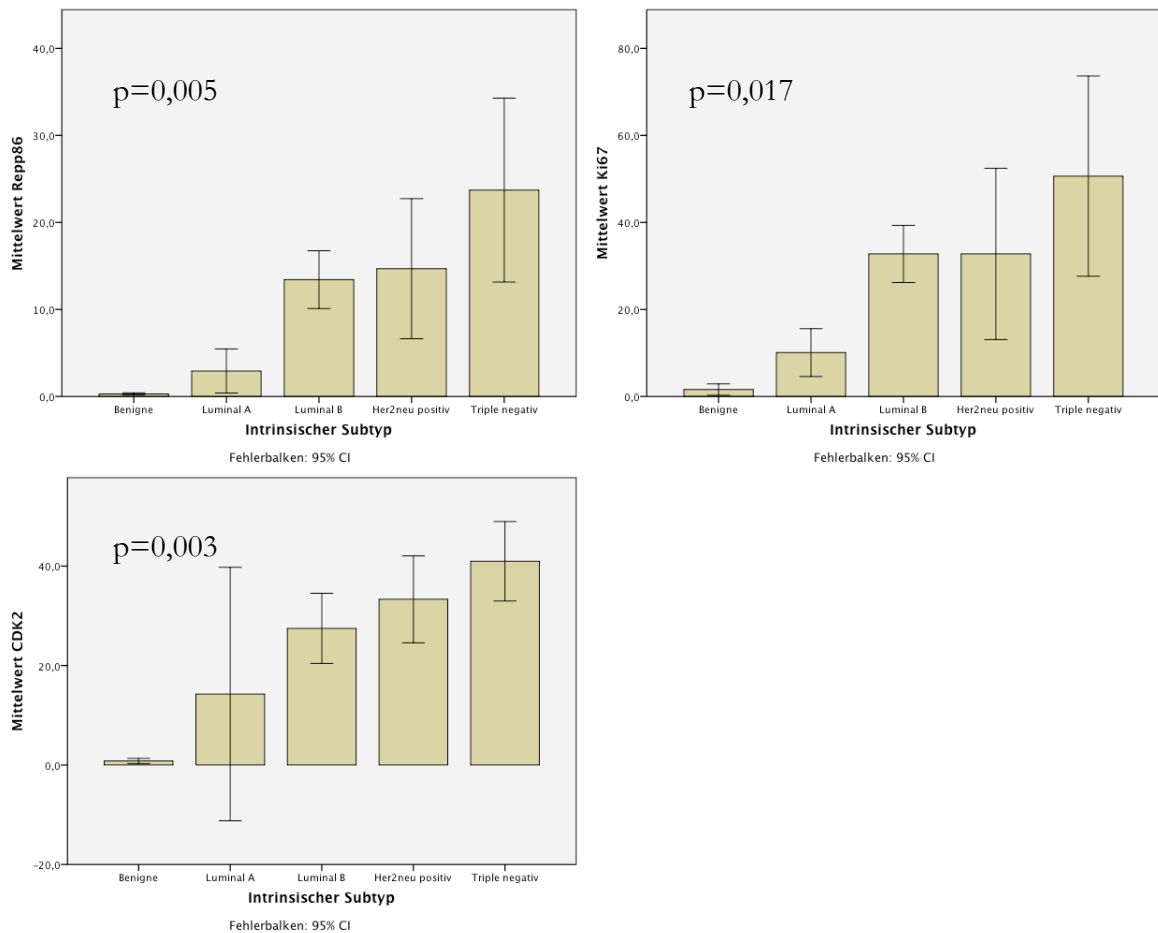


Abbildung 3.1.17. Abgebildet ist der jeweilige Mittelwert der Expression des untersuchten Proteins auf der Y-Achse. Auf der X-Achse sind die Tumoren nach den intrinsischen Subtypen unterteilt.

3.1.18. Überlebensanalysen im Mammakollektiv

Für die Überlebensanalysen wurde das Kollektiv der untersuchten Patientinnen eingeteilt in Patientinnen mit hoher Expression eines Proteins, bzw. hohen mRNA-Mengen und eine Gruppe mit niedrigerer Expression des jeweiligen Proteins, bzw. niedrigeren mRNA-Mengen. Hierfür wurde die Gruppe jeweils am Median des jeweils untersuchten Markers geteilt. Für diese beiden Gruppen wurden die Überlebenskurven verglichen. Die mediane Nachbeobachtungszeit für das Mammakollektiv betrug 51 Monate, die kürzeste lag bei 0 Monaten, die längste bei 98 Monaten. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung war eine Patientin (1,9%) des Kollektivs tumorbedingt verstorben, alle anderen lebten bzw. es gab keine Nachbeobachtungsdaten mehr. Für 15 (27,8%) der Patientinnen war ein Rezidiv dokumentiert, 25 (46,3%) Patientinnen lebten zum Zensusdatum rezidivfrei. Für 14 (25,9%) Patientinnen lagen keine Nachbeobachtungsdaten vor. Aufgrund oben beschriebener Datensituation wurden für das Mammakollektiv alle Überlebensanalysen auf das rezidivfreie Überleben bezogen.

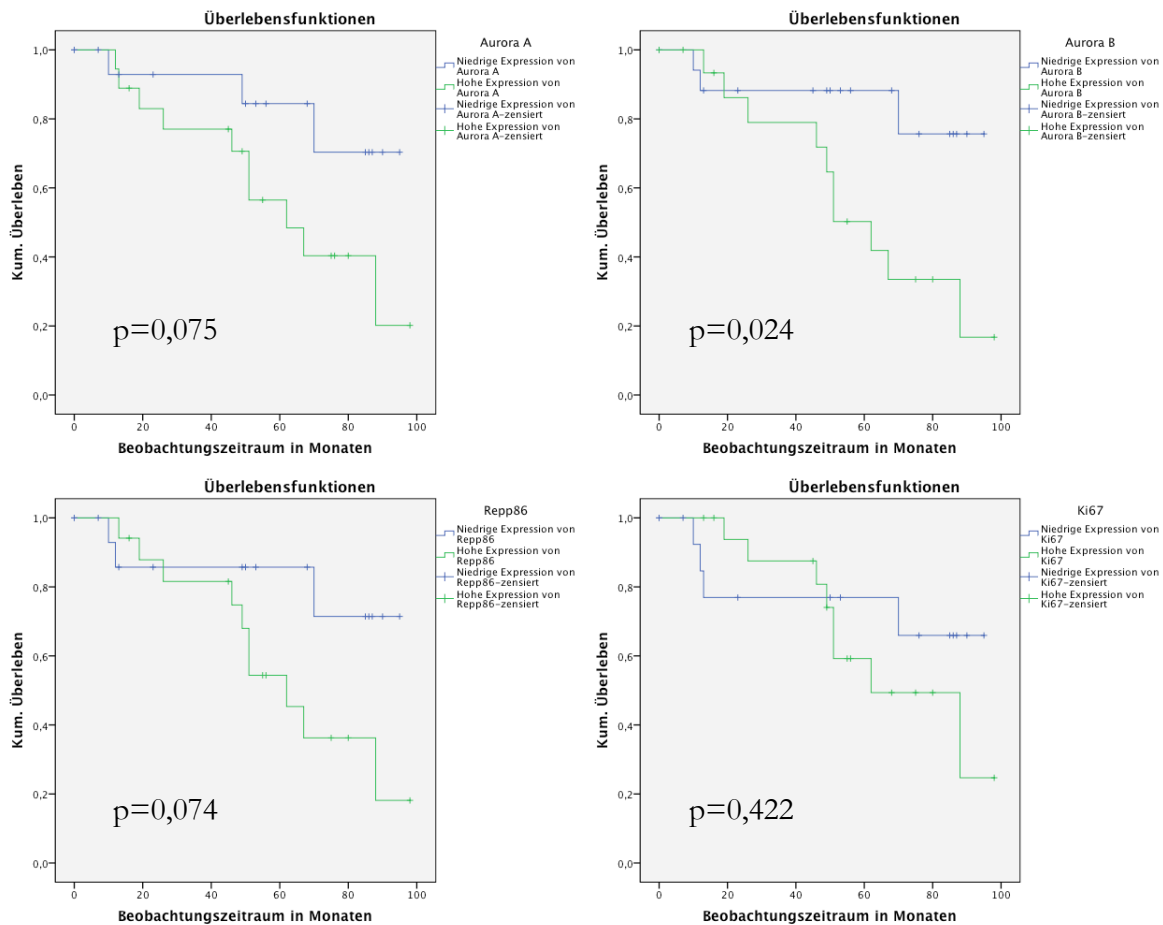
Es ergab sich, dass eine hohe Expression von Aurora B (Chi-Quadrat 5,105, $p=0,024$) sowie eine hohe Expression von CDK2 (Chi-Quadrat 9,292, $p=0,002$) mit einem signifikant verkürzten rezidivfreien Überleben einhergeht.

Für Aurora A (Chi-Quadrat 3,173, $p=0,075$) und Repp86 (Chi-Quadrat 3,193, $p=0,074$) zeigte sich ein Trend, dass auch für diese Proteine eine hohe Expression mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben einhergeht.

Für Ki67 (Chi-Quadrat 0,644 $p=0,422$) und CDK1 (Chi-Quadrat 0,678 $p=0,410$) ergab sich kein Zusammenhang mit dem rezidivfreien Überleben. Die Überlebensanalysen in Bezug auf die Proteinexpression sind mit Kaplan-Meyer Kurven in Abbildung 3.1.18.a abgebildet.

Bei der Analyse der mRNA-Level bezogen auf das rezidivfreie Überleben, zeigte sich für keinen der untersuchten Marker ein signifikanter Unterschied: Aurora A (Chi-Quadrat 0,460, $p=0,498$), Aurora B (Chi-Quadrat 0,052, $p=0,820$), Repp86 (Chi-Quadrat 0,192, $p=0,661$), CDK1 (Chi-Quadrat 1,028, $p=0,311$) und CDK2 (Chi-Quadrat 0,001, $p=0,997$).

Als Goldstandard wurden die Mammakarzinome auch anhand der intrinsischen Suptypen nach der St. Gallen Konferenz untersucht. Hier ergab sich keine signifikante Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben (Chi-Quadrat=3,028; $p=0,553$). Siehe Abbildung 3.1.18.b.



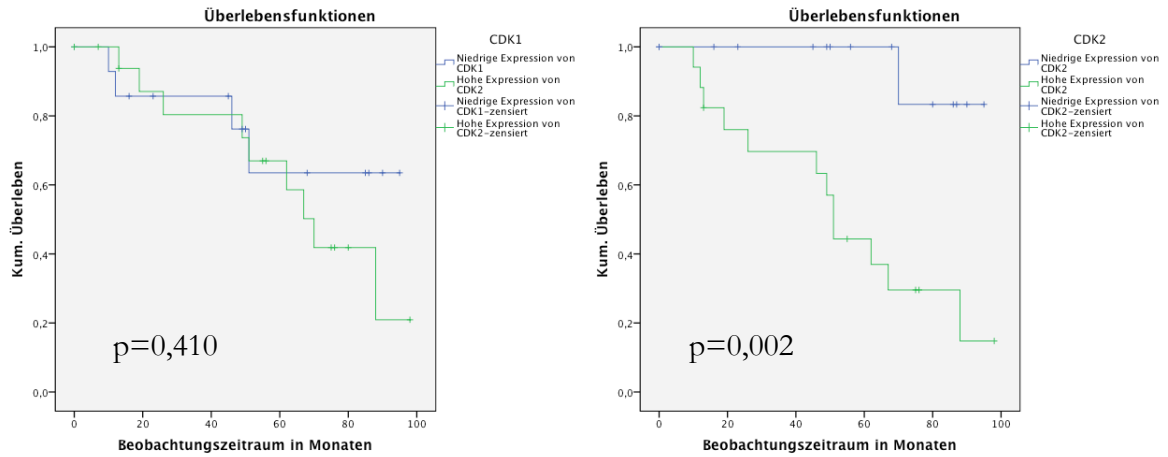


Abbildung 3.1.18.a Rezidivfreies Überleben in Bezug auf hohe und niedrige Proteinexpression bei Mammakarzinomen.

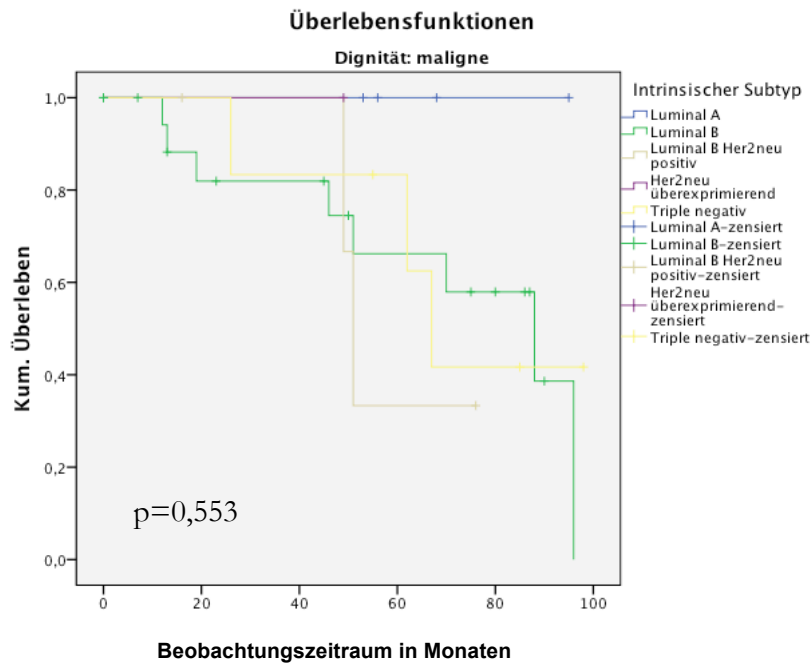


Abbildung 3.1.18.b Rezidivfreies Überleben in Bezug auf die intrinsischen Subtypen.

3.2. Ergebnisse Ovarkollektiv

3.2.1. Altersverteilung und Vorbehandlung des Ovarkollektivs

Als Zeitpunkt der Diagnosestellung wurde das Datum der primären Operation festgesetzt. Das mediane Alter aller Patientinnen bei Diagnosestellung betrug 63 Jahre. Die jüngste Patientin war bei der Erstdiagnose 26 Jahre alt, die älteste war 89 Jahre alt.

Keine der Patientinnen hat eine medikamentöse Vorbehandlung erhalten.

3.2.2. Art und Histologie der Ovarialtumoren

Insgesamt wurden 93 Ovarialtumoren für diese Arbeit untersucht. Darunter waren acht (8,6%) benigne Tumoren, sechs (6,5%) Borderlinetumoren, 76 (81,7%) Ovarialkarzinome, zwei (2,2%) extraovarielle Ovarilakarzinome und ein (1,1%) Tubenkarzinom. Die Patientinnen mit den extraovariellen Ovarialkarzinomen und dem Tubenkarzinom wurden für die weiteren Untersuchung in die Gruppe der Ovarialkarzinome eingeschlossen.

Ein Großteil der untersuchten Tumoren (68 entsprechend 73,2%) war von serös-papillärer Histologie. Den zweitgrößten Anteil bildeten mit elf (11,8%) Proben die endometrioiden Tumoren. Zwei (2,2%) Tumoren waren muzinöse Zystadenokarzinome. Eine (1,1%) Probe war ein Müllerscher-Misch-Tumor, eine (1,1%) ein klarzelliger Tumor. Ein (1,1%) maligner Tumor wurde als undifferenziert beschrieben. Zu einem malignen Tumor (1,1%) fehlten die Angaben. Die acht (8,6%) benignen Tumoren waren sämtlich Zystadenome.

3.2.3. FIGO-Stadien des Ovarkollektivs

Für die Patientinnen des Ovarkollektivs wurde das FIGO-Stadium erfasst. Wie in der Literatur beschrieben befand sich auch hier der größte Anteil des Kollektivs bei Erstdiagnose bereits im fortgeschrittenen Krankheitsstadium.

FIGO-Stadium	Anzahl	Prozentualer Anteil
Benigne	8	8,6%
Ia	6	6,5%
Ib	1	1,1%
Ic	5	5,4%
IIb	2	2,2%
IIc	2	2,2%
IIIb	4	4,5%
IIIc	47	50,5%
IV	17	18,3%
Unbekannt	1	1,1%
Gesamt	93	100%

Tabelle 3.2.3. FIGO-Stadien des Ovar-Kollektivs

3.2.4. Einteilung des Ovarkollektivs nach dem Grading

Das Ovarkollektiv wurde nach dem Tumorgrading nach Elston und Ellis eingeteilt (23). Bei den acht (8,6%) benignen Gewebeproben entfiel diese Einteilung. Zehn (10,8%) Tumorproben wurden als gut differenziert (G1), 32 (34,4%) Proben wurden als mittelgradig differenziert (G2) und der Großteil mit 41 (44,1%) Proben wurde als schlecht differenziert eingestuft (G3). Für zwei maligne Tumoren (2,2%) fehlte die Angabe zum Grading.

3.2.5. Chemotherapie des Ovarkollektivs

Von 93 Patientinnen erhielten 70 (75,3%) Patientinnen postoperativ eine Chemotherapie, 20 (21,5%) erhielten keine Chemotherapie und für 3 (3,2%) fehlen die Daten. Dabei erhielten 64 (68,8%) eine platinhaltige Chemotherapie. 6 (6,5%) erhielten eine platinfreie Chemotherapie. Von den 64 mit Platin behandelten Patientinnen wurden 31 (48,4%) als platinseibel, 11 (17,2%) als intermediär und 17 (26,6%) als platinrefraktär eingestuft. Bei 5 (7,8%) war eine Beurteilung nicht möglich oder es fehlten die Angaben.

3.2.6.1. Proteinexpression in benignen Ovarialtumoren

Es wurden nur wenige benigne Tumoren immunhistochemisch untersucht. Für CDK1 und CDK2 wurden keine benignen Tumoren untersucht. Für alle Proben wird der prozentuale Anteil der für den untersuchten Marker positiven Zellen angegeben. In der Tabelle 3.2.6.1. findet sich eine genaue Auflistung der Anzahl, Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Proteinexpression. Zudem sind dort Angaben zum minimalen und maximalen Wert der Proteinexpression der untersuchten benignen Tumoren.

Marker	Anzahl	Mittelwert	Median	Stand.	Minim.	Maxim.
Aurora A	2	1,50	1,50	1,41	0,50	2,50
Aurora B	3	13,08	3,50	19,71	0,00	35,80
Repp86	3	15,28	8,0	17,74	0,00	35,50
Ki67	3	37,53	23,67	39,65	6,67	82,25
CDK1	0	-	-	-	-	-
CDK2	0	-	-	-	-	-

Tabelle 3.2.6.1. Proteinexpressionen in benignen Ovarialtumoren. Die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Minimum und Maximum sind in Prozent positiver Tumorzellen angegeben.

3.2.6.2. Proteinexpression in Borderlinetumoren

Einige Borderlinetumoren wurden im Rahmen des Ovarkollektivs untersucht. Allerdings wurden auch hier keine Tumoren auf CDK1 oder CDK2 untersucht. Für alle Proben wird der prozentuale Anteil der für den untersuchten Marker positiven Zellen angegeben. In der Tabelle 3.2.6.2. findet sich eine genaue Auflistung der Anzahl, Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Proteinexpression. Zudem sind dort Angaben zum minimalen und maximalen Wert der Proteinexpression der untersuchten Borderlinetumoren aufgeführt.

Marker	Anzahl	Mittelwert	Median	Stand.	Minim.	Maxim.
Aurora A	3	6,83	5,50	7,59	0,0	15,0
Aurora B	4	2,20	2,15	1,86	0,0	4,50
Repp86	4	5,22	5,27	5,35	0,0	10,30
Ki67	5	18,02	13,50	17,84	6,25	49,33
CDK1	0	-	-	-	-	-
CDK2	0	-	-	-	-	-

Tabelle 3.2.6.2. Proteinexpressionen in Borderlinetumoren. Die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Minimum und Maximum sind in Prozent positiver Tumorzellen angegeben.

3.2.6.3. Proteinexpression in malignen Ovarialtumoren

Eine größere Anzahl maligner Ovarialtumoren wurde für diese Arbeit untersucht. Für alle Proben wird der prozentuale Anteil der für den untersuchten Marker positiven Zellen angegeben.

In der Tabelle 3.2.6.3. findet sich eine genaue Auflistung der Anzahl, Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Proteinexpression. Zudem sind dort Angaben zum minimalen und maximalen Wert der Proteinexpression der untersuchten malignen Tumoren aufgeführt.

Marker	Anzahl	Mittelwert	Median	Stand.	Minim.	Maxim.
Aurora A	66	28,12	27,0	13,08	2,1	56,0
Aurora B	70	24,91	26,63	10,10	0,0	44,5
Repp86	74	25,48	25,0	12,97	0,0	51,8
Ki67	72	53,88	55,29	19,10	11,5	91,25
CDK1	16	32,81	34,25	19,50	2,5	67,2
CDK2	13	44,76	48,00	10,81	23,3	64,2

Tabelle 3.2.6.3. Proteinexpressionen in malignen Ovarialtumoren. Die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Minimum und Maximum sind in Prozent positiver Tumorzellen angegeben.

3.2.7.1. mRNA in benignen Ovarialtumoren

Sechs Zystadenome wurden mittels RT-PCR untersucht. Für alle Proben wird die gegen 28s-rRNA normalisierte Menge der Ziel-DNA angegeben. Die Anzahl der untersuchten Proben, Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die minimale und die maximale mRNA-Menge sind in Tabelle 3.2.7.1. aufgelistet.

Marker	Anzahl	Mittelw.	Median	Stand.	Minim.	Maxim.
Aurora A	6	0,5283	0,5390	0,0499	0,4544	0,5896
Aurora B	6	0,5191	0,5232	0,0481	0,4446	0,5842
Repp86	5	0,5245	0,5326	0,0529	0,4446	0,5923
CDK1	6	0,5445	0,5450	0,0502	0,4703	0,6091
CDK2	5	0,5520	0,5486	0,0256	0,5213	0,5833

Tabelle 3.2.7.1. mRNA in benignen Ovarialtumoren. Angegeben ist für Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum jeweils die normalisierte Menge der Ziel-DNA.

3.2.7.2. mRNA in Borderlinetumoren

Es wurden insgesamt fünf Borderlinetumoren mittels RT-PCR untersucht. Für alle Proben wird die gegen 28s-rRNA normalisierte Menge der Ziel-DNA angegeben. Die Anzahl der untersuchten Proben, Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die minimale und die maximale Expression sind in Tabelle 3.2.7.2. aufgelistet.

Marker	Anzahl	Mittelw.	Median	Stand.	Minim.	Maxim.
Aurora A	5	0,5493	0,5198	0,0533	0,5050	0,6331
Aurora B	5	0,5476	0,5273	0,0478	0,5028	0,6232
Repp86	5	0,5333	0,5214	0,0323	0,5086	0,5698
CDK1	5	0,5573	0,5488	0,0495	0,4945	0,6286
CDK2	5	0,5595	0,5504	0,0637	0,4786	0,6519

Tabelle 3.2.7.2. mRNA in Borderlinetumoren. Angegeben ist für Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum jeweils die normalisierte Menge der Ziel-DNA.

3.2.7.3. mRNA in malignen Ovarialtumoren

Es wurden 60 Proben von malignen Ovarialtumoren für diese Arbeit mittels RT-PCR untersucht. Für alle Proben wird die gegen 28s-rRNA normalisierte Menge der Ziel-DNA angegeben. Die Anzahl der untersuchten Proben, Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die minimale und die maximale Expression sind in Tabelle 3.2.7.3. aufgelistet.

Marker	Anzahl	Mittelw.	Median	Stand.	Minim.	Maxim.
Aurora A	58	0,548	0,5372	0,0689	0,4047	0,7222
Aurora B	60	0,5729	0,5600	0,0781	0,4614	0,8097
Repp86	60	0,5662	0,5489	0,1091	0,0937	0,8421
CDK1	60	0,5874	0,5754	0,0737	0,4482	0,8134
CDK2	58	0,5613	0,5472	0,0727	0,4431	0,7834

Tabelle 3.2.7.3. mRNA in malignen Ovarialtumoren. Angegeben ist für Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum jeweils die normalisierte Menge der Ziel-DNA.

3.2.8.1. Korrelation der Proteinexpressionen untereinander im Ovarialkollektiv

Bei der Korrelationsanalyse der einzelnen immunhistochemischen Marker untereinander ergab sich, dass die Aurororakinasen miteinander, mit Repp86 und Ki67 stark korrelieren (für alle $p < 0,001$). Für CDK1 ergab sich eine Korrelation mit Aurora A, Aurora B, Repp86 und Ki67. Die CDK2-Expression korrelierte in der Ovarialkohorte mit keinem der anderen Marker.

Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson sowie die der Korrelationsanalyse zugehörigen p-Werte sind in Tabelle 3.2.8.1. aufgelistet.

Pearsons K./ p-Wert	Aurora A	Aurora B	Repp86	Ki67	CDK1	CDK2
Aurora A	-	0,777	0,775	0,753	0,625	0,249
Aurora B	<0,001	-	0,856	0,784	0,575	0,385
Repp86	<0,001	<0,001	-	0,850	0,793	0,054
Ki67	<0,001	<0,001	<0,001	-	0,677	0,324
CDK1	0,017	0,025	<0,001	0,006	-	0,473
CDK2	0,435	0,253	0,869	0,305	0,120	-

Tabelle 3.2.8.1. Korrelation der Proteinexpressionen untereinander im Ovarkollektiv. Dabei ist in der rechten oberen Hälfte jeweils der Pearsons-Korrelationskoeffizient (fett gedruckt) und in der linken unteren Hälfte der zugehörige p-Wert angegeben.

3.2.8.2. Korrelation der mRNA-Mengen untereinander im Ovarkollektiv

Bei der Korrelationsanalyse der einzelnen mRNA-Mengen untereinander ergab sich, dass alle signifikant miteinander korrelieren (p für alle $<0,001$). Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson sowie die der Korrelationsanalyse zugehörigen p-Werte sind in Tabelle 3.2.8.2. aufgelistet.

Pearsons K./ p-Wert	Aurora A	Aurora B	Repp86	CDK1	CDK2
Aurora A	-	0,903	0,727	0,889	0,903
Aurora B	<0,001	-	0,816	0,959	0,838
Repp86	<0,001	<0,001	-	0,769	0,665
CDK1	<0,001	<0,001	<0,001	-	0,841
CDK2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-

Tabelle 3.2.8.2. Korrelation der mRNA-Expressionen untereinander. Dabei ist in der rechten oberen Hälfte jeweils der Pearsons-Korrelationskoeffizient (fett gedruckt) und in der linken unteren Hälfte der zugehörige p-Wert angegeben.

3.2.8.3. Korrelation der Proteinexpressionen mit den mRNA-Mengen im Ovarkollektiv

Die Korrelationsanalyse von Proteinexpression und mRNA-Mengen ergab nur für einige einzelne Marker eine signifikante Korrelation. Und selbst in diesen Fällen sprachen die Korrelationskoeffizienten nicht für einen sehr engen Zusammenhang der untersuchten Variablen.

3.2.9. Unterscheidung von benignen Ovarialtumoren, Borderlinetumoren und malignen Ovarialtumoren

Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde ermittelt, ob sich die Proteinexpressionen bzw. die mRNA-Mengen in benignen Ovarialtumoren, Borderlinetumoren und malignen Ovarialtumoren unterscheiden. Dabei ergab sich, dass sich die Proteinexpression in benignen Ovarialtumoren, Borderlinetumoren und malignen Ovarialtumoren für folgende Proteine signifikant voneinander unterscheidet: Aurora A ($p=0,003$), Aurora B ($p=0,004$), Repp86 ($p=0,012$) und Ki67 ($p=0,005$). Siehe hierzu auch Abbildung 3.2.9.

Für die Proteinexpression von CDK1 und CDK2 konnte der Test nicht durchgeführt werden, da weder Normalgewebe noch Borderlinetumoren untersucht wurden.

Für die mRNA-Mengen ergab sich bei keinem Marker ein signifikanter Unterschied in den unterschiedlichen Tumorarten: Aurora A ($p=0,890$), Aurora B ($p=0,164$), Repp86 ($p=0,486$), CDK1 ($p=0,225$) und CDK2 ($p=0,985$).

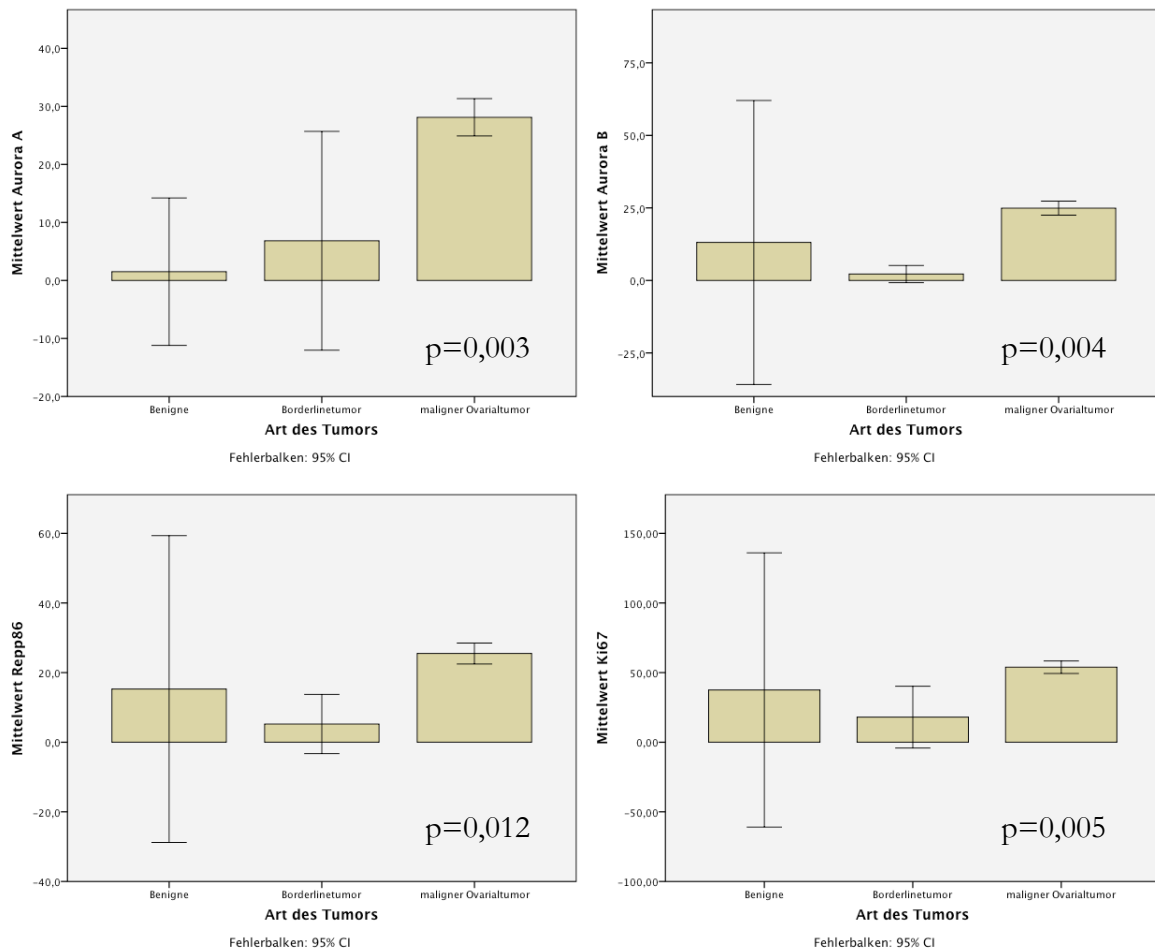


Abbildung 3.2.9. zeigt die Proteinexpression in Bezug auf die Tumorart bei Ovarialkarzinomen. Auf der Y-Achse ist jeweils der Mittelwert der prozentualen Expression des Proteins angegeben, auf der X-Achse sind die Tumoren nach benignen Tumoren, Borderline-Tumoren und Ovarialkarzinomen unterteilt.

3.2.10. Korrelation mit dem Grading im Ovarialkollektiv

Bei der Korrelation der Proteinexpression mit dem Grading ergab sich, dass Aurora A ($p<0,001$), Aurora B ($p=0,002$), Repp86 ($p=0,001$) und Ki67 ($p=0,002$) in Tumoren höheren Gradings signifikant höher exprimiert sind. Siehe hierzu auch Abbildung 3.2.10. Es ergab sich keine Korrelation mit CDK1 ($p=0,686$) und CDK2 ($p=0,734$).

Bei der Korrelation mit den mRNA-Werten ergab sich eine signifikant höhere Expression bei Tumoren höheren Gradings für Aurora B ($p=0,008$), Repp86 ($p=0,023$) und CDK1 ($p=0,010$). Es ergab sich ein Trend, dass auch bei Aurora A bei Tumoren höheren Gradings höhere mRNA-Mengen vorlagen ($p=0,083$). Für CDK2 ergab sich auf mRNA-Ebene kein Zusammenhang mit dem Grading.

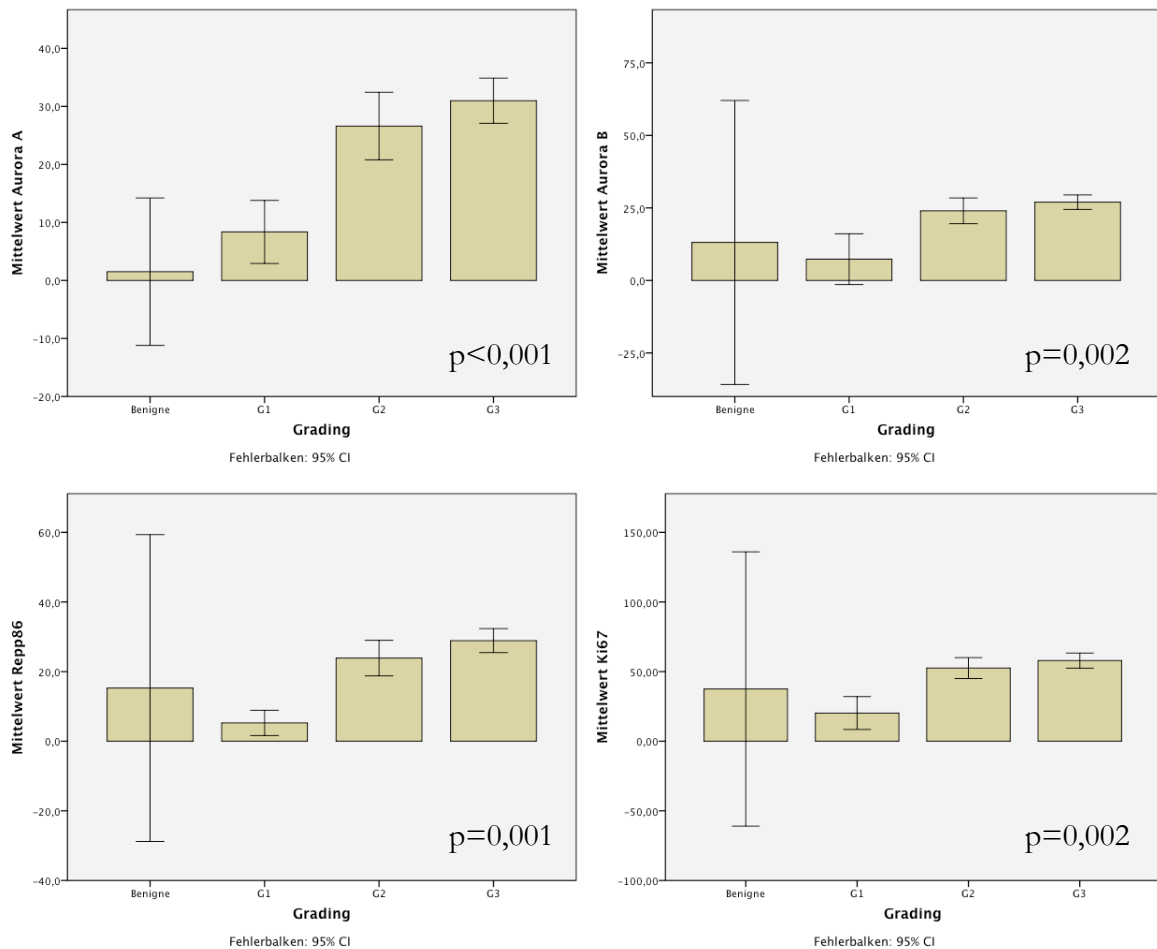


Abbildung 3.2.10. Proteinexpression in Bezug auf das Grading im Ovarialkollektiv. Auf der Y-Achse ist jeweils der Mittelwert der prozentualen Expression des Proteins abgebildet. Auf der X-Achse sind die Tumoren nach ihrem Grading unterteilt.

3.2.11. Korrelation mit dem FIGO-Stadium im Ovarialkollektiv

Um die Protein- bzw. mRNA-Expression mit dem FIGO-Stadium zu korrelieren, wurden die Tumoren in zwei Gruppen unterteilt: eine Gruppe für die Tumorstadien FIGO I und FIGO IIb, und eine zweite Gruppe für FIGO IIc und höhere Stadien.

Auf Proteinebene ergab sich, dass Aurora A ($p=0,032$), Aurora B ($p=0,037$) und Repp86 ($p=0,048$) in Tumoren höherer FIGO-Stadien signifikant höher exprimiert werden. Es konnte kein solcher Zusammenhang für Ki67 gezeigt werden ($p=0,143$). Für CDK1 und CDK2 wurden nur Tumoren in FIGO-Stadium III und IV untersucht, daher wurde der Test für diese beiden Proteine nicht durchgeführt. Siehe hierzu auch Abbildung 3.2.11.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich, dass Aurora B ($p=0,001$), Repp86 ($p=0,002$) und CDK1 ($p=0,002$) in Tumoren höheren Tumorstadiums höhere mRNA-Mengen haben. Für Aurora A ($p=0,067$) und CDK2 ($p=0,088$) ergab sich ein Trend dafür, dass auch für diese Marker ein solcher Zusammenhang besteht.

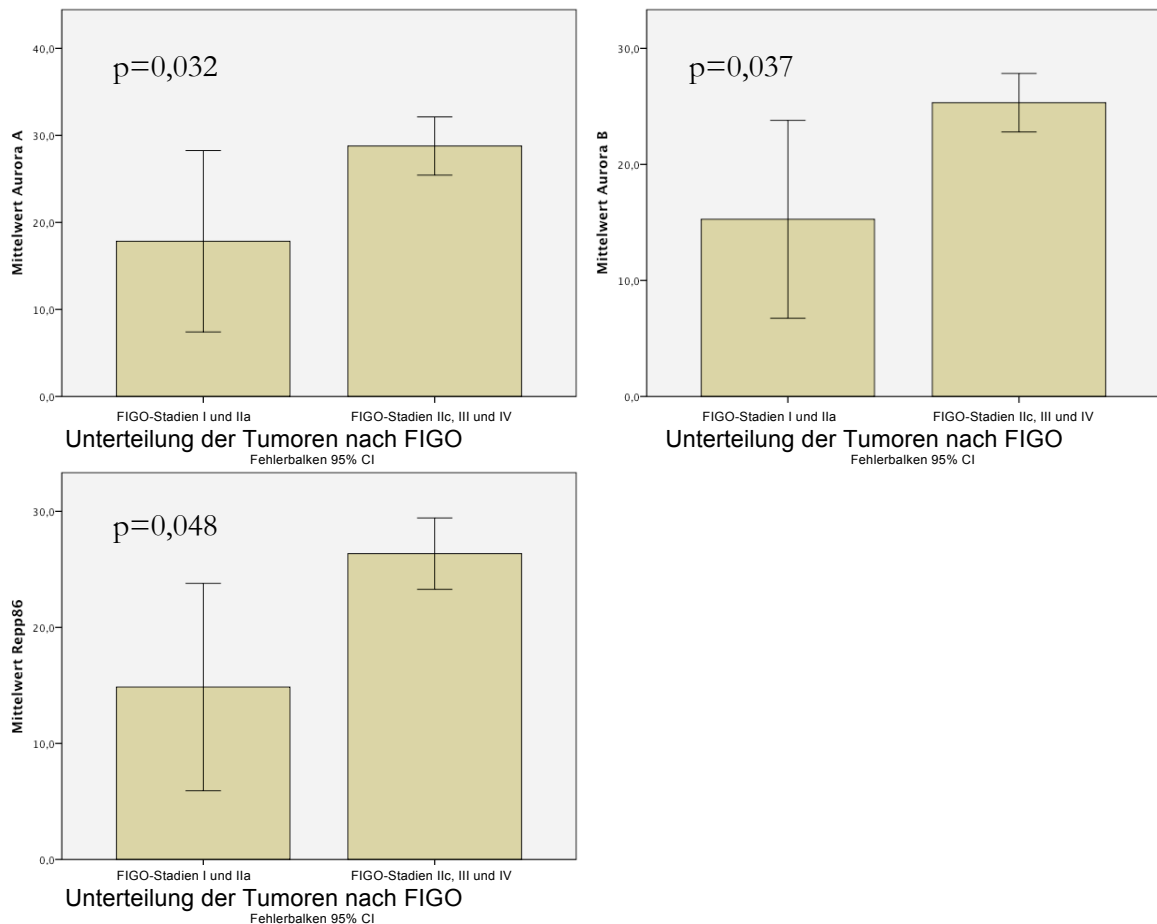


Abbildung 3.2.11. Proteinexpression in Ovarialtumoren in Bezug auf das Tumorstadium nach FIGO. Auf der Y-Achse ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der jeweiligen Proteinexpression angegeben. Auf der X-Achse sind die Tumoren nach ihren FIGO-Stadien in zwei Gruppen unterteilt.

3.2.12. Korrelation mit dem Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapie im Ovarkollektiv

Die Analyse des Ansprechens auf Platinhaltige Chemotherapie ergab, dass sich die Proteinexpressionen von Aurora A ($p=0,489$), Aurora B ($p=0,241$), Repp86 ($p=0,251$), Ki67 ($p=0,312$), CDK1 ($p=0,251$) und CDK2 ($p=0,312$) in platin-sensiblen und platin-refraktären Tumoren nicht voneinander unterscheidet.

Auch auf mRNA-Ebene fand sich hier kein Zusammenhang: Aurora A ($p=0,382$), Aurora B ($p=0,498$), Repp86 ($p=0,241$), CDK1 ($p=0,251$) und CDK2 ($p=0,312$).

3.2.13. Überlebensanalysen im Ovarkollektiv

Die mediane Nachbeobachtungszeit der Ovarkohorte betrug 21 Monate, die kürzeste lag bei 0 Monaten, die längste bei 139 Monaten. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren 53 (57%) der Patientinnen verstorben, 40 (47%) lebten oder es fehlten weitere Nachbeobachtungsdaten. Für 49 (52,7%) Patientinnen ist ein Rezidiv dokumentiert. Allerdings war ein Rezidiv häufig nur schwer von einem primär progredienten Tumorleiden zu unterscheiden. Daher wurde für die weiteren Analysen das Gesamtüberleben betrachtet und nicht das rezidivfreie.

Es ergab sich kein Unterschied bezüglich des Überlebens für eine hohe bzw. niedrige Expression von Aurora A (Chi-Quadrat 1,799, $p=0,180$), Aurora B (Chi-Quadrat 0,466, $p=0,495$) und Repp86 (Chi-

Quadrat 0,313, $p=0,575$). Für Ki67 ergab sich ein Trend dafür, dass eine höhere Expression mit einem verkürzten Überleben einhergeht (Chi-Quadrat 3,156, $p=0,076$). Siehe hierzu auch Abbildung 3.2.13. Für CDK1 und CDK2 wurde wegen zu geringer Fallzahl in der Immunhistochemie auf eine Überlebensanalyse verzichtet. Bei der Analyse der Real-Time-Daten zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Überlebens für eine hohe bzw. niedrige mRNA-Menge von Aurora A (Chi-Quadrat 0,542, $p=0,461$), Aurora B (Chi-Quadrat 0,095, $p=0,757$), Repp86 (Chi-Quadrat 0,015, $p=0,903$), CDK1 (Chi-Quadrat 0,025, $p=0,874$) und CDK2 (Chi-Quadrat 0,075, $p=0,784$).

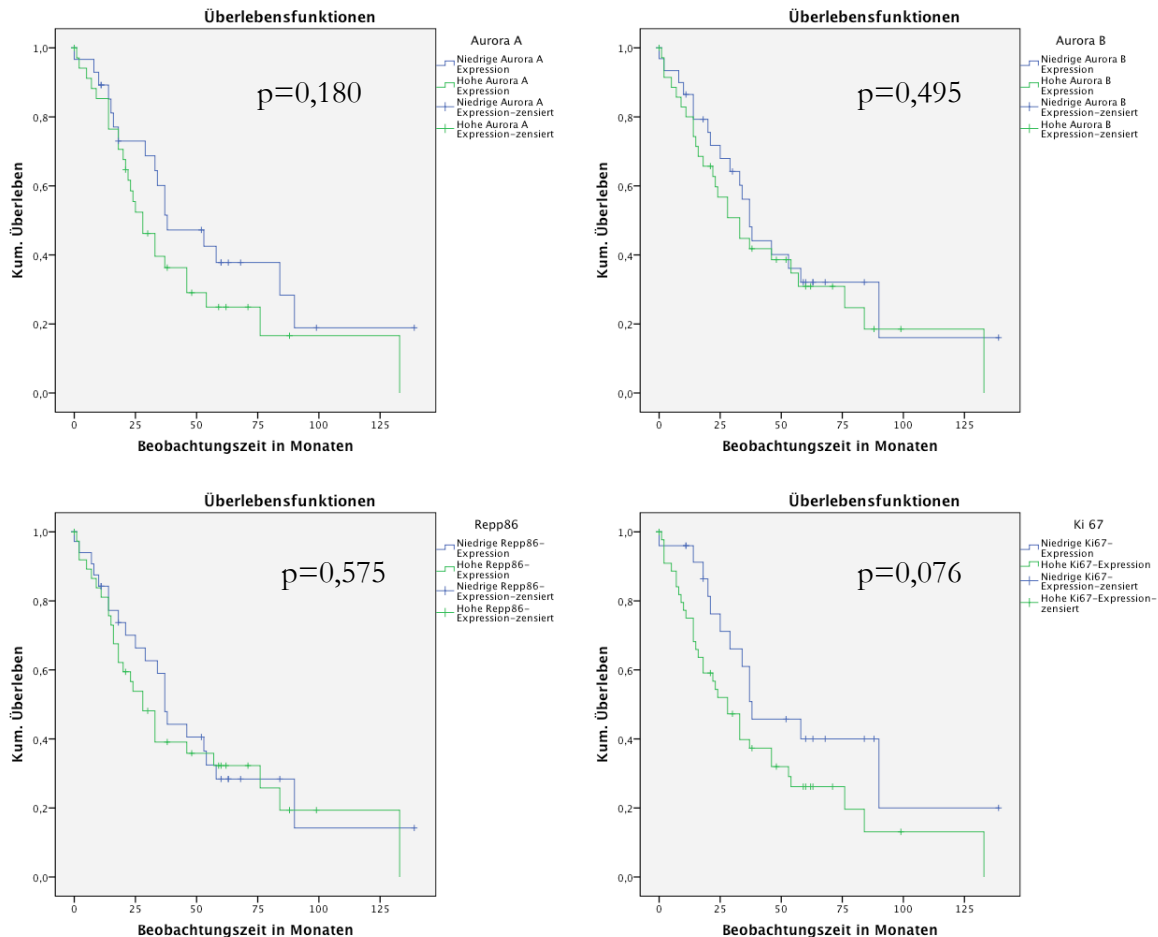


Abbildung 3.2.13. Gesamtüberleben im Ovarkollektiv in Abhängigkeit von der Proteinexpression.

4. Diskussion

4.1. Beschreibende Parameter im Mammakollektiv

Vergleicht man das Kollektiv der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientinnen mit den in der Literatur angegebenen Daten, so lassen sich einige Abweichungen feststellen. Zunächst liegt das mediane Alter bei Diagnosestellung in unserem Kollektiv mit 54 Jahren über 10 Jahre unterhalb dem vom Robert-Koch-Institut gelisteten Durchschnittsalter bei Erkrankung von dort 65 Jahren (1). Da sich die Tumorbilogie bei älteren und jüngeren Patientinnen durchaus unterscheiden kann, ist dies eine mögliche Störgröße, wenn man in dieser Arbeit gewonnene Daten auf ein größeres Kollektiv überträgt.

Bezüglich der Stadien bei Erstdiagnose beschreibt das Robert-Koch-Institut für ca. 52% einen T1-, für ca. 36% einen T2-, für ca. 5% einen T3 und für ca. 7% einen T4-Tumor (3). Eine amerikanische Studie gibt nach UICC-Stadien an, dass 53,2% der Mammakarzinome in Stadium I sind, 34,7% in Stadium II, 8,4% in Stadium III und 3,7% in Stadium IV (189). Bezogen auf die Mammakarzinome sind in unserem Kollektiv 55,6% in Stadium T1, 35,2% in Stadium T2 und 1,9% in Stadium T3. Bei 7,4% der Patientinnen war das Stadium unbekannt. Insofern sind die höheren Tumorstadien in unserem Kollektiv leicht unterrepräsentiert, insgesamt wird aber die Verteilung der Stadien bezogen auf den Durchschnitt recht gut abgebildet.

In unserem Kollektiv liegt die Anzahl der invasiv-duktalem Tumoren mit 87% etwas über dem in der Literatur beschriebenen Anteil von 65-80%, die invasiv-lobulären Tumoren liegen mit 11,1% nah an den beschriebenen 10%. Andere Tumoren sind in dieser Arbeit unterrepräsentiert (190, 191). Insofern lässt sich nicht sagen, ob sich die hier erhobenen Daten auch auf andere histologische Unterformen des Mammakarzinoms übertragen lassen.

Laut Literatur sind etwa 70-80% der Mammakarzinome hormonrezeptorpositiv (191). Dazu passt unser Kollektiv, in dem 70,3% des Kollektivs östrogenrezeptor- und 51,8% progesteronrezeptorpositiv sind. Für 13% fehlen uns leider die Daten.

In der Literatur wird die Anzahl der Her2neu-überexprimierenden Tumoren mit 20-30% angegeben. Diese Art von Tumoren ist in unserem Kollektiv sicherlich unterrepräsentiert, zudem fehlen leider zu einigen Patientinnen die Angaben. Dies mag auch ein Grund sein, weswegen sich mit der Her2neu-Überexpression keine Korrelationen nachweisen ließen.

4.2. Beschreibende Parameter im Ovarkollektiv

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose in unserem Ovarkollektiv liegt mit 63 Jahren etwas unter dem in der Literatur angegebenen mit 68 Jahren (2).

Laut dem Robert-Koch-Institut sind bei Erstdiagnose eines Ovarialkarzinoms in Deutschland ca. 27% der Patientinnen in Stadium T1, ca. 14% in Stadium T2 und die überwiegende Mehrheit mit ca. 59% ist in Stadium T3 (3). Daten der Uni Jena von 250 Ovarialkarzinompatientinnen ergaben für ca. 22% ein Stadium FIGO I, für ca. 8% ein Stadium FIGO II, für die Mehrheit der Patientinnen mit ca. 66% ein

Stadium FIGO III und für 13,6% ein Stadium FIGO IV (192). Unser Kollektiv kommt diesen Daten recht nahe mit 14,1 % der Patientinnen im Stadium FIGO I, 4,7% der Patientinnen im Stadium FIGO II, der Mehrzahl mit 60% im Stadium III und 20% im Stadium IV. Für eine Patientin (1,2%) fehlt die Angabe. Mit unserem Kollektiv wird die in der Literatur angegebene Verteilung der Stadien bei Erstdiagnose recht gut abgebildet.

Bezüglich der Histologie werden in der Literatur 50% der Karzinome als serös, 10% als muzinös, 20% als endometrioid, 5-10% als klarzellig und 15% als entdifferenziert beschrieben (191). In unserem Kollektiv sind die serösen Karzinome mit 80% überrepräsentiert, dafür sind die anderen Histologien leicht unterrepräsentiert. Aber auch in unserem Kollektiv bilden die endometrioiden Karzinome mit 14,1% die zweitgrößte Gruppe, gefolgt von den muzinösen (2,4%), undifferenzierten (1,2%) und den klarzelligen (1,2%) Karzinomen. Möglicherweise lassen sich die hier erhobenen Daten also nicht direkt auf die weniger repräsentierten histologischen Subtypen übertragen, da einfach zu wenige Fälle untersucht wurden.

4.3. Limitierende Faktoren dieser Arbeit

Letztendlich waren die von uns untersuchten Kollektive relativ klein und deswegen auch die statistische Power nicht ausreichend, um kleinere Unterschiede herauszuarbeiten.

Die klinischen Daten wurden für diese Arbeit retrospektiv erhoben. Insofern sind gewisse Störgrößen wie z.B. Komorbiditäten nicht auszuschließen. Zudem erhielten die Patienten unterschiedliche Therapien, die natürlich einen großen Einfluss auf das weitere Überleben haben. Auch war der Beobachtungszeitraum bei der Mammakohorte zu kurz, um eine Aussage über das Gesamtüberleben zu treffen. Dagegen waren die Daten bezüglich des Rezidivstatus bei den Ovarialkarzinomen nicht auswertbar, sodass hier keine Aussage zum rezidivfreien Überleben möglich war.

Wegen der relativ kleinen Kohorten ist keine multivariate Analyse des Überlebens erfolgt. Insofern ist eine Aussage, ob einer der untersuchten Marker ein unabhängiger prognostischer Faktor ist, nicht möglich.

4.4. Fehlende Korrelation von RT-PCR-Daten mit Immunhistochemischen Daten

Nur einzelne der zellbiologisch nachvollziehbaren Beobachtungen in der Immunhistochemie konnten durch die RT-PCR gestützt werden. Bei Lassmann et al. konnte dagegen eine Korrelation von mRNA- und Proteinebene für Aurora A beim Ovarialkarzinom gezeigt werden (193).

Für die fehlende Korrelation in unseren Daten gibt es zwei mögliche Erklärungsmodelle.

Zum einen wurden die RT-PCR-Daten alle gegen ribosomale DNA normalisiert. Möglicherweise benötigen aber gerade diejenigen Zellen, deren Zellzyklus fehlreguliert ist mehr ribosomale DNA. Dann würden Unterschiede, die sich aufgrund von Zellzyklusveränderungen ergeben durch die Verrechnung mit 28S-rRNA nivelliert.

Zum anderen gibt es natürlich Regelmechanismen zwischen mRNA- und Proteinebene. In diesen Prozess sind Interferone, Wachstumsfaktoren und das Angebot an Aminosäuren eingebunden. Aber auch andere

externe Faktoren wie z.B. ein Hitzschock können die Menge an Protein, die aus der mRNA gebildet wird, beeinflussen (194).

Die RT-PCR misst also mit der mRNA nur einen einzelnen Wert, der allein keine Aussage darüber haben muss, ob auch das Protein exprimiert wird. Weitere Faktoren bestimmen letztlich darüber, welche Proteine messbar exprimiert werden. Dahingegen misst die Immunhistochemie mit dem fertigen Protein das Resultat einer Vielzahl von intra- und extrazellulären Einflüssen.

Letztendlich zeigt diese Arbeit für die hier untersuchten Proteine und Gene, dass es nicht reicht, Zellen auf mRNA-Ebene zu betrachten um eine Aussage über die tatsächliche Proteinexpression zu treffen.

Gleichzeitig haben neuere Untersuchungen mittels Genchip in großen Kohorten ihren prediktiven Wert bewiesen (195). Allerdings werden für diese Tests auch mehrere Gene untersucht und aus deren kombinierter Expression ein Risiko berechnet.

4.5. Höhere Expression in Malignomen

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass Aurora A und B, Repp86, Ki67, CDK1 und CDK2 in Brustkrebs höher exprimiert sind als in benignen Läsionen. Für Aurora A, B, Repp86 und Ki67 konnte dies auch für Ovarialkarzinome gezeigt werden. Der Test war für CDK1 und CDK2 in der Ovarkohorte nicht möglich, da keine benigne Probe gefärbt wurde.

Ein wesentliches Merkmal von Tumoren ist chromosomale Instabilität (CIN). Carter et al beschreiben in ihrer Studie Gene, die mit CIN in Zusammenhang stehen. An erster Stelle steht Repp86, doch auch Aurora A und B sowie CDK1 sind aufgeführt (11). Auch andere Studien brachten die hier untersuchten Marker mit genetischer Instabilität in Zusammenhang, so z.B. Aurora B in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (196). In der Literatur wird auch beschrieben, dass die Aktivität von Survivin, Aurora-B und INCENP verantwortlich sind für die Ras-vermittelte Zelltransformation und zu gesteigerten Wachstum von Tumorzellen führen (197, 198). Zudem kann eine Überexpression von Aurora B zu mehrkernigen Zellen führen (199).

Eine Aurora A Überexpression ist mit Zentrosomen-Vervielfachung und einer schlechten Prognose beim Ovarialkarzinom assoziiert (200). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Aurora A onkogen wirkt (72, 74), oder aber zumindest zu abnormalen Mitosen führt (128).

Dass Aurora Kinasen in Malignomen höher exprimiert sind als in Normalgewebe, wurde bereits in vielen Studien und für viele Entitäten nachgewiesen. Möglicherweise produzieren Zellen mit aberanter DNA mehr von den Proteinen, die für chromosomale Duplikation und Segregation notwendig ist. Oder aber die hohe Expression dieser Proteine spiegelt einen Kompensationsmechanismus der beeinträchtigten Funktion der Proteine und ihrer Interaktionen wieder, die verantwortlich dafür ist, die Integrität der genetischen Information auf chromosomalem Level zu gewährleisten. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Überexpression dieser Proteine es der Zelle erlaubt, sich ungehindert von den regulären Zellzyklus-Kontrollpunkten zu teilen. Dies würde der Zelle nicht nur einen direkten Proliferationsvorteil, sondern auch eine gesteigerte zelluläre Heterogenität ihrer Nachkommenschaft bereiten (11).

Möglicherweise sind Zellzyklus regulierende Proteine, die an fundamentalen Prozessen, wie der Chromosomensegregation oder DNA-Replikation beteiligt sind, aber in proliferierenden Tumoren einfach deswegen höher exprimiert, weil sie mehr sich teilende Zellen enthalten. Dann käme den von uns untersuchten Proteinen vor allem eine Rolle als Proliferationsmarker zu.

4.6. Korrelation der untersuchten Proteine und mRNAs untereinander

Die Auswertung der im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten ergab eine enge Korrelation aller untersuchten Marker untereinander sowohl in Mamma- als auch in Ovarialgewebe (hier allerdings in der Immunhistochemie nicht für CDK2 und nur eingeschränkt für CDK1). Diese Beobachtung galt für die Proteinebene ebenso wie für die mRNA-Ebene, auch wenn sich keine Korrelation der Daten untereinander fand.

Bei Betrachtung der medianen Expression auf Proteinebene fällt auf, dass in Mamma- wie in Ovarialmalignomen die Expression von Ki67, CDK1 und CDK2 deutlich höher ist als die von Aurora-A, -B und Repp86. Dies lässt sich aus der Expression der Proteine im Zellzyklus erklären: Ki67 ist während G1-, G2-, S- und M-Phase exprimiert (144). Auch die Cyclin dependent Kinasen sind auf eher konstanten Niveau exprimiert (170), allerdings in ihrer Aktivität streng reguliert. Dagegen ist Repp86 nur während der S-, G2- und M-Phase nachweisbar. Aurora A ist in der G1- und S-Phase nur auf niedrigem Niveau exprimiert, erreicht dann ihren Peak in der G2-Phase bis in die M-Phase (72, 74, 75). Aurora B erreicht ihren Peak sogar erst nach Aurora A (72). Wenn also die Aurorakinasen und Repp86 in einem deutlich kleineren zeitlichen Anteil des Zellzyklus exprimiert werden als die CDKs und Ki67, dann lassen sich natürlich auch weniger Aurorakinase- oder Repp86-positive Zellen finden und die Expression ist im Median kleiner. Für die mRNA lässt sich kein solches Expressionsmuster in unseren Daten finden.

Ki67 wurde für diese Arbeit als Proliferationsmarker ausgewählt. Dass Aurora B mit der Expression von Ki67 korreliert, wurde schon in anderen Publikationen beschrieben: von Qi et al. (201) bei Plattenepithelkarzinomen des Mundes und von Kurai et al. (202) bei Endometriumkarzinomen. Anders als in dieser Arbeit wurde dort keine Korrelation von Aurora A mit Ki67 nachgewiesen (202). Möglicherweise war der dort verwendete polyklonale Antikörper weniger spezifisch als der von uns verwendete und erst seit kurzem verfügbare monoklonale. Vielleicht gibt es allerdings auch bei Endometriumkarzinomen Aurora-B-Positivität, die von der Proliferation selbst unabhängig ist. Eine Korrelation von Aurora B mit Ki67 wurde bereits für Mammakarzinome gezeigt (203). Samaras et al. beschreiben dagegen beim Glioblastom eine Korrelation von Aurora A mit Ki67, fanden allerdings keine Korrelation von Aurora B mit Ki67 (204). Dieselbe Studie beschreibt aber eine Korrelation von Aurora A und B bei Glioblastomen (204). Die Korrelation von Aurorakinasen mit der Zellproliferation gemessen an Ki67 wurde somit reproduzierbar dargelegt, ebenso die Korrelation von Aurora A mit Aurora B.

Für einige der untersuchten Proteine sind auch direkte Interaktionsmechanismen bekannt, so besonders für Aurora A und Repp86 (67, 82). CDK1 kann über Regelung des APC-Komplex direkt auf den Abbau der Aurorakinasen und von Repp86 einwirken (101).

Aurora A ist wiederum wichtig für die Lokalisation von Cyclin-B1/CDK1 am Zentrosom (70, 71). Zudem phosphoryliert Aurora A CDC25B, was dann Cyclin-B1/CDK1 am Zentrosom aktiviert (98). Als Rückkopplungsmechanismus ist Cyclin-B1-Cdk1 involviert die Aktivierung von Protein Phosphatase 1 (PP1), die vor allem inhibitorische Einflüsse auf Aurora A ausübt (71, 85).

Die Korrelation aller untersuchten Proteine mit Ki67 spiegelt letztendlich eine enge Assoziation mit der Proliferation wieder, wie sie bei Zellzyklus-regulierenden Proteinen wie den CDKs, letztendlich aber auch den Aurorakinasen zu erwarten ist. Dies spiegelt sich auch in der Korrelation mit dem Grading wider.

4.7. Korrelation mit dem Grading

Im Tumorgrading nach Elston und Ellis bei den Mammakarzinomen und nach Silverberg bei den Ovarialkarzinomen werden tubuläre Differenzierung (bei Mammakarzinomen) bzw. histoarchitektonische Parameter (bei Ovarialkarzinomen) sowie Zellkernpolymorphie und Mitoseanzahl erfasst und daraus ein Score errechnet, der das Grading ergibt (23, 205). Da, wie oben bereits diskutiert, Aurora A und B, Repp86, CDK1 und CDK2 eng mit Aneuploidie, genetischer Instabilität und - wie durch die Korrelation mit Ki67 gezeigt - auch eng mit der Proliferation eines Tumors assoziiert sind, ist dieser Zusammenhang so zu erwarten.

Auch andere Studien haben eine Korrelation mit dem Grading gezeigt, z.B. für Aurora A bei Mammakarzinomen (206, 207). Für Aurora B z.B. wurde eine Korrelation mit dem Grading für Ovarialkarzinome (208), Kolonkarzinome, Hepatozelluläre Tumoren (209), Prostatakarzinome (199), Blasenkarzinome (210), Endometriumkarzinome (202), Seminome und Schilddrüsenkarzinome (211) dargestellt. Kurai et al (202) fanden allerdings keine Korrelation von Aurora A mit dem Grading. In der selben Studie konnte für Aurora A auch keine Korrelation mit Ki67 nachgewiesen werden. Die aber überwiegend festgestellte Korrelation mit dem Grading wird durch unsere Daten bestätigt.

Bei Betrachtung der Proteinexpression von Aurora A, B, Repp86 und Ki67 in Bezug auf das Grading beim Ovarialkarzinom fällt auf, dass benigne und Grad 1 Tumoren eine eher niedrige Expression haben, dass dagegen Grad 2 und 3 Tumoren eine höhere Expression haben. Dazu passt das von Shih und Kurman propagierte Entstehungsmodell für ovarielle Neoplasien, wonach sich hochdifferenzierte Tumoren (Grading 1) über schrittweise Mutationen von der benignen Läsion (Zystadenom oder Adenofibrom) über eine benigne Läsion mit atypischer Proliferation über ein nicht invasives Karzinom (beides Borderlinetumoren) zu einem invasiven, gut differenzierten Karzinom entwickeln, wohingegen schlecht differenzierte Tumoren sich de novo entwickeln (212). Insofern könnte die unterschiedliche Expression der Aurorakinasen, Repp86 und Ki67 auch den unterschiedlichen Entstehungsweg dieser Tumoren widerspiegeln.

4.8. Korrelation mit dem Tumorstadium und dem Nodalstatus

Bei den Mammakarzinomen fand sich kein Zusammenhang mit dem Tumorstadium. Dafür konnten wir zeigen, dass CDK1 und Aurora A in nodalpositiven Tumoren höher exprimiert waren. Für Aurora A wurde ein solcher Zusammenhang bei duktalem Mammakarzinomen bereits von Du et al. beschrieben

(213). Dagegen konnten Royce et al. einen solchen Zusammenhang nicht bestätigen (207). Eine Erklärung wäre, dass mit der Ausbreitung des Tumors auf Lymphknoten auch der Bedarf an Spindelbildungsfaktoren steigt. Eine weitere Erklärung wäre, dass mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung der Tumor an chromosomaler Instabilität gewinnt und deswegen kompensatorisch mehr Zellzyklus-regulierende Proteine exprimiert. Wie oben bereits diskutiert wurden viele der hier untersuchten Proteine mit chromosomaler Instabilität in Verbindung gebracht. Oder aber die Tumoren mit Lymphknotenbefall sind insgesamt die aggressiveren, schneller wachsenden Tumoren und exprimieren o.g. Proteine wegen ihrer stärker gesteigerten Proliferation.

Betrachtet man die Proteinmengen in Bezug auf das FIGO-Stadium der Ovarialtumoren, so fällt auf, dass ab FIGO-Stadium IIc die Aurora-Kinasen A und B sowie Repp86 sprunghaft ansteigen. Das FIGO-Stadium IIc ist dadurch definiert, dass sich Tumorzellen im Aszites nachweisen lassen. Unsere Daten suggerieren, dass diese Tumoren ein anderes Proteinexpressionsprofil aufweisen, dass also diese Tumoren sich in etwas von den Tumoren in niedrigeren Stadien unterscheiden. Möglicherweise haben Tumoren in höheren Stadien einen höheren Bedarf an Spindelbildungsfaktoren. Oder aber dieser Effekt ergibt sich dadurch, dass low-grade Tumoren häufiger bereits im niedrigen Ausbreitungsstadium entdeckt werden während high-grade Tumoren weiter fortgeschritten sind. Dies würde wieder zu dem bereits diskutierten Tumor-Entstehungsmodell von Shih und Kurman passen (212).

Aune et al. beschreiben eine erhöhte Expression von Ki-67 in höheren FIGO-Stadien und in High-Grade-Tumoren. Zudem wurde eine höhere Ki-67-Expression bei den Patientinnen gefunden, bei denen eine komplette Remission unter Chemotherapie erreicht wurde. Somit könnten gezielt aggressive Karzinome identifiziert und therapiert werden (214).

4.9. Korrelation mit Hormonrezeptorstatus

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von Aurora A, Aurora B, Ki67 und CDK2 mit Östrogenrezeptor-Negativität assoziiert ist. Für Aurora A wurde dieser Zusammenhang bereits beschrieben (206). Am ehesten spiegelt der von uns gefundene Zusammenhang die höhere Aggressivität von Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinomen.

4.10. Korrelation mit den intrinsischen Subtypen

Die intrinsischen Subtypen sollen eine Risikostratifizierung beim Mammakarzinom erlauben (36). In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Proteinexpressionen von Aurora A, Aurora B, Repp86, Ki67 und CDK2 in den unterschiedlichen Subtypen signifikant unterschiedlich sind. Dabei ist die Expression in den Luminal A Tumoren am niedrigsten und in den Triple-negativen Tumoren am höchsten. Für Ki67 überrascht das kaum, immerhin war die Ki67-Expression Teil der Klassifizierung der Subtypen. Da auch die anderen Marker mit Ki67, also der Proliferation, dem Grading und der Hormonrezeptorexpression korrelieren, überrascht auch dieses Ergebnis nicht.

4.11. Diskussion der Überlebensanalysen

4.11.1. Ki67-Expression und Überleben bei Ovarialkarzinomen

Trotz der tumorbiologischen Beobachtungen beim Ovarialkarzinom haben die in dieser Arbeit untersuchten Gene und Proteine keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Lediglich für Ki67 ergab sich ein Trend, dass eine höhere Expression zu einem verkürzten Überleben führt. Zumindest für seröse Ovarialkarzinome haben Garzetti et al. bereits 1995 zeigen können, dass eine höhere Expression von Ki67 mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben einher geht (215).

4.11.2. Aurora B-Expression und rezidivfreies Überleben in Mammakarzinomen

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass eine höhere Expression von Aurora B mit einem signifikant verkürzten rezidivfreien Überleben einher geht. Nach unserem Wissensstand ist dies in der Literatur noch nicht vorbeschrieben. So untersuchten Nadler et al. eine große Kohorte von Mammakarzinompatienten und konnten dort für Aurora B keinen Zusammenhang mit dem Überleben nachweisen (216).

In unserem Kollektiv gab es auch eine enge Korrelation von Aurora B mit dem Grading, dem Nodalstatus und dem intrinsischen Subtyp der Mammatumoren. All dies sind anerkannte Prognosefaktoren für Mammakarzinompatientinnen. Möglicherweise ist Aurora B sogar ein besserer Proliferationsmarker als Ki67, da es nur in einem kürzeren Zeitraum des Zellzyklus exprimiert ist (72, 100).

Stattdessen konnte in anderen Tumorentitäten eine schlechtere Prognose mit einer erhöhten Aurora B-Expression in Verbindung gebracht werden. So bei Glioblastomen (217), bei Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals (218), in Plattenepithelkarzinomen des Mundes (219), bei Larynxkarzinomen (220), Zervixkarzinomen (221), Kolonkarzinomen (222), hepatozellulären Karzinomen (223), Ovarialkarzinomen (208) und Gallengangskarzinomen (224). Ein gegenteiliger Effekt konnte bei Magenkarzinomen gezeigt werden. Dort fanden Enjoji et al. eine verbesserte Prognose bei Patienten mit hoher Aurora-B-Expression auf mRNA-Level (225). Wie oben beschreiben kann Östrogen im experimentellen Design in Ovarfollikelzellen und in Brustkrebszellen Aurora B induzieren und via Phosphorylierung von Histon H3 zur Zellproliferation führen (110). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inhibition von Aurora B in vitro sowie im Tumorexograftmodell an der Maus das Wachstum von Mamma- und Ovarialkarzinomen hemmen kann (226-229). Aurora B Inhibitoren befinden sich derzeit in klinischer Erprobung (230).

4.11.3. CDK2-Expression und rezidivfreies Überleben in Mammakarzinomen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe CDK2-Expression zu einem signifikant verkürztem, rezidivfreien Überleben bei Mammakarzinom-Patientinnen führt. Auch Bonin et al. fanden in ihrer Studie, dass eine hohe Expression von CDK2 auf mRNA-Ebene in Mammakarzinomen zu einem verkürzten Gesamtüberleben führt (231). Eine japanische sowie eine niederländische Studie beschreiben, dass eine hohe Aktivität von CDK2 mit einer schlechteren Prognose bei Mammakarzinomen vergesellschaftet ist (232, 233). Dabei muss angemerkt werden, dass mit unseren Untersuchungen keine Aussage über die Aktivität der Kinasen gemacht werden kann, sondern lediglich über die Expression.

Es wurden bisher keine Mutationen von CDK2 in menschlichen Tumoren beschrieben. Allerdings sind E-Typ Cycline in Tumoren häufig überexprimiert und die Expression von p21 und p27, beides Inhibitoren des Cyclin-E/CDK2-Komplexes, ist in der Tumorentstehung häufig vermindert (4, 8, 234). Das wiederum spricht für eine potentielle Beteiligung von CDK2 in der Malignomentstehung oder aber zumindest an der gesteigerten Proliferation von Tumoren. Die Ablation von p21 oder p27 aus der Keimbahn von Mäusen führt zur Tumorentstehung (4, 177). Interessanterweise haben genetische Experimente gezeigt, dass CDK2 keine entscheidende Rolle in dieser Art von Tumoren hat (235, 236). Da p21 und p27 auch CDK1 inhibieren, vermutet Malumbres, dass die Fehlregulation von CDK1 verantwortlich sein könnte für die Tumorentstehung in den Malignomen, denen p21 oder p27 fehlen (8). Für CDK2/CyclinE und CDK2/CyclinA wird angenommen, dass sie in Zellen mit defektem p53 zu Zentrosomenamplifikation führen (8, 237-239). Eine Zentrosomenamplifikation aber kann zu Formation aberanter mitotischer Spindeln führen, die dann wieder in abnormale Zellteilung und chromosomale Instabilität (CIN) münden (8). Ob CIN alleine nun aber ausreicht, um eine Tumorprogression zu bewirken wird kontrovers diskutiert (240, 241).

Während CDK2 für die Mitose nicht zwingend gebraucht wird (183), wurde doch gezeigt, dass einige Krebszelllinien, nämlich Glioblastome und Osteosarkome, CDK2 für ihre Proliferation benötigen (8, 242). Möglicherweise benötigen auch Mammakarzinome CDK2 um zu proliferieren, was CDK2 zu einem sehr interessanten Ziel in der spezifischen Antikörpertherapie machen würde. Dies insbesondere auch deswegen, weil die zu erwartenden Toxizität sich, wenn man dem Modell der knock-out Maus folgt, sich auf Sterilität beschränkt (182, 183). Da allerdings die Funktionen von CDK2 vielfach durch andere Kinasen übernommen werden kann, wie das Modell der lebenden Knock-out-Maus zeigt (182, 183), bleibt abzuwarten, ob eine Inhibition der CDK2 tatsächlich zur gewünschten Apoptose der Tumorzelle führen würde.

Aktuell laufen Studien mit CDK-Inhibitoren wie Dinaciclib, das allerdings neben CDK2 auch CDK1, CDK5 und CDK 9 inhibiert (243-245).

4.11.4. Andere Aspekte in den Überlebensanalysen

Für Ki67 konnten wir in unserem Kollektiv keinen Zusammenhang mit dem rezidivfreien Überleben feststellen. Allerdings konnten wir aufgrund der geringen Fallzahl die Gruppe der Mammakarzinome auch nicht an der von der St. Gallen-Konferenz geforderten 14% Marke trennen, sondern am Median bei 31%. Allerdings konnte auch die Unterteilung in die intrinsischen Subtypen keine Unterschiede im rezidivfreien Überleben bei den Mammakarzinomen vorhersagen. Insofern fällt diese Einteilung in unserem Kollektiv gegenüber der Untersuchung von Aurora B und CDK2 ab.

Für Aurora A und Repp86 ergab sich ein Trend, dass auch für diese Proteine eine höhere Expression mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben bei Mammakarzinomen einher geht. Bedenkt man, dass eine erhöhte Expression von Aurora A z.B. zu einem verstärkten Abbau von p53 führt (246), so erklärt sich dieser Trend leicht. Hinzu kommt, dass Aurora A mit BRCA1 interagiert, dessen Mutation die bisher wichtigste bekannte bei hereditären Mammakarzinomen ist (50). Andere Arbeiten konnten auf Gen-

Ebene an größeren Kollektiven bereits zeigen, dass Aurora A eine prognostische Bedeutung beim Mammakarzinom hat (127, 247). In einer anderen Arbeit korreliert die Aurora A Expression mit dem Grading aber nicht mit der Prognose, der Tumorgroße oder dem Nodalstatus bei Brustkrebs (207).

Eigentlich hätten wir erwartet, dass Aurora A bei Ovarialkarzinomen eine prognostische Aussagekraft hat, da dies bereits in anderen Studien gezeigt wurde (200). Lassus et al. konnten an einer großen Kohorte zeigen, dass Aurora A Überexpression mit einem aggressiveren Tumortyp und einer schlechteren Prognose assoziiert ist (248). Dagegen zeigten Lassman et al, dass eine Überexpression von Aurora A in Ovarialkarzinomen zu verbessertem Überleben bei den Patientinnen führte, die optimal operiert wurden und Carbo/Taxol erhielten. Bei den Patienten, die keine Taxane erhielten, war Aurora A Überexpression dort mit einer schlechten Prognose assoziiert (193). An unserer kleineren Kohorte konnten wir keinen Zusammenhang mit den Überleben oder auch dem Ansprechen auf eine Chemotherapie feststellen.

Für Repp86 konnten Rudolph et al. bereits zeigen, dass eine erhöhte Repp86-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert (249). Dort wurde propagiert, dass unter den Nodal-negativen Patientinnen diejenigen mit einer Expression von Repp86 unter 10% die beste Prognose hätten. Diese Analyse für die Nodal-negativen Patientinnen wurde auch an unserem Kollektiv durchgeführt und konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der Patientinnen mit einer Expression über bzw. unterhalb von 10% finden (Chi-Quadrat 2,189; $p=0,139$). Allerdings ist unser Kollektiv auch bedeutend kleiner als das dort untersuchte.

4.12. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Aurora B als auch CDK2 ein Potential als prognostische Marker beim Mammakarzinom haben. Es gibt viele Arbeiten, die den prognostischen Nutzen von Ki67 beim Mammakarzinom belegen (35, 250, 251). Allerdings gibt es auch Hinweise, dass die Auswertung durch subjektive Auszählung von Ki67 problematisch ist, da sie nicht sicher reproduzierbar ist. Schwierig scheint auch die Festlegung eines Grenzwertes zwischen niedrig- und hoch-Risiko-Gruppe. Besser erscheint die Reproduzierbarkeit von Computer-gestützten Auswertungen, die allerdings noch nicht etabliert sind und nicht für alle Gewebe in Frage kommen (252).

In unserer Kohorte war der prognostische Wert bei den meisten untersuchten Markern höher als bei Ki67, bzw. für Ki67 konnte an unserer kleineren Kohorte keine Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben gefunden werden. Bedenkt man, dass Ki67 momentan der entscheidende Marker ist, um zwischen Luminal A und Luminal B Tumoren zu unterscheiden und somit die Grundlage für die weitere Therapie bildet (36), erscheinen unsere Daten höchst bedeutsam. Denn sie implizieren, dass es möglicherweise bessere Marker als Ki67 gibt. Die prognostische Aussagekraft von Aurora B und CDK2 sollte daher unbedingt an einem größeren Kollektiv überprüft werden. Möglicherweise bieten sich diese beiden Marker auch in der Klinik zur besseren Abschätzung der Prognose an und können so helfen, z.B. eine Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie zu fällen.

Außerdem sollte überprüft werden, ob nicht auch Mammakarzinomzellen CDK2 für ihre Proliferation benötigen. Eine CDK2-Inhibition wäre dann ein eleganter therapeutischer Ansatz.

Diese Arbeit bekräftigt, dass Aurora B ein interessantes Ziel der Antikörpertherapie bei Krebserkrankungen von Brust und Eierstock darstellt. In vitro und im Tierexperiment konnte die Wirksamkeit von Aurora B-Inhibitoren bereits gezeigt werden (226-229). Es bleibt abzuwarten, ob sich diese viel versprechenden Ergebnisse auch in klinischen Studien bestätigen lassen werden.

5. Zusammenfassung

Bösartige Tumoren zeigen häufig eine gesteigerte Proliferation und eine gestörte Differenzierung, was wesentlich durch Veränderungen in der Kontrolle des Zellzyklus bedingt ist. In dieser Arbeit haben wir das Expressionsverhalten der Zellzyklus-regulierenden Moleküle Aurora A, Aurora B, Repp86, CDK1 und CDK2 an Mamma- und Ovarialtumoren sowie an benignem Vergleichsgewebe untersucht.

Um sowohl eine Aussage auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene treffen zu können, wurden Immunhistochemie und RT-PCR verwendet. Zusätzlich wurde die Expression des etablierten Proliferationsmarkers Ki67 durch Immunhistochemie bestimmt.

Wie erwartet zeigte die Immunhistochemie eine höhere Expression der untersuchten Proteine in malignen Tumoren als in benignem Gewebe ($p < 0,001$ bei Mammatumoren, $p = 0,003$ für Aurora A, $p = 0,004$ für Aurora B, $p = 0,012$ für Repp86 und $p = 0,005$ für Ki67 bei Ovarialtumoren). Die RT-PCR ergab keinen solchen Zusammenhang. Es fand sich eine enge Korrelation der untersuchten Moleküle untereinander bei Mamma- und Ovarialtumoren in der Immunhistochemie und in der RT-PCR. Für alle Proteine zeigte sich eine enge Korrelation mit dem Tumorgrading in der Immunhistochemie ($p < 0,001$ bei Mammatumoren; $p < 0,001$ für Aurora A, $p = 0,002$ für Aurora B, $p = 0,001$ für Repp86 und $p = 0,002$ für Ki67 bei Ovarialtumoren), allerdings nicht in den RT-PCR-Daten. In Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Aurora A ($p = 0,048$) und CDK1 ($p = 0,049$) in nodalpositiven Tumoren auf Proteinniveau höher ist als in nodalnegativen Tumoren. Außerdem konnten wir zeigen, dass Aurora A ($p = 0,017$) und B ($p = 0,010$), Repp86 ($p = 0,006$), Ki67 ($p = 0,011$) und CDK2 ($p = 0,010$) in Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinomen stärker exprimiert sind als in positiven. Entsprechend fand sich in der Immunhistochemie auch eine unterschiedliche Expression von Aurora A ($p = 0,007$) und B ($p = 0,002$), Repp86 ($p = 0,005$), Ki67 ($p = 0,017$) und CDK2 ($p = 0,003$) bei den verschiedenen intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms. Wieder ließ sich dieser Zusammenhang nicht durch die RT-PCR bestätigen. Mit unseren Daten konnten wir zeigen, dass eine erhöhte Expression von Aurora B ($p = 0,024$) und von CDK2 ($p = 0,002$) beim Mammakarzinom in der Immunhistochemie mit einem verkürzten Rezidiv-freien Überleben einhergeht. Beim Ovarialkarzinom konnten wir in der Immunhistochemie zeigen, dass Aurora A ($p = 0,032$) und B ($p = 0,037$) sowie Repp86 ($p = 0,048$) in Tumoren höherer FIGO-Stadien höher exprimiert sind.

Wir folgern, dass für die hier untersuchten Marker die Untersuchung mittels Immunhistochemie geeigneter ist als RT-PCR um eine Aussage über das Expressionsverhalten von Tumoren zu machen. Die enge Korrelation der Expressionen untereinander und mit Ki67, aber auch mit dem Grading, spricht für eine proliferationsabhängige Expression. Möglicherweise eignen sich einzelne der hier untersuchten Moleküle um die intrinsischen Subtypen beim Mammakarzinom zu unterscheiden. Insbesondere Aurora B und CDK2 haben ein Potential als prognostische Marker beim Mammakarzinom. Diese Arbeit bestätigt zudem die Aurorakinasen und insbesondere CDK2 als interessante Ziele einer Antikörpertherapie in der Behandlung von Mamma- und Ovarialkarzinomen.

6. Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 7. Auflage ed: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2010.
2. Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 7. Auflage ed: Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2010.
3. Krebs in Deutschland 2007/2008 Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.2012.
4. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(3):222-31.
5. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):298-306.
6. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):316-23.
7. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(10):773-85.
8. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153-66.
9. Perez de Castro I, de Carcer G, Malumbres M. A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis*. 2007;28(5):899-912.
10. Schwartzman JM, Sotillo R, Benezra R. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(2):102-15.
11. Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, Harris LN, Szallasi Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet*. 2006;38(9):1043-8.
12. Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*. 2003;3(1):51-62.
13. KrebsregisterdatenRKI-Zf.
http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html 2012.
14. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*. 1993;15(1):36-47.
15. Ellison RC, Zhang Y, McLennan CE, Rothman KJ. Exploring the relation of alcohol consumption to risk of breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2001;154(8):740-7.
16. Singh P, Kapil U, Shukla N, Deo S, Dwivedi S. Association of overweight and obesity with breast cancer in India. *Indian J Community Med*. 2011;36(4):259-62.

17. Parkin DM, Boyd L, Walker LC. 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer*. 2011;105 Suppl 2:S77-81.
18. Lahmann PH, Friedenreich C, Schuit AJ, Salvini S, Allen NE, Key TJ, et al. Physical activity and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(1):36-42.
19. Monninkhof EM, Elias SG, Vlems FA, van der Tweel I, Schuit AJ, Voskuil DW, et al. Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology*. 2007;18(1):137-57.
20. Johnson KC, Miller AB, Collishaw NE, Palmer JR, Hammond SK, Salmon AG, et al. Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). *Tob Control*. 2011;20(1):e2.
21. Narod SA, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. *Discov Med*. 2011;12(66):445-53.
22. Lage A, Rodriguez M, Pascual MR, Diaz JW, Fernandez L. Factors associated with prognosis in human breast cancer. I. Predictors for rate of evolution and relapse. *Neoplasma*. 1983;30(4):475-83.
23. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
24. Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2005;103(11):2241-51.
25. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW, Jr., Weathers E, DePalo A. Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. *Ann Surg*. 1981;193(1):15-25.
26. Winston JS, Ramanaryanan J, Levine E. HER-2/neu evaluation in breast cancer are we there yet? *Am J Clin Pathol*. 2004;121 Suppl:S33-49.
27. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000;19(13):3159-67.
28. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-92.
29. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1673-84.
30. Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist*. 2006;11 Suppl 1:4-12.
31. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.

32. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
33. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502.
34. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010;7(5):e1000279.
35. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
36. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736-47.
37. Cramer DW. The epidemiology of endometrial and ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26(1):1-12.
38. Casagrande JT, Louie EW, Pike MC, Roy S, Ross RK, Henderson BE. "Incessant ovulation" and ovarian cancer. *Lancet*. 1979;2(8135):170-3.
39. Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2003;104(2):228-32.
40. Moorman PG, Schildkraut JM, Calingaert B, Halabi S, Vine MF, Berchuck A. Ovulation and ovarian cancer: a comparison of two methods for calculating lifetime ovulatory cycles (United States). *Cancer Causes Control*. 2002;13(9):807-11.
41. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*. 2000;19(1):3-10.
42. Prat J, Ribe A, Gallardo A. Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol*. 2005;36(8):861-70.
43. Burges A, Schmalfeldt B. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(38):635-41.
44. Horn FLGM, Isabelle; Grillhösl, Christian; Berghold, Silke; Schneider, Nadine; Münster, Bigit. *Biochemie des Menschen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
45. Baserga R. The Relationship of the Cell Cycle to Tumor Growth and Control of Cell Division: A Review. *Cancer Res*. 1965;25:581-95.
46. Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet*. 2004;36(1):55-62.
47. Peter M, Heitlinger E, Haner M, Aebi U, Nigg EA. Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO J*. 1991;10(6):1535-44.

48. Blangy A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo*. *Cell*. 1995;83(7):1159-69.
49. Fourest-Lieuvain A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantéz V, et al. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell*. 2006;17(3):1041-50.
50. Ouchi M, Fujiuchi N, Sasai K, Katayama H, Minamishima YA, Ongusaha PP, et al. BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. *J Biol Chem*. 2004;279(19):19643-8.
51. Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*. 2000;102(3):279-91.
52. Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol*. 2002;22(3):874-85.
53. Giet R, Glover DM. *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol*. 2001;152(4):669-82.
54. Hannak E, Kirkham M, Hyman AA, Oegema K. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*. 2001;155(7):1109-16.
55. Barr AR, Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 17):2987-96.
56. Aguirre-Portoles C, Bird AW, Hyman A, Canamero M, Perez de Castro I, Malumbres M. Tpx2 controls spindle integrity, genome stability and tumor development. *Cancer Res*. 2012.
57. Murata-Hori M, Wang YL. The kinase activity of aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. *Curr Biol*. 2002;12(11):894-9.
58. Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, et al. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8526-30.
59. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(1):21-32.
60. Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics*. 1998;53(3):406-9.
61. Tseng TC, Chen SH, Hsu YP, Tang TK. Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol*. 1998;17(10):823-33.

-
62. Khan J, Ezan F, Cremet JY, Fautrel A, Gilot D, Lambert M, et al. Overexpression of active Aurora-C kinase results in cell transformation and tumour formation. *PLoS One*. 2011;6(10):e26512.
 63. www.proteinatlas.org.
 64. Vagnarelli P, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*. 2004;113(5):211-22.
 65. Dewar H, Tanaka K, Nasmyth K, Tanaka TU. Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature*. 2004;428(6978):93-7.
 66. Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(8):1572-7.
 67. Ducat D, Zheng Y. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res*. 2004;301(1):60-7.
 68. Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*. 1995;81(1):95-105.
 69. Schumacher JM, Ashcroft N, Donovan PJ, Golden A. A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*. 1998;125(22):4391-402.
 70. Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, et al. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*. 2003;114(5):585-98.
 71. Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, et al. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells*. 2002;7(11):1173-82.
 72. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, et al. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*. 1998;17(11):3052-65.
 73. Sen S, Zhou H, White RA. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 1997;14(18):2195-200.
 74. Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*. 1998;20(2):189-93.
 75. Kimura M, Kotani S, Hattori T, Sumi N, Yoshioka T, Todokoro K, et al. Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J Biol Chem*. 1997;272(21):13766-71.
 76. Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*. 2000;19(42):4906-16.
 77. Honda K, Mihara H, Kato Y, Yamaguchi A, Tanaka H, Yasuda H, et al. Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene*. 2000;19(24):2812-9.

-
78. Stenoien DL, Sen S, Mancini MA, Brinkley BR. Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2003;55(2):134-46.
 79. Azimzadeh J, Bornens M. Structure and duplication of the centrosome. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 13):2139-42.
 80. Littlepage LE, Wu H, Andresson T, Deanehan JK, Amundadottir LT, Ruderman JV. Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15440-5.
 81. Eyers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol*. 2003;13(8):691-7.
 82. Kufer TA, Sillje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol*. 2002;158(4):617-23.
 83. Abe Y, Ohsugi M, Haraguchi K, Fujimoto J, Yamamoto T. LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS Lett*. 2006;580(3):782-8.
 84. Bayliss R, Sardon T, Vernos I, Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell*. 2003;12(4):851-62.
 85. Katayama H, Zhou H, Li Q, Tatsuka M, Sen S. Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem*. 2001;276(49):46219-24.
 86. Lane HA, Nigg EA. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol*. 1996;135(6 Pt 2):1701-13.
 87. Sunkel CE, Glover DM. polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci*. 1988;89 (Pt 1):25-38.
 88. Petretti C, Savoian M, Montembault E, Glover DM, Prigent C, Giet R. The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO Rep*. 2006;7(4):418-24.
 89. Pugacheva EN, Golemis EA. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol*. 2005;7(10):937-46.
 90. Krystyniak A, Garcia-Echeverria C, Prigent C, Ferrari S. Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *Oncogene*. 2006;25(3):338-48.
 91. Toji S, Yabuta N, Hosomi T, Nishihara S, Kobayashi T, Suzuki S, et al. The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells*. 2004;9(5):383-97.
 92. Mori D, Yano Y, Toyo-oka K, Yoshida N, Yamada M, Muramatsu M, et al. NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol*. 2007;27(1):352-67.
 93. Terada Y, Uetake Y, Kuriyama R. Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in *Drosophila* and mammalian cells. *J Cell Biol*. 2003;162(5):757-63.

-
94. Giet R, Prigent C. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 21):3591-601.
 95. Ferrari S. Protein kinases controlling the onset of mitosis. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(7-8):781-95.
 96. Castillo A, Justice MJ. The kinesin related motor protein, Eg5, is essential for maintenance of pre-implantation embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(3):694-9.
 97. Kapitein LC, Peterman EJ, Kwok BH, Kim JH, Kapoor TM, Schmidt CF. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature.* 2005;435(7038):114-8.
 98. Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, Froment C, Trabut V, Dozier C, et al. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 12):2523-31.
 99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
 100. Shu F, Guo S, Dang Y, Qi M, Zhou G, Guo Z, et al. Human aurora-B binds to a proteasome alpha-subunit HC8 and undergoes degradation in a proteasome-dependent manner. *Mol Cell Biochem.* 2003;254(1-2):157-62.
 101. Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* 2002;9(5):931-43.
 102. Bischoff JR, Plowman GD. The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 1999;9(11):454-9.
 103. Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(11):842-54.
 104. Yasui Y, Urano T, Kawajiri A, Nagata K, Tatsuka M, Saya H, et al. Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12997-3003.
 105. Adams RR, Wheatley SP, Gouldsworthy AM, Kandels-Lewis SE, Carmena M, Smythe C, et al. INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol.* 2000;10(17):1075-8.
 106. Bishop JD, Schumacher JM. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27577-80.
 107. Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells.* 2002;7(1):11-7.
 108. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma.* 1997;106(6):348-60.
 109. Van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 23):3497-506.

-
110. Ruiz-Cortes ZT, Kimmins S, Monaco L, Burns KH, Sassone-Corsi P, Murphy BD. Estrogen mediates phosphorylation of histone H3 in ovarian follicle and mammary epithelial tumor cells via the mitotic kinase, Aurora B. *Mol Endocrinol*. 2005;19(12):2991-3000.
 111. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, et al. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*. 2005;438(7071):1116-22.
 112. Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*. 2005;438(7071):1176-80.
 113. Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, et al. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*. 2003;161(2):267-80.
 114. Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*. 2003;161(2):281-94.
 115. Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol*. 2001;155(7):1147-57.
 116. Lee SH, Itkin-Ansari P, Levine F. CENP-A, a protein required for chromosome segregation in mitosis, declines with age in islet but not exocrine cells. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(11):785-90.
 117. Andrews PD, Ovechkina Y, Morrice N, Wagenbach M, Duncan K, Wordeman L, et al. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell*. 2004;6(2):253-68.
 118. Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, et al. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol*. 2004;14(4):273-86.
 119. Ohi R, Sapra T, Howard J, Mitchison TJ. Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 2004;15(6):2895-906.
 120. Giet R, Petretti C, Prigent C. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol*. 2005;15(5):241-50.
 121. Keen N, Taylor S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(12):927-36.
 122. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res*. 2007;5(1):1-10.
 123. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med*. 2004;10(3):262-7.
 124. Cox DG, Hankinson SE, Hunter DJ. Polymorphisms of the AURKA (STK15/Aurora Kinase) Gene and Breast Cancer Risk (United States). *Cancer Causes Control*. 2006;17(1):81-3.

-
125. Fletcher O, Johnson N, Palles C, dos Santos Silva I, McCormack V, Whittaker J, et al. Inconsistent association between the STK15 F31I genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(14):1014-8.
 126. Tchatchou S, Wirtenberger M, Hemminki K, Sutter C, Meindl A, Wappenschmidt B, et al. Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk. *Cancer Lett.* 2007;247(2):266-72.
 127. Haibe-Kains B, Desmedt C, Loi S, Culhane AC, Bontempi G, Quackenbush J, et al. A three-gene model to robustly identify breast cancer molecular subtypes. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(4):311-25.
 128. Zhang D, Hirota T, Marumoto T, Shimizu M, Kunitoku N, Sasayama T, et al. Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene.* 2004;23(54):8720-30.
 129. Kufer TA, Nigg EA, Sillje HH. Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle. *Chromosoma.* 2003;112(4):159-63.
 130. Ma Y, Weimer J, Fredrik R, Adam-Klages S, Sebens S, Caliebe A, et al. Aurora kinase inhibitor AZD1152 has an additional effect of platinum on a sequential application at the human ovarian cancer cell line SKOV3. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;288(1):173-82.
 131. Krams M, Heidebrecht HJ, Hero B, Berthold F, Harms D, Parwaresch R, et al. Repp86 expression and outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2003;21(9):1810-8.
 132. Asteriti IA, Rensen WM, Lindon C, Lavia P, Guarguaglini G. The Aurora-A/TPX2 complex: a novel oncogenic holoenzyme? *Biochim Biophys Acta.* 2010;1806(2):230-9.
 133. Harel A, Forbes DJ. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol Cell.* 2004;16(3):319-30.
 134. Gruss OJ, Carazo-Salas RE, Schatz CA, Guarguaglini G, Kast J, Wilm M, et al. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell.* 2001;104(1):83-93.
 135. Nachury MV, Maresca TJ, Salmon WC, Waterman-Storer CM, Heald R, Weis K. Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell.* 2001;104(1):95-106.
 136. Wiese C, Wilde A, Moore MS, Adam SA, Merdes A, Zheng Y. Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science.* 2001;291(5504):653-6.
 137. Wittmann T, Wilm M, Karsenti E, Vernos I. TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol.* 2000;149(7):1405-18.
 138. Tsai MY, Wiese C, Cao K, Martin O, Donovan P, Ruderman J, et al. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol.* 2003;5(3):242-8.
 139. Ma N, Titus J, Gable A, Ross JL, Wadsworth P. TPX2 regulates the localization and activity of Eg5 in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol.* 2011;195(1):87-98.
 140. Vanneste D, Takagi M, Imamoto N, Vernos I. The role of Hk1p2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr Biol.* 2009;19(20):1712-7.

141. Sueishi M, Takagi M, Yoneda Y. The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2. *J Biol Chem.* 2000;275(37):28888-92.
142. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991;138(4):867-73.
143. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983;31(1):13-20.
144. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-5.
145. van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1989;49(11):2999-3006.
146. Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2(3):585-92.
147. Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, von Boguslawsky K, Nordling S. Ki-67, p53, Er-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol.* 1997;36(4):369-74.
148. Pietilainen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjanen K. The important prognostic value of Ki-67 expression as determined by image analysis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(11):687-92.
149. Spyrtos F, Ferrero-Pous M, Trassard M, Hacene K, Phillips E, Tubiana-Hulin M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer.* 2002;94(8):2151-9.
150. Pierga JY, Leroyer A, Viehl P, Mosseri V, Chevillard S, Magdelenat H. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;37(1):57-64.
151. Gasparini G, Pozza F, Meli S, Reitano M, Santini G, Bevilacqua P. Breast cancer cell kinetics: immunocytochemical determination of growth fractions by monoclonal antibody Ki-67 and correlation with flow cytometric S-phase and with some features of tumor aggressiveness. *Anticancer Res.* 1991;11(6):2015-21.
152. Ellis PA, Makris A, Burton SA, Titley J, Ormerod MG, Salter J, et al. Comparison of MIB-1 proliferation index with S-phase fraction in human breast carcinomas. *Br J Cancer.* 1996;73(5):640-3.
153. Thor AD, Liu S, Moore DH, 2nd, Edgerton SM. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(2):470-7.

154. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, et al. The utility of mitotic index, oestrogen receptor and Ki-67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 1999;25(4):356-63.
155. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? *Cancer.* 2003;97(5):1321-31.
156. Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, Ellis IO, Elston CW, Robertson JF, et al. Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer.* 1989;59(6):943-7.
157. Moriki T, Takahashi T, Kataoka H, Hiroi M, Yamane T, Hara H. Proliferation marker MIB-1 correlates well with proliferative activity evaluated by BrdU in breast cancer: an immunohistochemical study including correlation with PCNA, p53, c-erbB-2 and estrogen receptor status. *Pathol Int.* 1996;46(12):953-61.
158. Sasaki K, Matsumura K, Tsuji T, Shinozaki F, Takahashi M. Relationship between labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors. *Cancer.* 1988;62(5):989-93.
159. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics.* 1991;11(2):476-7.
160. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992;25(1):31-40.
161. Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 1996;29(7):413-25.
162. Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 6):1253-63.
163. Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 1):143-53.
164. Braun N, Papadopoulos T, Muller-Hermelink HK. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1988;56(1):25-33.
165. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7212-20.
166. Key G, Petersen JL, Becker MH, Duchrow M, Schluter C, Askaa J, et al. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. *J Clin Pathol.* 1993;46(12):1080-4.
167. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology.* 1993;22(4):355-60.

-
168. Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*. 1992;71(4):543-6.
 169. Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, Ruderman J, Beach D. Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*. 1989;56(5):829-38.
 170. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995;374(6518):131-4.
 171. Enserink JM, Kolodner RD. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div*. 2010;5:11.
 172. Devault A, Martinez AM, Fesquet D, Labbe JC, Morin N, Tassan JP, et al. MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *EMBO J*. 1995;14(20):5027-36.
 173. Tassan JP, Jaquenoud M, Fry AM, Frutiger S, Hughes GJ, Nigg EA. In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J*. 1995;14(22):5608-17.
 174. De Souza CP, Osmani AH, Wu LP, Spotts JL, Osmani SA. Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. 2000;102(3):293-302.
 175. Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol*. 2003;5(2):143-8.
 176. Kramer A, Mailand N, Lukas C, Syljuasen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, et al. Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol*. 2004;6(9):884-91.
 177. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(11):630-41.
 178. Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science*. 1998;282(5388):487-90.
 179. Abe S, Nagasaka K, Hirayama Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Aoyagi Y, et al. The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev*. 2011;25(8):863-74.
 180. Zachariae W, Schwab M, Nasmyth K, Seufert W. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science*. 1998;282(5394):1721-4.
 181. Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, et al. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*. 2005;434(7033):598-604.
 182. Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, et al. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet*. 2003;35(1):25-31.
 183. Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol*. 2003;13(20):1775-85.
 184. Hydbring P, Larsson LG. Cdk2: a key regulator of the senescence control function of Myc. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(4):244-50.

-
185. 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.
 186. Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract*. 1993;189(8):862-6.
 187. Garcia-Caballero T, Menendez MD, Vazquez-Boquete A, Gallego R, Forteza J, Fraga M. HER-2 status determination in breast carcinomas. A practical approach. *Histol Histopathol*. 2006;21(3):227-36.
 188. Bilous M, Ades C, Armes J, Bishop J, Brown R, Cooke B, et al. Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER2000 International Study. *Breast*. 2003;12(2):92-8.
 189. Celaya MO, Berke EM, Onega TL, Gui J, Riddle BL, Cherala SS, et al. Breast cancer stage at diagnosis and geographic access to mammography screening (New Hampshire, 1998-2004). *Rural Remote Health*. 2010;10(2):1361.
 190. Regierer ACuP, K. *Mammakarzinom Manual Diagnostik und Therapie* 2005.
 191. Kiechle M. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1. Auflage ed 2007.
 192. Janni BR, B; Friese, K. *Facharzt Gynäkologie*. 1. Auflage ed. München: Elsevier GmbH; 2008.
 193. Lassmann S, Shen Y, Jutting U, Wiehle P, Walch A, Gitsch G, et al. Predictive value of Aurora-A/STK15 expression for late stage epithelial ovarian cancer patients treated by adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13(14):4083-91.
 194. Löffler Gu, Petro E. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. ed 2003.
 195. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsky P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(18):6012-20.
 196. Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, et al. Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. *Br J Cancer*. 2005;93(6):719-29.
 197. Kanda A, Kawai H, Suto S, Kitajima S, Sato S, Takata T, et al. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene*. 2005;24(49):7266-72.
 198. Temme A, Diestelkoetter-Bachert P, Schmitz M, Morgenroth A, Weigle B, Rieger MA, et al. Increased p21(ras) activity in human fibroblasts transduced with survivin enhances cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;327(3):765-73.
 199. Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, et al. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *Prostate*. 2006;66(3):326-33.

-
200. Landen CN, Jr., Lin YG, Immaneni A, Deavers MT, Merritt WM, Spannuth WA, et al. Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007;13(14):4098-104.
 201. Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, et al. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch.* 2007;450(3):297-302.
 202. Kurai M, Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Kashima H, et al. Expression of Aurora kinases A and B in normal, hyperplastic, and malignant human endometrium: Aurora B as a predictor for poor prognosis in endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 2005;36(12):1281-8.
 203. Hegyi K, Egervari K, Sandor Z, Mehes G. Aurora kinase B expression in breast carcinoma: cell kinetic and genetic aspects. *Pathobiology.* 2012;79(6):314-22.
 204. Samaras V, Stamatelli A, Samaras E, Arnaoutoglou C, Arnaoutoglou M, Stergiou I, et al. Comparative immunohistochemical analysis of aurora-A and aurora-B expression in human glioblastomas. Associations with proliferative activity and clinicopathological features. *Pathol Res Pract.* 2009;205(11):765-73.
 205. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol.* 2000;19(1):7-15.
 206. Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, Noguchi S. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer.* 2001;92(3):370-3.
 207. Royce ME, Xia W, Sahin AA, Katayama H, Johnston DA, Hortobagyi G, et al. STK15/Aurora-A expression in primary breast tumors is correlated with nuclear grade but not with prognosis. *Cancer.* 2004;100(1):12-9.
 208. Chen YJ, Chen CM, Twu NF, Yen MS, Lai CR, Wu HH, et al. Overexpression of Aurora B is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Virchows Arch.* 2009;455(5):431-40.
 209. Sistayanarain A, Tsuneyama K, Zheng H, Takahashi H, Nomoto K, Cheng C, et al. Expression of Aurora-B kinase and phosphorylated histone H3 in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2006;26(5A):3585-93.
 210. Bufo P, Sanguedolce F, Tortorella S, Cormio L, Carrieri G, Pannone G. Expression of mitotic kinases phospho-aurora A and aurora B correlates with clinical and pathological parameters in bladder neoplasms. *Histol Histopathol.* 2010;25(11):1371-7.
 211. Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, Troncone G, Palombini L, Bavetsias V, et al. Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):928-35.
 212. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 2004;164(5):1511-8.

-
213. Du J, Du Q, Zhang Y, Sajdik C, Ruan Y, Tian XX, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins BUBR1, MAD2, Aurora A, cyclin A and cyclin E in invasive ductal breast carcinomas. *Histol Histopathol.* 2011;26(6):761-8.
 214. Aune G, Stunes AK, Tingulstad S, Salvesen O, Syversen U, Torp SH. The proliferation markers Ki-67/MIB-1, phosphohistone H3, and survivin may contribute in the identification of aggressive ovarian carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(5):444-53.
 215. Garzetti GG, Ciavattini A, Goteri G, De Nictolis M, Stramazzotti D, Lucarini G, et al. Ki67 antigen immunostaining (MIB 1 monoclonal antibody) in serous ovarian tumors: index of proliferative activity with prognostic significance. *Gynecol Oncol.* 1995;56(2):169-74.
 216. Nadler Y, Camp RL, Schwartz C, Rimm DL, Kluger HM, Kluger Y. Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(14):4455-62.
 217. Zeng WF, Navaratne K, Prayson RA, Weil RJ. Aurora B expression correlates with aggressive behaviour in glioblastoma multiforme. *J Clin Pathol.* 2007;60(2):218-21.
 218. Erpolat OP, Gocun PU, Akmansu M, Karakus E, Akyol G. High expression of nuclear survivin and Aurora B predicts poor overall survival in patients with head and neck squamous cell cancer. *Strahlenther Onkol.* 2012.
 219. Pannone G, Hindi SA, Santoro A, Sanguedolce F, Rubini C, Cincione RI, et al. Aurora B expression as a prognostic indicator and possible therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(1):79-88.
 220. Garcia-Fernandez E, De Diego JI, Collantes-Bellido E, Mendiola M, Prim MP, Perez-Fernandez E, et al. Aurora B kinase expression in laryngeal squamous cell carcinoma and its prognostic implications. *Histopathology.* 2011;58(3):368-76.
 221. Saxena M, Singh S, Negi MP, Srivastava AK, Trivedi R, Singh U, et al. Expression profiling of G2/M phase regulatory proteins in normal, premalignant and malignant uterine cervix and their correlation with survival of patients. *J Cancer Res Ther.* 2010;6(2):167-71.
 222. Pohl A, Azuma M, Zhang W, Yang D, Ning Y, Winder T, et al. Pharmacogenetic profiling of Aurora kinase B is associated with overall survival in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* 2011;11(2):93-9.
 223. Lin ZZ, Jeng YM, Hu FC, Pan HW, Tsao HW, Lai PL, et al. Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma. *Aurora B Overexpression in HCC. BMC Cancer.* 2010;10:461.
 224. Shen YC, Hu FC, Jeng YM, Chang YT, Lin ZZ, Chang MC, et al. Nuclear overexpression of mitotic regulatory proteins in biliary tract cancer: correlation with clinicopathologic features and patient survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):417-23.
 225. Enjoji M, Iida S, Sugita H, Ishikawa T, Uetake H, Inokuchi M, et al. BubR1 and AURKB overexpression are associated with a favorable prognosis in gastric cancer. *Mol Med Report.* 2009;2(4):589-96.

-
226. Gully CP, Zhang F, Chen J, Yeung JA, Velazquez-Torres G, Wang E, et al. Antineoplastic effects of an Aurora B kinase inhibitor in breast cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:42.
227. Jani JP, Arcari J, Bernardo V, Bhattacharya SK, Briere D, Cohen BD, et al. PF-03814735, an orally bioavailable small molecule aurora kinase inhibitor for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(4):883-94.
228. Hardwicke MA, Oleykowski CA, Plant R, Wang J, Liao Q, Moss K, et al. GSK1070916, a potent Aurora B/C kinase inhibitor with broad antitumor activity in tissue culture cells and human tumor xenograft models. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(7):1808-17.
229. Soncini C, Carpinelli P, Gianellini L, Fancelli D, Vianello P, Rusconi L, et al. PHA-680632, a novel Aurora kinase inhibitor with potent antitumoral activity. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):4080-9.
230. www.clinicaltrials.gov.
231. Bonin S, Brunetti D, Benedetti E, Gorji N, Stanta G. Expression of cyclin-dependent kinases and CDC25a phosphatase is related with recurrences and survival in women with peri- and post-menopausal breast cancer. *Virchows Arch*. 2006;448(5):539-44.
232. Kim SJ, Nakayama S, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Matsushima T, et al. Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer. *Ann Oncol*. 2008;19(1):68-72.
233. van Nes JG, Smit VT, Putter H, Kuppen PJ, Kim SJ, Daito M, et al. Validation study of the prognostic value of cyclin-dependent kinase (CDK)-based risk in Caucasian breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2009;100(3):494-500.
234. Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004;9(1):67-80.
235. Martin A, Odajima J, Hunt SL, Dubus P, Ortega S, Malumbres M, et al. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell*. 2005;7(6):591-8.
236. Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P. Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol*. 2005;7(8):831-6.
237. Fukasawa K. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):911-24.
238. Duensing A, Liu Y, Tseng M, Malumbres M, Barbacid M, Duensing S. Cyclin-dependent kinase 2 is dispensable for normal centrosome duplication but required for oncogene-induced centrosome overduplication. *Oncogene*. 2006;25(20):2943-9.
239. Hanashiro K, Kanai M, Geng Y, Sicinski P, Fukasawa K. Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells. *Oncogene*. 2008;27(40):5288-302.
240. Weaver BA, Cleveland DW. Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007;67(21):10103-5.
241. Yuen KW, Desai A. The wages of CIN. *J Cell Biol*. 2008;180(4):661-3.

-
242. van den Heuvel S, Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*. 1993;262(5142):2050-4.
 243. Johnson AJ, Yeh YY, Smith LL, Wagner AJ, Hessler J, Gupta S, et al. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH727965) promotes apoptosis and abrogates microenvironmental cytokine protection in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2012;26(12):2554-7.
 244. Gorlick R, Kolb EA, Houghton PJ, Morton CL, Neale G, Keir ST, et al. Initial testing (stage 1) of the cyclin dependent kinase inhibitor SCH 727965 (dinaciclib) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(7):1266-74.
 245. Zhang D, Mita M, Shapiro GI, Poon J, Small K, Tzontcheva A, et al. Effect of aprepitant on the pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib in patients with advanced malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;70(6):891-8.
 246. Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):42-50.
 247. Siggelkow W, Boehm D, Gebhard S, Battista M, Sicking I, Lebrecht A, et al. Expression of aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12:562.
 248. Lassus H, Staff S, Leminen A, Isola J, Butzow R. Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2011;120(1):11-7.
 249. Rudolph P, Alm P, Heidebrecht HJ, Bolte H, Ratjen V, Baldetorp B, et al. Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(3):271-8.
 250. Wiesner FG, Magener A, Fasching PA, Wesse J, Bani MR, Rauh C, et al. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. *Breast*. 2009;18(2):135-41.
 251. Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, et al. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res*. 2011;13(2):R22.
 252. Gudlaugsson E, Skaland I, Janssen EA, Smaaland R, Shao Z, Malpica A, et al. Comparison of the effect of different techniques for measurement of Ki67 proliferation on reproducibility and prognosis prediction accuracy in breast cancer. *Histopathology*. 2012;61(6):1134-44.

7. Danksagung

Herrn PD Dr. med. Christian Schem möchte ich für die Überlassung des spannenden Themas und die ausdauernde und kompetente Betreuung dieser Arbeit danken.

Auch Herrn Dr. rer. nat. Jörg Weimer danke ich für die sachkundige Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Walter Jonat für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für die praktische und professionelle Einführung in die Auswertung der Immunhistochemie und Histopathologie danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfram Klapper herzlich.

Außerdem danke ich Frau Dipl. math. Dipl. phys. Dr. Amke Caliebe für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Besonders möchte ich auch Sigrid Hamann danken, die mir nicht nur die Prinzipien der Immunhistochemie sondern auch die Grundlagen der allgemeinen Laborarbeit nahe gebracht hat.

Regina Grunewald danke ich für die fachkundige Durchführung der RT-PCR und für die praxisbezogene Erläuterung dieser Methode.

Vor allem aber danke ich meiner Familie, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich während der Doktorarbeit immer unterstützt hat.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Linda Charlotte Dittmann
Geburtsdatum: 18.11.1983
Geburtsort: Berlin

Schulbildung

08/90-07/94 Schule Grönauer-Baum, Grundschule
08/94-06/03 Katharineum zu Lübeck, Gymnasium
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/03 – 12/09 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
12/09 Approbation als Ärztin

Berufsausbildung

seit 01/2010 Ärztin in Weiterbildung an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKSH, Campus Kiel
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat, FRCOG

Promotion

seit dem 15.01.2007 Expressionsanalyse von Aurora-Kinase A, Aurora-Kinase B, Repp 86, Cyclin-Dependent-Kinase 1 und Cyclin-Dependent-Kinase 2 bei Mamma- und Ovarialkarzinomen

Veröffentlichung von Resultaten aus dieser Arbeit

Chromosome segregation control pathway of Aurora kinases correlates with tumor grade in breast cancer and ovarian cancer
L. Dittmann, A. Pulwitt, D. Bauerschlag, J. Weimer, M. C. Mundhenke, F. Hilpert, N. Arnold, C. Schem
Archives of Gynecology and Obstetrics, Abstracts of the 58th Congress of the German Society of Gynecology and Obstetrics; 5-8 October 2010, Munich, Springer Verlag.