

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Proteinexpression von UBE2C, TOP2A, FASN, CCNB1,
CDC2 und Ki-67 im Ovarialkarzinom zur Trennung von
Low-grade und High-grade**

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

vorgelegt von
Sonja Pilz
aus **Kiel**

Kiel **2019**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Arnold, Klinik für Gynäkologie und
Geburtshilfe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dirk O. Bauerschlag, Klinik für Gynäkologie
und Geburtshilfe

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.12.2018

gez.: Prof. Dr. Ibrahim Alkatout
Vorsitzender der Prüfungskommission

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Ovarialtumoren	1
1.2 Ätiopathologie und Risikofaktoren.....	1
1.3 Progressionsmodell des Ovarialkarzinoms.....	2
1.4 Stadieneinteilung und Tumorausbreitung.....	3
1.5 Histologische Klassifizierung.....	4
1.6 Histologischer Malignitätsgrad.....	4
1.7 Pathologische Besonderheiten der Borderline-Tumoren des Ovars.....	4
1.8 Klinische Symptomatik und Diagnostik.....	5
1.9 Therapie des Ovarialkarzinoms und der Borderline-Tumoren.....	5
1.10 Klinisch etablierte Prognosefaktoren.....	6
1.11 Neue molekularbiologische Prognosefaktoren.....	6
1.12 Hintergrund der vorliegenden Arbeit.....	7
1.12.1 Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C	7
1.12.2 Topoisomerase II-alpha	8
1.12.3 Fatty Acid Synthase.....	9
1.12.4 Cyclin B1.....	10
1.12.5 Cyclin-dependent Kinase 1.....	10
1.12.6 Antigen Ki-67.....	11
1.13 Fragestellung dieser Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs	13
2.2 Herstellung der Tissue-Microarrays	13
2.3 Labormaterialien.....	15
2.3.1 Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterialien	15
2.3.2 Chemikalien.....	15
2.3.3 Rezepte für Pufferlösungen	15
2.4 Immunhistochemischer Färbeablauf.....	16
2.4.1 Herstellung der Schnittpräparate und Deparaffinieren der Schnitte.....	16

2.4.2	Antigen-Demaskierung und Blockung der endogenen Peroxidase	16
2.4.3	Background Block, primärer Antikörper und PostBlock-Reagenz	17
2.4.4	Primäre Antikörper im Detail	17
2.4.5	Sekundärer Antikörper und Farbentwicklung	18
2.4.6	Gegenfärbung und Eindecken	18
2.4.7	Positiv- und Negativkontrollen der Serienfärbungen	18
2.4.8	Auswertung der Färbungen	19
2.4.9	Statistische Analyse.....	20
3	Ergebnisse	21
3.1.1	Alter bei Diagnosestellung	21
3.1.2	Stadieneinteilung nach FIGO	21
3.1.3	Grading.....	21
3.1.4	Histopathologische Einteilung.....	21
3.1.5	Körpergröße und Körpergewicht.....	22
3.1.6	Ca-125 Wert	22
3.1.7	Primäroperation und Lymphonodektomie (LNE)	22
3.1.8	Informationen zum Tumorrest.....	23
3.1.9	Aszites und Peritonealkarzinose.....	23
3.1.10	Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapeutika.....	23
3.2	Vergleich der Proteinexpression in den benignen Tumoren, BOT und Ovarialkarzinomen sowie in den verschiedenen Gradingstufen	24
3.2.1	Proteinexpression von „Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C“ (UBE2C).....	24
3.2.2	Proteinexpression von „Topoisomerase II-alpha“ (TOP2A/S1).....	25
3.2.3	Proteinexpression von „Topoisomerase II-alpha“ (TOP2A/S4).....	26
3.2.4	Proteinexpression von „Fatty Acid Synthase“ (FASN).....	27
3.2.5	Proteinexpression von „Cyclin B1“ (Cyclin B1).....	28
3.2.6	Proteinexpression von „Cyclin-dependent Kinase 1“ (CDC2).....	29
3.2.7	Proteinexpression von „Antigen Ki-67“ (Ki-67).....	30
3.3	Beispiele für die immunhistochemischen Färbungen.....	31
3.4	Korrelation der Proteinexpression der Marker untereinander	31
3.5	Unterscheidung der Proteinexpression in den Gruppen Low-grade (BOT/G1) versus High-grade (G2/G3)	32
3.6	Korrelation von UBE2C/Ki-67 und UBE2C/TOP2A(S4).....	33
4	Diskussion	34
4.1	Validierung der Kollektivdaten	34

4.1.1	Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C	35
4.1.2	Topoisomerase II-alpha	36
4.1.3	Fatty Acid Synthase.....	38
4.1.4	Cyclin B1.....	39
4.1.5	Cyclin-dependent Kinase 1.....	40
4.1.6	Antigen Ki-67.....	41
4.2	Limitierende Faktoren dieser Arbeit.....	42
5	Zusammenfassung.....	44
6	Literaturverzeichnis.....	46
7	Danksagung.....	57

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGO-OVAR	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, Studiengruppe Ovar
AK (prim./sek.)	Antikörper (primär/sekundär)
AKT	Proteinkinase B
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BOT	Borderline-Tumor mit niedrigmalignem Potential
BRAF	<i>V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1</i>
BRCA	Brustkrebsgen
CA	Karzinom
Ca-125	<i>Cancer-Antigen 125</i>
CCNB1	<i>Cyclin B1</i>
CCNE1	<i>Cyclin E1</i>
CD 24	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC2/CDK1	<i>Cyclin-dependent Kinase 1</i>
c-Myc	zelluläres Myc
COX	Cyclooxygenase
CXCR 2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
C 93	<i>Synthetic FASN Inhibitor 93</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochloride
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR5/TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 10B</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERBB2	<i>V-erb-b2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2</i>
FASN	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
GADD 45	<i>Growth Arrest and DNA-damage-inducible 45 Protein</i>
G1/G2/G3	<i>Grading G1 / G2 / G3</i>
G0/G2/M-Phase	Ruhe- / prämitotische- / Mitose-Phase
HE	Hämatoxylin-Eosin

HER-2/neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IRS	Immunreaktiver Score
kDA	Kilodalton
Ki-67	Antigen Ki-67
K-RAS	<i>V-ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LK	Lymphknoten
LNE	Lymphonodektomie
MPF	<i>Maturation Promoting Factor</i>
MIB-1	<i>E3 Ubiquitin-protein Ligase MIB1</i>
MKP-1	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase 1</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
OVCA	Ovarialkarzinom
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor Type 1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
p53	<i>Protein p53</i>
R0/R1/R2	operativ kein- / mikroskopischer- / makroskopischer Tumorrest
RNA	Ribonukleinsäure
Std.	Standardabweichung
TNM	Tumor-Nodus-Metastase-Klassifikation
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TOP2A	<i>Topoisomerase II-alpha</i>
UBE2C	<i>Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C</i>
UK-SH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
UICC	<i>Union Internationale contre le Cancer</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Ovarialkarzinome und BOT nach TNM- und FIGO-Stadium, prozentualem Anteil an diagnostizierten Tumoren und 5 Jahresüberlebensraten	3
Tabelle 2: Zusammenfassung der negativen Prognosefaktoren der BOT und des Ovarialkarzinoms	6
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten primären Antikörper mit Angaben zum Hersteller und zur Inkubation.....	17
Tabelle 4: Ermittlung des Immunreaktiven Scores (IRS) für Cyclin B1 und FASN.....	20
Tabelle 5: Darstellung des FIGO-Stadiums im Kollektiv der BOT und Ovarialkarzinome	21
Tabelle 6: Darstellung des BMI bei Diagnose im Kollektiv der benignen Tumoren, BOT und Ovarialkarzinome	22
Tabelle 7: Darstellung des Ca-125 Wertes bei Diagnose sowie nach adjuvanter Chemotherapie im Kollektiv der benignen Tumore, BOT und Ovarialkarzinome	22
Tabelle 8: Darstellung der Korrelation der Proteinexpression der Marker untereinander.	31
Tabelle 9: Darstellung der errechneten Fläche unter der Kurve und des maximalen Youden-Index (größte Sensitivität und größte Spezifität) für alle untersuchten Marker in den Gruppen Low-grade (BOT/G1) und High-grade (G2/G3)	32

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Fertiger TMA-Akzeptorblock Nr. 8	14
Abb. 2: UBE2C, CDC2 und Ki-67 als Beispiel für gefärbte TMA mit den enthaltenen Positivkontrollen	19
Abb. 3: Tonsille als Positivkontrolle, Färbung für Cyclin B1, 400-fach (20x).....	19
Abb. 4: Tonsille als Negativkontrolle,400-fach (20x)	19
Abb. 5: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von UBE2C in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3	24
Abb. 6: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von TOP2A/S1 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3	25
Abb. 7: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von TOP2A/S4 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3	26
Abb. 8: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von FASN in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3	27
Abb. 9: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von Cyclin B1 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3	28
Abb. 10: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von CDC2 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3	29
Abb. 11: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von Ki-67 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3	30
Abb. 12: Beispiele aus der immunhistochemischen Färbung für alle Marker außer TOP2A (S4).....	31
Abb. 13: Darstellung der Fähigkeit aller untersuchten Marker, die Gruppen Low-grade (BOT/G1) und High-grade (G2/G3) anhand der Proteinexpression voneinander zu trennen.....	32

Abb. 14: Korrelation von UBE2C/Ki-67 und UBE2C/S4 in den BOT und Ovarialkarzinomen
mittels logistischer Regression. Die Korrelation ist dabei für die Werte auf dem 0,01
Niveau signifikant (zweiseitig) 33

1 Einleitung

Das Ovarialkarzinom ist in Nordamerika und Westeuropa der zweithäufigste Genitaltumor der Frau und trotz aller Fortschritte in der Diagnostik und Therapie noch immer das gynäkologische Malignom mit der höchsten Todesrate [1]. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Suche nach prognostisch relevanten molekularen Markern, welche eine genauere individuelle Prognose dieser heterogenen Gruppe von Tumoren ermöglichen könnte.

1.1 Epidemiologie der Ovarialtumoren

In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 7790 Frauen an einem Ovarialkarzinom und 5529 versterben an dessen Folgen. Mit einer Inzidenz von 12,2 und einer Mortalität von 8/100.000 pro Jahr liegen wir damit im europäischen Mittelfeld [1]. Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes sind die Erkrankungsraten in den letzten 20 Jahren leicht zurückgegangen. Die hohe tumorbedingte Mortalität ist jedoch auch durch verbesserte Operationstechniken und den Einsatz neuer medikamentöser Behandlungskonzepte nur wenig rückläufig [1, 2]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 59 bis 69 Jahren [1, 3, 4].

Neben den malignen Ovarialkarzinomen kommen im Ovar auch Borderline-Tumoren mit niedrigmalignem Potential (BOT) vor. Diese stellen mit einer Inzidenz von 1,8-4,8/100.000 ca. 10-20% aller ovariellen Neoplasien dar. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei den BOT zwischen dem 38. und 54. Lebensjahr [4-10]. Im Gegensatz zu den Karzinomen haben sie eine deutlich bessere Prognose und eine geringere Rezidivhäufigkeit [11-13]. Das 10-Jahresüberleben beträgt über 90%, wohingegen das 5-Jahresüberleben bei den Karzinomen -je nach Stadium- lediglich bei 35-53% liegt [1, 3, 4, 8].

1.2 Ätiopathologie und Risikofaktoren

Etwa 90% der Ovarialkarzinome treten spontan auf und bei 5-10% geht man von einer genetischen Disposition aus [14, 15]. Wie es zur Karzinomentstehung kommen kann, lässt sich durch verschiedene Thesen erklären: Für Fathalla stellt die ständige Ovulation und die durch sie ausgelösten Verletzungen und Reparaturvorgänge im Epithel die Grundlage für Neoplasien des Ovars dar [16]. Dies scheint bestätigt zu werden durch die Tatsache, dass hohes Alter, Nulliparität sowie frühe Menarche und späte Menopause ein gesteigertes Karzinomrisiko aufweisen, Schwangerschaften und Stillen jedoch protektiv wirken [1, 7, 13, 14]. Ebenfalls protektiv wirken sich eine Tubenligatur oder Hysterektomie und die Einnahme von Ovulationshemmern aus: Eine 5-jährige Pilleneinnahme reduziert das Risiko dabei um ca.

30% [7, 13, 17, 18]. Zusätzlich zu den postovulatorischen Reparaturvorgängen sollen die Tiefenverlagerung des Ovariepithels bei der Ovulation mit der Bildung von Inklusionszysten oder die Absiedlung von epithelialen Zellnestern aus der Rete-ovarii-Region mit Stammzellcharakter zur Metaplasie führen [19]. Ernährungsfaktoren, Rassenzugehörigkeit und geographische Faktoren tragen weiterhin zur Krankheitsentstehung bei und auch das Vorliegen einer Endometriose scheint das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken zu erhöhen [2, 7, 13, 20, 21]. In neueren Studien wird diskutiert, ob die Ovarialkarzinome ihren Ursprung extraovariell oder im Epithel des Fimbrientrichters nehmen und sich dann, nach dem Kontakt mit dem Ovargewebe, ovariell ausbreiten [22-24].

Bei bis zu 10% der Patientinnen tritt das Ovarialkarzinom auf Grund genetischer Defekte oder im Rahmen von Syndromen familiär gehäuft auf. Die größte Bedeutung besitzt hierbei das „*Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrom*“. Es ist assoziiert mit Mutationen in den Tumorsuppressorgenen der „*Breast Cancer Gene*“ *BRCA-1* und *BRCA-2*, welche zu gehäuftem Auftreten von Brust- und Eierstockkrebs führen und das Lebenszeitrisiko auf bis zu 50% erhöhen [1, 13, 15, 25].

1.3 Progressionsmodell des Ovarialkarzinoms

Das Ovar besteht aus Oberflächenepithel, Stroma und Keimzellen. Neoplasien können in allen drei Ursprungsgeweben entstehen, jedoch gehen über 90% der ovariellen Karzinome aus dem Epithel hervor [12, 13, 15, 26]. In neueren Studien wurde gezeigt, dass zwei Progressionstypen bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms unterschieden werden müssen:

Typ-I-Karzinome sind hochdifferenziert und genetisch stabil. Sie entstehen aus benignen Vorläuferläsionen über BOT und beinhalten unter anderem die hochdifferenzierten serösen und endometrioiden Karzinome [27, 28]. Ihre Diagnose erfolgt oft in frühen Tumorstadien, doch auch in fortgeschrittenen Stadien besitzen sie eine bessere Prognose als die schlecht differenzierten Karzinome, zeigen jedoch ein insgesamt schlechteres Ansprechen auf Chemotherapeutika [27, 29, 30].

Typ-II-Karzinome hingegen sind schlecht differenziert und genetisch instabil. Sie entwickeln sich direkt aus dem Ovariepithel und entstehen ohne Vorläuferläsionen. Zu Ihnen zählen unter anderem die schlecht- bis undifferenzierten serösen Karzinome. Die Diagnose erfolgt meist erst in fortgeschrittenen Tumorstadien, nach kurzer Anamnese und mit entsprechend schlechter Prognose [27, 28, 31]. Insgesamt hat man bei all diesen Ovarialkarzinomen häufige Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* oder die Überexpression von Onkogenen wie *HER-2/neu*, *c-Myc*, *K-RAS*, *AKT* und *CCNE1* nachweisen können. Die Typ-I-Karzinome hingegen

zeigen vor allem *K-RAS*-, *BRAF*- und *ERBB2*-Mutationen [15, 21, 27, 29, 32, 33]. Bei den serösen Karzinomen wurde eine Einteilung in *High-grade*- und *Low-grade*-Karzinome vorgenommen: G2-Karzinome verhalten sich dabei oft wie diejenigen der *High-grade* G3-Gruppe aber nur selten wie diejenigen der *Low-grade* G1-Gruppe [29]. Histopathologisch ist eine exakte Einteilung oft nicht sicher möglich, sie ist aber ausschlaggebend für die weitere Therapieentscheidung, so dass aktuell nach neuen Markern zur Unterscheidung gesucht wird.

1.4 Stadieneinteilung und Tumorausbreitung

Ovarialtumoren lassen sich anhand der Klassifikation der „*Fédération Internationale de Gynécologie et Obstetrique*“ (FIGO) und der Tumor-Nodus-Metastase-Klassifikation (TNM) der „*Union International Contre le Cancer*“ (UICC) einteilen [34-36]. Die FIGO-Stadien beziehen sich dabei auf das chirurgische Staging, die TNM-Klassifikation richtet sich nach klinisch-pathologischen Kriterien [6, 7]. Seit 2014 ist eine neue FIGO-Klassifikation gültig, welche nun das Ovarial-, das Tuben- und primäre Peritonealkarzinom einheitlich definiert [37]. Die klinischen Angaben dieser Arbeit beziehen sich jedoch noch auf die alte FIGO-Klassifikation, was die Ergebnisse und Aussagen nicht negativ beeinflusst.

TNM	FIGO (alt)	Charakterisierung	Karzinom Häufigkeit	5-Jahres Überleben	BOT Häufigkeit	5-Jahres Überleben
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien				
1a	Ia	ein Ovar betroffen	20%	85-95%	85%	>95%
1b	Ib	beide Ovarien betroffen				
1c	Ic	Tumorzellen in Aszites				
T2	II	Tumorausbreitung im Becken				
2a	IIa	Befall von Uterus u./o. Tuben	5-10%	60-75%	5%	70-90%
2b	IIb	Befall anderer Beckenorgane				
2c	IIc	Tumorzellen in Aszites				
T3	III	Tumorausbreitung im Becken und peritoneale Metastasen über das Becken hinaus				
3a	IIIa	mikroskopischer Nachweis	50-60%	45%	5-10%	65%
3b	IIIb	max. Ausdehnung ≤ 2 cm				
3c	IIIc	max. Ausdehnung > 2 cm				
N1		retroperitoneale oder inguinale Lymphknotenmetastasen				
M1	IV	Fernmetastasen, Leberparenchyembefall	10-20%	<20%	<1%	<65%

Tabelle 1: Einteilung der Ovarialkarzinome und BOT nach TNM- und FIGO-Stadium, prozentuaem Anteil an diagnostizierten Tumoren und 5 Jahresüberlebensraten [3, 6, 7, 11, 13, 36]

1.5 Histologische Klassifizierung

Sowohl die epithelialen Ovarialkarzinome als auch die BOT wurden nach der WHO-Klassifikation aufgrund des im Tumor vorherrschenden Zelltyps in 8 histologische Subtypen unterteilt: serös, muzinös, endometrioid, plattenepithelial, klar-, transitional- und gemischtzellig sowie nicht-klassifizierbar [6, 38]. Seit 2014 gibt es auch hier eine neue Einteilung, welche die Subtypen auf *High-grade*- und *Low-grade*-serös, muzinös, seromuzinös, endometrioid, klarzellig und Brenner-Tumoren reduziert [37]. Der seröse Subtyp ist mit ca. 70% der häufigste. Beachtet man auch die gemischt-serösen Subtypen so steigt sein Prozentsatz auf 78% [13, 24, 26, 39]. Hierbei ist auffällig, dass die serösen Karzinome zu über 85% in hohen Tumorstadien (FIGO III-IV) diagnostiziert werden, ein aggressives Wachstum zeigen und früh metastasieren. Sie treten bei mehr als der Hälfte der Patientinnen beidseitig auf und besitzen insgesamt eine schlechte Prognose [12, 26, 39]. Das endometrioide Karzinom tritt in etwa 10-20% der Fälle auf [13, 24, 26, 39]. Es liegt meist als *Low-grade*- und *Low-stage*-Karzinom mit besserer Prognose als die serösen Karzinome vor [12, 26, 40, 41].

1.6 Histologischer Malignitätsgrad

Seit 1998 werden die epithelialen Ovarialkarzinome auf Grund des Wachstumsmusters, der Kernpolymorphie sowie der mitotischen Aktivität in verschiedene Gruppen von G1 (hochdifferenzierte Tumoren) über G2 (mäßig differenzierte Tumoren) bis G3 (gering differenzierte Tumoren) eingeteilt [42]. Künftig wird die Einteilung aber in *Low-grade*- und *High-grade*-Karzinome vorgenommen [43].

1.7 Pathologische Besonderheiten der Borderline-Tumoren des Ovars

BOT nehmen eine Sonderstellung ein, da sie als niedrigmaligne Tumoren zwischen den benignen Neoplasien und den malignen Karzinomen stehen [7, 12]. Sie zeigen wie die Karzinome eine vermehrte atypische Proliferation des Epithels mit Mehrreihigkeit, Papillenbildung, Kernatypien und einer erhöhten Mitoseaktivität, jedoch ohne destruierende Stromainfiltration [7, 13, 44]. Eine Mikroinvasion bis zu 3 mm in das Stroma ist für die Diagnosestellung auf Grund der dadurch unveränderten Prognose zulässig [45, 46]. Insgesamt stellen sie prä maligne Läsionen dar, welche sich zu hochdifferenzierten *Low-grade*-Karzinomen entwickeln können [47]. Der häufigste histologische Typ ist der seröse (47-90%), gefolgt von dem muzinösen (5-39%) und dem endometrioiden (2-7%) [4, 7, 9, 11, 48, 49].

Seit 1971 sind sie von der FIGO anerkannt und seit 1973 in der WHO-Klassifikation enthalten, so dass die Stadieneinteilung wie bei dem Ovarialkarzinom erfolgt [34-36, 50, 51].

1.8 Klinische Symptomatik und Diagnostik

Das Ovarialkarzinom fällt nicht durch spezifische Frühsymptome auf, so dass bei einem Drittel der Patientinnen zwischen dem Auftreten der ersten Beschwerden und der endgültigen Diagnose mehr als 6 Monate vergehen [1, 7, 52, 53]. Mögliche Symptome sind abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust, Obstipation, Übelkeit, Zunahme des Bauchumfanges sowie Veränderungen im Menstruationszyklus oder postmenopausale Blutungen [7, 26, 52, 53].

Bis heute gibt es keine etablierte Screeningmethode, die über eine ausreichende Sensitivität und Spezifität verfügt und zur generellen Vorsorge empfohlen wird [7, 54-56]. In der klinischen Anwendung empfiehlt die AGO-OVAR daher den transvaginalen Ultraschall zur diagnostischen Abklärung suspekter rektovaginaler Tastbefunde. Die Diagnosesicherung und die genaue Stadieneinteilung erfolgt anschließend chirurgisch durch eine Staging-Operation mit sicherer histologischer Klassifizierung des Tumors [6, 7, 55, 57].

1.9 Therapie des Ovarialkarzinoms und der Borderline-Tumoren

An erster Stelle steht für das invasive Karzinom die möglichst komplette chirurgische Tumorentfernung mit sich anschließender Chemotherapie [7, 55, 58, 59]. Die AGO-OVAR empfiehlt nach erfolgter Tumorentfernung oder weitestgehender Verminderung der Tumorlast die Durchführung einer sechs Zyklen umfassenden platinhaltigen Chemotherapie [57]. Lediglich bei Patientinnen mit hochdifferenzierten Karzinomen der Gruppe FIGO Ia kann auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet werden [55, 57]. Mit der Kombinationstherapie aus Operation und Chemotherapie wird zwar bei der Mehrzahl der Patientinnen eine vorübergehende klinische Tumorfreiheit erreicht. Die Rezidivrate ist jedoch bei den fortgeschrittenen FIGO-Stadien sehr hoch [13, 60]. Bei der Therapie des Rezidivs wird unterschieden zwischen platinsensibel und -refraktär: Platinsensible Rezidive treten frühestens 6 Monate nach Abschluss einer platinhaltigen Chemotherapie auf und können erneut mit einer platinhaltigen Kombination therapiert werden. Beim auf Platinderivate refraktären Karzinom werden Doxorubicin, Gemcitabin oder Topotecan verwendet [7, 13, 57].

Analog dazu ist für die Therapie der BOT ebenfalls ein operatives Staging und eine stadienadaptierte chirurgische Therapie erforderlich [55, 57]. Eine adjuvante Chemotherapie wird nicht empfohlen [7, 57]. Da sie jedoch in bestimmten Studien bei invasiven Implantaten

zu einer Prognoseverbesserung geführt hat, wird sie in der Literatur zur Zeit diskutiert [5-7, 11, 44, 49, 61, 62].

1.10 Klinisch etablierte Prognosefaktoren

Zu den etablierten Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom gehören das Tumorstadium nach FIGO, der postoperative Tumorrest, der Lymphknotenstatus und Aszites. Des Weiteren beeinflussen das Alter der Patientin und ihr Allgemeinzustand die Prognose [57, 63-66]. Betrachtet man nur die frühen Stadien FIGO I-II, kann auch der Histologie und dem Grading eine prognostische Aussage beigemessen werden [66, 67]. Ein undifferenzierter G3-Tumor ist dabei mit zwar mit einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert als ein gut differenzierter G1-Tumor, spricht jedoch besser auf Chemotherapie an [27, 29, 30]. Ebenso scheint eine klarzellige oder muzinöse Histologie nachteilig zu sein, da diese schlechter auf bestehende Chemotherapien anspricht [7, 24, 60, 66]. Der bedeutendste Faktor in den fortgeschrittenen FIGO-Stadien III-IV ist der postoperativ verbliebene Tumorrest [58, 68]. In Studien konnte gezeigt werden, dass ein Resttumor kleiner 1 cm einen Überlebensvorteil gegenüber einem Resttumor größer 1 cm darstellt. Der deutlichste Überlebensvorteil lag jedoch bei Patientinnen, welche postoperativ makroskopisch tumorfrei waren [7, 59, 65, 69].

Die Prognose bei Patientinnen mit BOT wird vor allem durch das Vorliegen extraovarieller Implantate bestimmt. Diese lassen die sonst sehr hohe 5-Jahresüberlebensrate von 99% auf 95% bei nichtinvasiven und auf 66% bei invasiven Implantaten sinken und steigern gleichzeitig die Rezidivrate auf über 50% [7, 46, 61, 62].

BOT	Karzinom FIGO I/II	Karzinom FIGO III/IV
<ul style="list-style-type: none"> • invasive Implantate im Peritoneum • FIGO III oder IV • Resttumor postoperativ • Alter > 65 Jahre • Aneuploidie 	<ul style="list-style-type: none"> • Grading G3 • keine adjuvante Chemotherapie • klarzellige oder muzinöse Histologie • Kapselruptur intraoperativ • Aneuploidie 	<ul style="list-style-type: none"> • Resttumor > 1cm • Alter > 65 Jahre • Aszites über 500 ml • Retroperitonealer Lymphknotenstatus positiv • adjuvante Chemotherapie ohne Platin

Tabelle 2: Zusammenfassung der negativen Prognosefaktoren der BOT und des Ovarialkarzinoms [7, 57, 70]

1.11 Neue molekularbiologische Prognosefaktoren

In der Literatur wurden in den letzten Jahren mögliche neue Prognosefaktoren diskutiert. Zu diesen zählen das *Her-2/neu*-Onkogen [71], das Tumorsuppressorgen *p53* [72, 73], die Wachstumsfaktoren *VEGF* [74, 75] und *EGFR* [76], die Tumorproteasen *PAI-1* [77] und *MMP-2/-9* [78], die Cyclooxygenase *COX-2* [79, 80], das Oberflächenantigen *CD24* [81], die

mitogen-aktivierte Proteinkinase Phosphatase-1 *MKP-1* [82], sowie Aussagen zur DNA-Ploidie [5, 7, 66]. Ihr Stellenwert in der Prognose ist oft noch nicht genau geklärt. Die einzige Ausnahme stellt im Moment die Bestimmung des etablierten *CA-125* Wertes zur Therapieerfolgs- und Rezidivkontrolle dar [6, 7, 83]. Man hofft jedoch, dass diese neuen Faktoren darüber Auskunft geben können, wie sich ein Tumor in Bezug auf Wachstum und Aggressivität verhält. Sie könnten somit in der Zukunft eventuell zur Voraussage des individuellen Krankheitsverlaufes und zur Therapieplanung genutzt werden und bei *Low-grade*-Tumoren zum Verzicht auf unnötige -die Patientin belastende- Chemotherapien führen.

1.12 Hintergrund der vorliegenden Arbeit

Die Arbeitsgruppe um Meinhold-Heerlein hat 2005 die Genexpression im Ovarialkarzinom untersucht. Bei dieser Untersuchung ließen sich einerseits unterschiedliche Expressionsmuster zwischen Normal- und Karzinomgewebe finden, andererseits zeigten sich unterschiedliche Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Gradingstufen: Die niedrigmalignen BOT verhielten sich in Bezug auf die Genexpression wie hochdifferenzierte G1-Tumoren, wohingegen sich die mäßig differenzierten G2-Tumoren wie die gering differenzierten G3-Tumoren verhielten. Diese Unterschiede waren auch in Bezug auf Tumorprogression, Therapieansprechen und Überleben zu finden [29]. Eine immunhistochemische Bestätigung, ob die hochregulierten Gene auch auf Proteinebene exprimiert werden ist Gegenstand dieser Dissertation. Von besonderem Interesse waren dabei die folgenden Gene bzw. Genprodukte: *Cyclin B1* und *CDC2* in Verbindung mit dem Zellzyklus, *Ki-67* und *Topoisomerase II-alpha (TOP2A)* als Marker der Zellproliferation, das Onkogen *UBE2C* sowie das ubiquitäre Enzym *Fatty Acid Synthase (FASN)*. Bei diesen sechs Kandidaten stellte sich insbesondere die Frage, ob und in welchem Umfang sie auf Proteinebene exprimiert werden und ob sie die *Low-* von den *High-grade*-Tumoren trennen können. Des Weiteren sollte die Frage beantwortet werden, ob sich speziell *FASN*, *CDC2* und *TOP2A* als mögliche therapeutische Targets eignen könnten.

1.12.1 Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C

Das *UBE2C*-Gen liegt auf Chromosom 20 und kodiert für das 20 kDa schwere Protein „*Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C*“, welches zum Ubiquitin-System gehört [84]. Ubiquitin kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und kann reversibel an Proteine gebunden werden, um so deren Funktion oder Verteilung innerhalb der Zelle zu verändern. Der Prozess der Ubiquitinierung erfolgt dabei mit Hilfe spezieller Enzyme. In der Folge können die markierten

Proteine gezielt abgebaut werden oder Funktionen im Zellzyklus und bei der Signaltransduktion übernehmen, um die normale Zellfunktion zu gewährleisten [85, 86]. Im Zellzyklus wird speziell der Übergang der Meta- zur Anaphase und die zeitgerechte Trennung der Schwesterchromatiden durch *UBE2C* kontrolliert und so eine geregelte Progression sichergestellt [87, 88]. *UBE2C* ist in den meisten Normalgeweben in physiologischen Konzentration nachweisbar, vor allem im Knochenmark, dem Gastrointestinaltrakt, den Nieren und den Nebennieren [84, 89]. Es wird jedoch in deutlich erhöhten Konzentrationen in malignen Tumoren von Lunge, Mamma, Kolon, Magen, Uterus, Zervix und Ovar gefunden [84, 87, 89-91]. Exprimiert wird es hauptsächlich im Nukleus, in geringem Umfang jedoch auch zytoplasmatisch [84, 87]. Eine erhöhte Expression von *UBE2C* scheint mit dem Auftreten von *High-grade*-Karzinomen, einem aggressiven Tumorwachstum und einer schlechten Prognose assoziiert zu sein. Besonders im undifferenzierten Ovarial-CA konnte eine hohe Konzentration nachgewiesen werden [87, 89]. Eine starke Expression im Mamma-CA ist mit einer ebenfalls hohen Expression von *Ki-67* in diesen Geweben verbunden und zeigt so die generell erhöhte Proliferationsrate an [92]. Insgesamt scheint eine hohe *UBE2C*-Genaktivität somit mit einer hohen Zellproliferation sowie einem erhöhten onkogenen Potential durch Aneuploidie und Chromosomeninstabilität einherzugehen [86].

1.12.2 Topoisomerase II-alpha

Das *TOP2A*-Gen liegt auf Chromosom 17 in direkter Nachbarschaft zu dem *HER-2/neu* Onkogen und kodiert für das 170 kDa schwere Protein „*Topoisomerase II-alpha*“ [84]. Im menschlichen Organismus ist *TOP2A* in der Lage Doppelstrangbrüche in der DNA zu setzen, diese umzulagern und wieder miteinander zu verbinden. Sie ist dadurch für die Kontrolle der DNA während der Transkription und Replikation verantwortlich. Zusätzlich besitzt sie Reparaturfunktionen, um verdrehte Bereiche zu lösen und die korrekte Anordnung der DNA zu sichern [84, 93, 94]. *TOP2A* wird vor allem im Nukleus exprimiert und steigt vom Beginn des Zellzyklus bis zum Eintritt in die Mitose stark an. Sie ist nicht oder nur in geringen Mengen nachweisbar in differenzierten Zellen, welche sich in der G0-Ruhephase befinden und wird vor allem in proliferierenden Zellen von Knochenmark, Lymphknoten- und Tonsillengewebe, Magen, Duodenum sowie im Hoden gefunden [84, 93]. Maligne Tumoren der Mamma, des Kolons, der Lunge, der Blase, des Hodens, der Zervix und des Ovars sowie Glioblastomen und Lymphomen exprimieren *TOP2A* in erhöhtem Umfang. Studien zufolge geht eine starke *TOP2A*-Expression dabei oft mit einem höheren Grading, einer größeren Tumormasse, positivem Nodalstatus und Fernmetastasen bei Diagnosestellung einher [84, 93,

95-97]. Im Ovar konnte vor allem in *High-grade*- und *High-stage*-Karzinomen eine erhöhte Expression, in Zusammenhang mit einem verkürzten Gesamtüberleben, nachgewiesen werden [98-100]. In der Medizin sind Topoisomerasen ein wichtiger Angriffspunkt für Chemotherapeutika [93]. In neueren Studien wird untersucht inwieweit *TOP2A* als Marker für ein positives Ansprechen auf Chemotherapie, eine mögliche Resistenz gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika oder als Prädiktor für das Gesamtüberleben genutzt werden kann [98, 100]. Maligne Tumoren mit einer starken *TOP2A*-Expression könnten somit gezielt von einer Chemotherapie mit Topoisomerasehemmern wie Etoposid oder Topotecan profitieren, auch wenn das Ansprechen aller Ovarialkarzinome zusammen genommen nur bei ca. 15% liegt, sofern diese Medikamente in der Rezidivtherapie angewendet werden [93, 99].

1.12.3 Fatty Acid Synthase

Das *FASN*-Gen liegt auf dem Chromosom 17 und kodiert für das 273 kDa schwere multifunktionale Enzym „*Fatty Acid Synthase*“ [84]. Im Organismus ist diese Synthase für die endogene de novo Synthese von Fettsäuren aus Glukose zuständig, welche dann zur Energiegewinnung und Produktion von Zell- und Membranstrukturen sowie Hormonen benötigt werden [84, 101]. *FASN* scheint als Protoonkogen eine Rolle bei der Tumorgenese und beim Überleben von malignen Zellen zu spielen. Der Mechanismus ist hierbei noch ungeklärt, es wird jedoch eine Wechselwirkung mit anderen Proteinkinasen (*PI3K/AKT*) und dem Hormonrezeptor *Her-2/neu* vermutet [102]. Viele Normalgewebe zeigen eine mäßige *FASN*-Expression, darunter vor allem die hormonsensitiven Zellen der Plazenta, der Nebenniere und -schilddrüse, aber auch Zellen des zentralen Nervensystems, des Gastrointestinaltraktes, der Leber und der Lunge mit einem hohen Lipidmetabolismus. *FASN* wird dabei vor allem zytoplasmatisch exprimiert [84, 103]. In vielen Tumorgeweben kann eine stark erhöhte Expression von *FASN* nachgewiesen werden. Am deutlichsten tritt diese bei den Karzinomen der Prostata gefolgt von Mamma, Kolon, Leber, Blase und Ovar in Erscheinung [84, 104-108]. Eine hohe Expression ist in Karzinomen der Mamma und Prostata mit einer geringen Differenzierung, einer hohen Rezidivhäufigkeit und einer insgesamt schlechten Prognose assoziiert [105, 106, 109]. Es zeigte sich zusätzlich, dass eine hohe *FASN*-Expression im Mamma-CA mit Resistenzen gegen das Chemotherapeutikum Paclitaxel einherging und so zur Prognoseverschlechterung beitrug [110]. Ovarialkarzinome zeigen ebenfalls häufig eine hohe *FASN*-Expression, welche mit einer schlechten Gesamtprognose verbunden ist. BOT, ovarielle Adenome und das normale Ovariepithel zeigen hingegen eine geringe oder negative Expression [84, 104, 111]. Ein möglicher Therapieansatz bei malignen

Tumoren könnte daher in Zukunft die Inhibition der Fettsäure-Synthase darstellen. In mehreren Studien wurde bereits, bei Aktivitätshemmung der Synthase, ein selektiver zytotoxischer Effekt auf menschliche Krebszellen nachgewiesen und Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen diese Effekte auch für Ovarialkarzinomzelllinien [102, 112-116].

1.12.4 Cyclin B1

Das *CCNB1*-Gen liegt auf dem Chromosom 5 und kodiert für das 48 kDA schwere Protein „*Cyclin B1*“, welches als Regulatorprotein der Mitose im Zellzyklus fungiert und so an der korrekten Weitergabe des Erbgutes beteiligt ist [84]. *Cyclin B1* bildet dabei mit der cyclinabhängigen Kinase *CDC2* den *Maturation Promoting Factor (MPF)* und kontrolliert den Eintritt der Zelle in die M-Phase am G2/M-Kontrollpunkt [84, 117, 118]. Zu diesem Zweck ist der aktive *MPF* an der Chromosomenkondensation sowie der zeitgerechten Auflösung der Kernmembran und der Ausbildung des Spindelapparates beteiligt [119, 120]. Die meisten Normalgewebe zeigen eine negative bis mittlere *Cyclin B1*-Expression, unter diesen vor allem proliferierenden Zellen des Knochenmarks, des Hodens sowie des Lymph- und Tonsillengewebes [84]. Exprimiert wird es dabei in Abhängigkeit von der aktuellen Zellzyklusphase sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch [84, 121, 122]. In Karzinomen von Kolon, Mamma, Bronchien, Endometrium, Magen, Hoden und Ovar sowie in Melanomen und Lymphomen ist die Expression deutlich erhöht [84, 121, 123-125]. Diese ist dabei im Bronchial-CA, jedoch nicht im Ovar-CA mit einem verkürzten Gesamtüberleben und im Mamma-CA mit einer schlechten Prognose verbunden [124, 126, 127]. Es wird diskutiert, dass durch eine verminderte Expression von *Cyclin B1* innerhalb der Zelle der Eintritt in die G2/M-Phase verhindert werden könnte [128]. In neueren Studien ergaben sich außerdem Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen *UBE2C* und *Cyclin B1*: Eine starke *UBE2C*-Expression soll zu einer verringerten *Cyclin B1*-Stabilität in der frühen Mitose führen [86].

1.12.5 Cyclin-dependent Kinase 1

Das *CDKI/CDC2*-Gen liegt auf dem Chromosom 10 und kodiert für das 34 kDA schwere Protein „*Cyclin-dependent Kinase 1*“ [84]. Dieses dient im Zellzyklus zusammen mit *Cyclin B1* als katalytische Untereinheit des *MPF*. Die in der Zelle frei vorliegende, ungebundene Kinase ist durch niedrige *Cyclin B1*-Konzentrationen und der zeitgleichen Anwesenheit von Kinase-Inhibitoren inaktiv. Ihre Aktivierung erfolgt durch den Konzentrationsanstieg und die Bindung des Cyclins als auch durch die abnehmende Wirkung der Kinase-Inhibitoren [84, 129-132]. *CDC2* ist negativ in vielen Normalgeweben, zeigt jedoch eine mäßige bis starke

Expression in proliferierenden Zellen des Knochenmarks, Gastrointestinaltraktes, Lymph- und Tonsillengewebes sowie im Hoden und der Plazenta. Exprimiert wird es dabei wie *Cyclin B1* sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär [84]. *CDC2* wird als Indikator der Zellproliferation angesehen, da es in Tumorgeweben deutlich stärker exprimiert wird als in den dazugehörigen Normalgeweben [133]. Es zeigen vor allem *High-grade*-Karzinome von Mamma, Kolon, Magen, Endometrium, Hoden, Blase sowie Lymphome eine starke Expression [84, 121, 125, 133-135]. Im Endometrium-CA ist eine starke Expression dabei mit Lymphknotenmetastasen assoziiert [135]. *CDC2* ist im normalen Ovariepithel nur in geringen Konzentrationen nachweisbar, zeigt jedoch eine mittlere bis hohe Expression im Ovarial-CA [84, 136]. Selektive *CDC2*-Kinaseinhibitoren könnten in der Zukunft eventuell als Angriffspunkte gegen maligne Neoplasien genutzt werden [137, 138]. Eine Studie zeigte hierzu eine verstärkte antiproliferative Wirkung des Chemotherapeutikums Paclitaxel in Kombination mit Dasatinib in menschlichen Ovarialkarzinomzelllinien durch Suppression der *CDC2*-Expression [139].

1.12.6 Antigen Ki-67

Das *MKI67*-Gen liegt auf dem Chromosom 10 und kodiert für das 359 kDa schwere Protein „Antigen *Ki-67*“, welches mit der Zellproliferation assoziiert ist [84]. *Ki-67* wird vor allem nukleär exprimiert und ist lediglich in proliferierenden Zellen während der Zellteilung, nicht aber in ruhenden Zellen nachweisbar [140]. Es dient als Proliferationsmarker und wird allgemein als Proliferationsindex aus *Ki-67* positiven Zellen in 100 Tumorzellen angegeben [141]. *MIB-1* ist dabei der seit 1993 meistgenutzte Antikörper gegen das *Ki-67*-Antigen und auch bei in Paraffin eingebetteten Geweben anwendbar [142]. Ein hoher *MIB-1*-Index zeigt dabei ein schnelles Zell- bzw. Gewebewachstum an [141]. Die meisten Normalgewebe zeigen eine schwache bis mäßige *Ki-67*-Expression. Einige hochproliferative Gewebe, wie das Knochenmark, die Lymphknoten-, Tonsillen, sowie die Drüsengewebe von Rektum und Duodenum und das Epithel der Vagina zeigen auch physiologisch eine erhöhte Expression [84]. In malignen Tumoren von Urothel, Kolon, Magen, Pankreas und Mamma sowie bei malignen Tumoren des weiblichen Reproduktionstraktes und Lymphomen ist die *Ki-67*-Expression dagegen häufig deutlich erhöht [84, 143-147]. Eine hohe Expression scheint im Urothel-, Bronchial- und Ovarial-CA mit dem häufigeren Auftreten von Rezidiven und einem verringerten Gesamtüberleben assoziiert zu sein [143, 144, 148]. Im Ovarialkarzinom ist *Ki-67* vor allem in hohen FIGO-Stadien und in *High-grade*-Tumoren erhöht. Somit könnte *Ki-67* neben der rein morphologischen Betrachtung ein wichtiger Parameter bei der Unterscheidung von *Low-grade*- und *High-grade*-Karzinomen sein [143].

1.13 Fragestellung dieser Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollte die Expression der Kandidatengene *UBE2C*, *TOP2A*, *FASN*, *CCNB1*, *CDC2* und *MKI67* im Normal- und Karzinomgewebe des Ovars sowie den niedrigmalignen BOT immunhistochemisch untersucht werden. Ziel dieser Arbeit sollte dabei die Validierung neuer, prognostisch relevanter, molekularer Proteinmarker sein. In vorangehenden Studien wurden dazu potentielle Gene identifiziert, die im geringgradig differenzierten Tumor hoch und im hochgradig differenzierten Tumor sowie BOT nur gering exprimiert waren [29]. Diese sollten jetzt an einem unabhängigen Kollektiv validiert werden, um herauszufinden, ob die auf RNA-Ebene gezeigte Überexpression der genannten Kandidatengene auch eine Entsprechung auf Proteinebene hat und ob sie sich ggf. als therapeutische Targets beim *High-grade*-Ovarialkarzinom eignen können.

Für die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen wurden zunächst 10 neue Gewebe-Mikroarrays mit Ovarialkarzinomen, BOT sowie benignen Tumoren in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des UK-SH, Campus Kiel hergestellt. Danach wurden im Onkologischen Labor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am UK-SH, Campus Kiel die Serienfärbungen an den Arrays durchgeführt. In der anschließenden Auswertung wurde der Schwerpunkt auf folgende Fragestellungen gelegt:

1. Wie werden die Marker in den drei untersuchten Geweben auf Proteinebene exprimiert?
2. Welche Korrelationen ergeben sich zwischen den einzelnen Markern in Bezug auf die Proteinexpression?
3. Ist der Expressionsunterschied „benigner Tumor versus BOT versus Ovarial-CA“ sowie „G1 versus G2 versus G3“ für jeden untersuchten Marker statistisch signifikant?
4. Wie ist die statistische Signifikanz bei solitärer Bestimmung jedes einzelnen Markers und bei Kombinationsbestimmung der Marker, um die Gruppe *Low-grade* (BOT/G1) von der Gruppe *High-grade* (G2/G3) unterscheiden zu können?

2 Material und Methoden

2.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

In der vorliegenden Arbeit wurden in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 179 Patientinnen untersucht, bei denen in den Jahren 1997 bis 2007 ein Ovarialtumor diagnostiziert wurde. Bei diesen Tumoren handelt es sich in 139 Fällen um Ovarialkarzinome und in 20 Fällen um niedrigmaligne BOT. Als Kontrollgruppe dienten 20 Fälle mit einem benignen Tumor oder ohne histologische Auffälligkeiten.

Die Diagnostik, Operation und Nachbehandlung der Patientinnen erfolgte in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am UK-SH, Campus Kiel und den assoziierten peripheren Krankenhäusern in Schleswig-Holstein. Bei allen untersuchten Geweben wurden die histologische Typeinteilung, die Bestimmung von FIGO-Stadium und Grading, die Paraffineinbettung und die Einlagerung von repräsentativen Tumoranteilen zur wissenschaftlichen Nutzung im Institut für Pathologie des UK-SH, Campus Kiel, vorgenommen. Von den untersuchten Gewebeproben wurden 159 direkt am UK-SH operiert und 20 wurden von peripheren Kliniken in Schleswig-Holstein eingesandt. Die Krankengeschichten sowie die erhobenen retrospektiven klinischen Daten entstammen den Krankenakten. Für die Ovarialkarzinom- und die BOT-Patientinnen konnten das rezidivfreie und das Gesamtüberleben mit Hilfe der Befundeingänge des Pathologischen Institutes sowie des Tumorregisters Schleswig-Holstein ermittelt werden. Die Nachbeobachtungszeit war dabei individuell verschieden, eine letzte Aktualisierung der Überlebensdaten erfolgte im Mai 2010. Für die auswärtig operierten Patientinnen fehlen zum Teil die klinischen Daten, da die Nachbehandlung von der einsendenden Klinik übernommen wurde und nicht lückenlos recherchierbar war. Alle personenbezogenen Daten wurden nach Datenschutzrichtlinien behandelt und es lagen die Zustimmungen der Patientinnen zur wissenschaftlichen Nutzung vor.

2.2 Herstellung der Tissue-Microarrays

Der erste Arbeitsschritt für die vorliegende Arbeit war die Erstellung eines geeigneten Ovarialkarzinom-Kollektivs an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am UK-SH, Campus Kiel und die zeitgleiche Herstellung von neuen Tissue-Microarray-Blöcken (TMA). Insgesamt wurden 10 TMA angefertigt, die Material von insgesamt 179 Patientinnen enthalten: Jeweils 1 Block mit benignen Tumoren sowie BOT, 2 Blöcke mit endometrioiden

Tumoren und 6 Blöcke mit rein serösen oder gemischt-serösen Ovarialkarzinomen. Die zur Herstellung verwendeten Paraffingewebeblöcke und Hämatoxylin-Eosin-Gewebeschnitte (HE) mit Patientenmaterial wurden aus dem Bestand des Institutes für Pathologie am UK-SH, Campus Kiel entnommen. Pro Patientin standen dabei, je nach Umfang der erfolgten Operation, bis zu 18 Gewebeblöcke mit formalinfixiertem und eingebettetem Tumormaterial sowie die dazugehörigen HE-Gewebeschnitte zur Verfügung. Für die Anfertigung der neuen TMA wurden jeweils bis zu drei repräsentative Gewebeblöcke als Donorblöcke mit den dazugehörigen HE-Schnitten ausgewählt. Die HE-Schnitte wurden unter dem Mikroskop durchgemustert und tumortragende Gewebeanteile mittels eines feinen Markierstiftes auf dem Objektträger gekennzeichnet. Zu jeder Patientin wurden drei Tumorstanzen und eine Stromastanze mit einem Durchmesser von einem Millimeter per Hohnadel aus den jeweiligen Donorblöcken entnommen. Die entnommenen Gewebestanden wurden anschließend im Abstand von 1 mm in den Akzeptorblock (zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie UK-SH, Campus Kiel) überführt, in den zuvor 7 mm tiefe Löcher gebohrt wurden. Für die Herstellung der TMA wurde ein speziell angefertigtes Stanzgerät (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) verwendet, welches eine millimetergenaue Festlegung der Stanzen ermöglicht. Die festgelegte Anzahl von drei Tumorstanzen pro Patientin sollte dabei ausreichend sein, um die physiologische Heterogenität des Tumorgewebes kompensieren zu können [149]. Auf jedem Block befinden sich zur besseren Übersichtlichkeit und einfacheren Auswertbarkeit maximal 80 Gewebestanden sowie zur besseren Orientierung im x/y-Koordinatensystem zwei, an definierten Lokalisationen, eingebrachte Tonsillengewebe. Die hergestellten TMA wurden nach ihrer Fertigstellung zum besseren Materialverbund bei 37°C im Wärmeschrank für mindestens 24 Stunden inkubiert.



Abb. 1: Fertiger TMA-Akzeptorblock Nr. 8

2.3 Labormaterialien

2.3.1 Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterialien

Computer Dell Modell DCMF	Dell, Inc., Austin, TX, USA
Erlenmeyerkolben	DURAN Produktions GmbH & Co. KG, Mainz
Handzähler Manual counter EE 53.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kamera Canon EOS Rebel XSi	Canon U.S.A., Inc., Lake Success, NY, USA
Laborwage BL610	Sartorius AG, Göttingen
Latex-Handschuhe	Ansell GmbH, München
Magnetrührer VMS-A	VWR International GmbH, Bruchsal
Messzylinder	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim
Microtome Blades Type S35	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Mikrowellengeschirr	VWR International GmbH, Bruchsal
Mikroskop Zeiss Axioskop 2	Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA
Mikroskoadapter T2-T2 1,6x SLR	Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA
Objektträger Thermo Scientific Super Frost Parafilm®	Menzel GmbH, Braunschweig
pH-Meter Modell 765	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago, IL, USA
Pinsel DaVinci 3 (Mikrotomgebrauch)	Knick, Nürnberg
Pipetten Research® (10, 100, 1000µl)	Hugo Hamann GmbH & Co. KG, Kiel
Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Rührspatel	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht
Trichter	Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht
Vortex-Genie®1	VWR International GmbH, Bruchsal
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5412R	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
	Eppendorf AG, Hamburg

2.3.2 Chemikalien

EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	E-5134, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HCL 25% (Salzsäure)	1003161000, Merck KGaA, Darmstadt
NAOH (Natronlauge)	1091371000, Merck KGaA, Darmstadt
NACL (Natriumchlorid)	WAL41402 1000, Walter-CMP GmbH & Co KG, Kiel
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	1002440500, Merck KGaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	1083820500, Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	1002440500, Merck KGaA, Darmstadt

2.3.3 Rezepte für Pufferlösungen

Waschpuffer	TBS-Puffer pH 7,4	1M Trisaminomethan: 12,0g
		NACL: 83,6g 25% HCL: 11ml ad 10l Aqua dest.
Antigen-Retrival	Citrat-Puffer pH 6,0	Citronensäure: 4,2g
		NAOH: 48ml ad 1000ml Aqua dest.
	TEC-Stammlösung pH 7,8	1M Tri-Natriumcitrat: 3,2g 1M EDTA: 5,0g 1M Trisaminomethan: 2,5g ad 1000ml Aqua dest.

2.4 Immunhistochemischer Färbeablauf

Immunhistochemische Färbungen beruhen auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion durch die Bindung eines primären Antikörpers an das für ihn spezifische Antigen. An den primären Antikörper können in einem weiteren Schritt sekundäre Antikörper binden, welche vorher an ein Enzym gekoppelt wurden. Durch die Enzymkoppelung können die Antigen-Antikörper-Komplexe, in einem dritten Entwicklungsschritt, durch eine Farbumschlagsreaktion unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden [150].

In dieser Arbeit wurden zwei Detektionsmethoden eingesetzt: Die indirekte Streptavidin-Biotin-Methode mit Hilfe des ZytoChem-Plus HRP-Polymer Kits (Zytomed Systems GmbH, Berlin) und die EnVision™ Methode mit Hilfe des EnVision™ Detection System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark). Beide arbeiten mit der Meerrettichperoxidase (HRP) und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und bewirken die Bildung eines braunen Endproduktes, wenn das gesuchte Antigen exprimiert wird.

2.4.1 Herstellung der Schnittpräparate und Deparaffinieren der Schnitte

Von den angefertigten TMA wurden mit einem Mikrotom (Modell 2050 Supercut, Reichert-Jung, Nussloch) 2-3 µm dünne Schnitte erzeugt, diese im 38°C warmen Wasserbad (Kunz Instruments A/S, Kopenhagen, Dänemark) geglättet, auf beschichtete Objektträger (SuperFrost®, Menzel GmbH, Braunschweig) gezogen und für 24 Stunden im 37°C warmen Brutschrank (Modell Basic, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach) getrocknet. Die Deparaffinisierung und Rehydrierung erfolgte dann in Xylol für 2x 10 min (WAL 124015000, Walter-CMP GmbH & Co KG, Kiel) und in der absteigenden Alkoholreihe in 3x 100% Ethanol, 2x 96% Ethanol und 2x 70% Ethanol für je 5 min (verdünnt aus 100% Ethanol, 1.00983.2500, Merck KGaA, Darmstadt). Anschließend wurden die TMA 3x für jeweils 5 min mit TBS-Puffer pH 7,4 gewaschen.

2.4.2 Antigen-Demaskierung und Blockung der endogenen Peroxidase

Zur Antigen-Demaskierung wurden die TMA für *Ki-67*, *S1/S4*, *UBE2C*, *FASN* und *Cyclin B1* in Citratpuffer pH 6,0 und für *CDC2* in TEC-Puffer pH 7,8 bei 900 Watt für 20 min in der Mikrowelle (Modell R-332, Sharp Electronics GmbH, Hamburg) erhitzt. Im Anschluss erfolgte die Abkühlung bei Raumtemperatur für 20 min und danach unter fließendem Leitungswasser für 5 min. Anschließend wurden die TMA 3x für jeweils 5 min mit TBS-Puffer pH 7,4 gewaschen. Die endogene Peroxidase wurde danach bei *CDC2* für 30 min mit DAKO® Cytomation Endogene Peroxidase Blocking Reagent (Nr. S2001, Dako Denmark

A/S, Glostrup, Dänemark) und bei *Ki-67*, *TOP2A (S1/S4)*, *UBE2C*, *FASN* und *Cyclin B1* für 20 min mit 3% H₂O₂ Lösung (verdünnt in Aqua dest. aus 30% H₂O₂, Nr.822287, Merck-Schuchardt OHG, Hohebrunn) geblockt. Anschließend wurden die TMA 3x für jeweils 5 min mit TBS-Puffer pH 7,4 gewaschen.

2.4.3 Background Block, primärer Antikörper und PostBlock-Reagenz

Zur Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung wurde bei *Ki-67* und *UBE2C* ein Background-Block mit Goat-Normalserum (Nr. X0907, Dako Denmark A/S, Kopenhagen, Dänemark) 1:10 in 1x PBS (verdünnt in Aqua dest. aus 10x Phosphate Buffered Saline (PBS), Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe) für 20 min und bei *CDC2* mit DAKO® Blocking Solution ready-to-use (Nr. X0909, Dako Denmark A/S, Kopenhagen, Dänemark) für 5 min durchgeführt. Diese Lösungen wurden nach dem Einwirken abgekippt und es wurden jeweils 125 µl der primären Antikörperlösung (siehe Tabelle 3) verdünnt in 1x PBS aufgetragen. Die Inkubation erfolgte dabei generell in einer feuchten Kammer (Eigenkonstruktion aus Petrischale, Zellstoff und Glasplatte) mit Inkubationszeiten von 30 min bis zu 12 Stunden entweder bei 21° C oder bei 4°C im Kühlschrank (Kühl- und Eisschrank, Liebherr GmbH, Ochsenhausen). Bei *CDC2* wurden die TMA nach der Inkubation mit dem primären Antikörper 3x für jeweils 5 min mit TBS-Puffer pH 7,4 gewaschen und es erfolgte eine zusätzliche Behandlung mit PostBlock-Reagenz ready-to-use (ZytoChem-Plus HRP-Polymer-Kit, Zytomed Systems GmbH, Berlin) für 20 min zur Signalverstärkung. Anschließend wurden alle TMA 3x für jeweils 5 min mit TBS-Puffer pH 7,4 gewaschen.

2.4.4 Primäre Antikörper im Detail

Folgende primäre Antikörper wurden in entsprechender Verdünnung verwendet:

Antikörper	Klon	Spezies	Hersteller	Verdünnung	Zeit	Temp.
<i>Ki-67 (MKI67/MIB-1)</i>	Ki-67	mouse	Institut für Pathologie UK-SH, Kiel	Unverdünnt	30 min	21°C
<i>Cyclin Dependent Kinase 1 (CDC2/CDK1)</i>	monoclonal YE324	rabbit	Epitomics, Inc., Burlingame, CA, USA	1:50	12 h	4°C
<i>Cyclin B1(CCNB1)</i>	monoclonal V152	mouse	Novus Biologicals LLC, Littleton, CO, USA	1:100	30 min	21°C
<i>Topoisomerase II-alpha (TOP2A/S1/S4)</i>	Ki-S1 Ki-S4	mouse	Institut für Pathologie UK-SH, Kiel	1:4000 1:500	30 min	21°C
<i>Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C (UBE2C)</i>	monoclonal JgG29	mouse	GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA	1:100	45 min	21°C
<i>Fatty Acid Synthase (FASN/CYPL1)</i>	monoclonal 3F2-1F3	mouse	Abnova GmbH, Heidelberg	1:20	12 h	4°C

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten primären Antikörper mit Angaben zum Hersteller und zur Inkubation

2.4.5 Sekundärer Antikörper und Farbentwicklung

Die Zugabe des Enzym-Polymer- oder Biotin-konjugierten sekundären Antikörpers (sek. Goat-AK aus dem EnVision™ Detection System, Dako Denmark A/S, Kopenhagen, Dänemark bei *Ki-67*, *S1/S4*, *UBE2C*, *FASN* und *Cyclin B1* oder HRP-Polymer aus dem ZytoChem-Plus HRP-Polymer Kit, Zytomed Systems GmbH, Berlin bei *CDC2*) erfolgte ebenfalls in einer feuchten Kammer, jedoch bei Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wurden die TMA 3x für jeweils 5 min mit TBS-Puffer pH 7,4 gewaschen und es erfolgte dann die Farbentwicklung nach Sicht mit 3'3-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 1:50 in DAB Chromogen Solution (beide Lösungen aus dem EnVision™ Detection System, Dako Denmark A/S, Kopenhagen, Dänemark), welches 20 min vor Benutzung frisch angesetzt wurde. Beendet wurde die Farbentwicklung mit Aqua dest. (Elix® Essential 5, Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus). Anschließend wurden die TMA 3x für jeweils 5 min mit Aqua dest. gewaschen.

2.4.6 Gegenfärbung und Eindecken

Die TMA wurden für 5 min mit Hämalan (Hämalan sauer nach Mayer, Nr. T865.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gegengefärbt und unter fließendem Leitungswasser für 30 min nachgebläut. Vor dem Eindecken mit Medium (CV Mount 14046430011, Leica Microsystems, Nussloch) und Deckgläsern (Deckgläser Größe 24x 50-60mm, Menzel GmbH, Braunschweig) erfolgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und dem Xylolbad. Vor der Auswertung härteten die Präparate bis zum nächsten Tag unter dem Abzug (Köttermann GmbH & Co KG, Uetze-Hänigsen) aus.

2.4.7 Positiv- und Negativkontrollen der Serienfärbungen

Bei jeder Serienfärbung wurde zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse ein TMA in doppelter Ausführung als Negativkontrolle gefärbt, bei welchem der primäre AK durch PBS ersetzt wurde. Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse wurde bei jeder Serienfärbung eine Positivkontrolle durchgeführt. Dazu dienten die auf den TMA zur Positionsfestlegung im x/y-Koordinatensystem enthaltenen Tonsillenstanzen, bei denen sicher von einer Expression des jeweiligen Antigens und somit eines positiven Färbeergebnisses auszugehen war. Die verwendeten Tonsillen wurden freundlicherweise von dem Lymphnotenregister des UK-SH, Campus Kiel zur Verfügung gestellt. Um ein möglichst genaues Ergebnis zu erzielen wurden alle TMA zu einem Antikörper, mit Positiv- und Negativkontrollen, in kompletten Serien gefärbt.

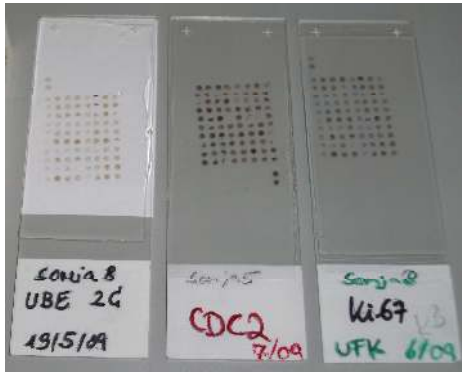


Abb. 2: UBE2C, CDC2 und Ki-67 als Beispiel für gefärbte TMA mit den enthaltenen Positivkontrollen

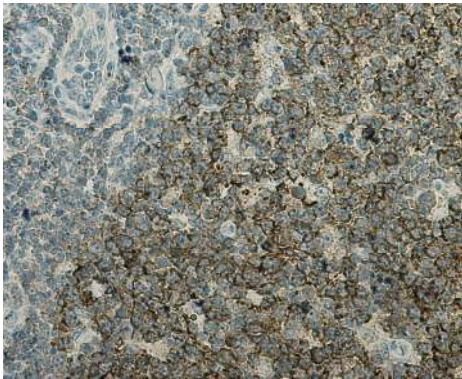


Abb. 3: Tonsille als Positivkontrolle, Färbung für Cyclin B1, 400-fach (20x)

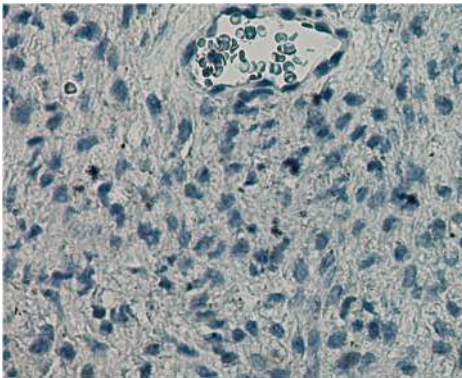


Abb. 4: Tonsille als Negativkontrolle, 400-fach (20x)

2.4.8 Auswertung der Färbungen

Die gefärbten TMA wurden durch zwei Untersucher (S.L. und K.B.) an einem Lichtmikroskop (DIASTAR™ Nr. 26595, Reichert-Jung, Nussloch) bei 400-facher Vergrößerung unabhängig voneinander und ohne Kenntnis der klinischen Daten ausgewertet. Pro Patientin lagen auf jedem TMA drei Tumorstanzen und eine angrenzende Stromastanze vor. Von jeder Tumorstanz wurden 5x 100 Zellen ausgewertet und einen Mittelwert als Ergebnis gebildet. Bei stark voneinander abweichenden Ergebnissen beider Untersucher erfolgte eine gemeinsame Nachkontrolle am Multi-head-Mikroskop. Bei *TOP2A*, *Ki-67*, *CDC2* und *UBE2C* erfolgte die zellgenaue Auszählung und die Angabe des Ergebnisses in exakten Prozentwerten. Als positiv wurden Zellkern bzw. Zytoplasma nur gewertet, wenn die

Färbung eindeutig war, die Farbtintensität wurde dabei nicht berücksichtigt. Für die Auswertung von *Cyclin B1* und *FASN* wurde die semiquantitative Auswertung in Anlehnung an das System von Remmele und Stegner benutzt. Bei dieser wird ein immunreaktiver Score (IRS) aus der Intensität der Färbung (IF) und dem Prozentsatz (PS) an positivem Zellen errechnet. Um den IRS zu erhalten werden IF und PS multipliziert, was zu Werten von 0 bis 12 führt. In der vorliegenden Arbeit wurde bei Werten über 1 von einer positiven Proteinexpression gesprochen. Bei der Auswertung von *FASN* wurde der IRS in abgewandelter Form angewandt und konnte zur verbesserten Ergebnisdarstellung eine maximale Punktschme von 9 erreichen.

Intensität der Färbung (IF)		Prozentsatz positiver Zellen (PS)	
		<i>Cyclin B1</i>	<i>FASN</i>
0	negatives Färbeergebnis	0	<5 %
1	schwaches Färbeergebnis	1	6 - 20 %
2	mäßiges Färbeergebnis	2	21 - 40 %
3	starkes Färbeergebnis	3	41 - 70 %
		4	>71 %

Tabelle 4: Ermittlung des Immunreaktiven Scores (IRS) für Cyclin B1 und FASN

2.4.9 Statistische Analyse

Die statistischen Datenanalysen wurden mit Hilfe der SPSS Software (Statistical Package for the Social Sciences) Version 16.0 berechnet. Die deskriptiven Statistiken zeigen Mittelwert, Standardabweichung (Std.) sowie das jeweilige Minimum (min.) und Maximum (max.). Weiterhin sind die absoluten Zahlenwerte und die zugehörigen Prozentangaben aufgeführt. Bei der Proteinexpression der molekularen Marker zeigten sich signifikante Abweichungen von einer Normalverteilung nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors, so dass die weiteren statistischen Analysen mit nicht-parametrischen Methoden erfolgten. Um die Proteinexpression der Marker in den drei Geweben und den drei Gradingstufen darzustellen, wurde der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Bei signifikanten Unterschieden erfolgte im Anschluss ein Paarvergleich mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Korrelationsanalyse der Proteinexpression der Marker untereinander erfolgte nach Spearman-Rho. Zur Unterscheidung der Proteinexpression in den Gruppen *Low-grade* versus *High-grade* erfolgte eine ROC-Analyse. Die Prüfung, ob anhand einer Markerkombination die Einteilung in *Low grade*- und *High-grade*-Tumoren möglich ist, erfolgte mittels logistischer Regression. Alle Ergebnisse wurden als signifikant bezeichnet, wenn der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 war und diese sind im Ergebnisteil „fett“ gedruckt.

3 Ergebnisse

3.1.1 Alter bei Diagnosestellung

Das Alter aller Patientinnen dieser Studie schwankte zwischen 26 und 89 Jahren, wobei das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei den Ovarialkarzinomen bei 62 Jahren, bei den BOT bei 62,3 Jahren und bei den benignen Tumoren bei 63,9 Jahren lag. Als Zeitpunkt der Erstdiagnose wurde hierbei der Tag der Operation mit histologischer Befundung festgelegt.

3.1.2 Stadieneinteilung nach FIGO

Anhand des chirurgischen Stagings und der histopathologischen Daten konnte bei den Ovarialkarzinom- und BOT-Patientinnen die Zuordnung des FIGO-Stadiums erfolgen. Bei einer Karzinom-Patientin fehlt die genaue Angabe des FIGO-Stadiums. Zum genauen FIGO-Stadium siehe Tabelle 5. Bei den benignen Tumoren wird generell keine FIGO Einteilung vorgenommen.

FIGO-Stadium	Karzinom	BOT
I	22 (15,9%)	18 (90%)
II	9 (6,5%)	2 (10%)
III	85 (61,6%)	0 (0%)
IV	22 (15,9%)	0 (0%)
Gesamt	138 (100%)	20 (100%)

Tabelle 5: Darstellung des FIGO-Stadiums im Kollektiv der BOT und Ovarialkarzinome

3.1.3 Grading

Die Einteilung der 139 Ovarialkarzinome erfolgte in 6 (4,3%) hoch hochdifferenzierte G1, 58 (41,7%) mäßig differenzierte G2 und 75 (54%) undifferenzierte G3 Tumoren. Für die benignen Tumore und BOT entfällt die Einteilung.

3.1.4 Histopathologische Einteilung

Aufgrund der Häufigkeitsverteilung unter den histologischen Tumortypen innerhalb der Ovarialkarzinome wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit auf den serösen und endometrioiden Subtyp gelegt und diese sind mit 104 (74,8%) und 32 (23,0%) im verwendeten Kollektiv entsprechend überrepräsentiert. Muzinöse Karzinome machen nur 2 (1,4%) und undifferenzierte nur 1 (0,7%) aus. Bei den BOT waren 14 (70%) serös und 5 (25%) muzinös und bei einem (5%) lag keine genaue Angabe zum histologischen Typ vor. Die Kontrollgruppe der 18 benignen Tumoren bestand aus 4 (22,2%) Follikel- und Inklusionszysten sowie 14 (77,8%) Zystadenomen und Zystadenofibromen.

3.1.5 Körpergröße und Körpergewicht

Bei insgesamt 138 Patientinnen konnte aus Körpergröße und -gewicht der Body-Mass-Index (BMI) ermittelt werden. Dabei bedeutet ein BMI-Wert: <18,5 Untergewicht, 18,5-24,9 Normalgewicht, 25-29,9 Präadipositas und >30 Adipositas.

Body-Mass-Index	Karzinome	BOT	Benigne
Min.	14,4	17,3	21,1
Max.	38,7	36,8	34,2
Std.	3,8	6,6	4,6
Mittelwert	24,7	27,2	26,6

Tabelle 6: Darstellung des BMI bei Diagnose im Kollektiv der benignen Tumoren, BOT und Ovarialkarzinome

3.1.6 Ca-125 Wert

Bei 116 Ovarialkarzinompatientinnen konnte der präoperative Ca-125 Wert bestimmt werden. Dieser erlaubt einen Vergleich mit Werten nach erfolgter Chemotherapie als Indikator des Therapieansprechens und zur Rezidivkontrolle. Bei 35 Patientinnen lagen dafür Werte nach erfolgter Chemotherapie vor. Bei den BOT erfolgte in 5 Fällen eine Chemotherapie, da zum Teil eine Aneuploidie des Tumors mit Invasion vorlag, zum Teil ein fraglicher Übergang in ein Karzinom bestand. Bei den BOT lagen in 16 Fällen Werte vor Therapie und in 2 Fällen Werte nach Therapie vor. Da bei den benignen Tumoren keine Chemotherapie erfolgte, entfällt dort der Wert nach Therapie und es wurden nur die präoperativen Werte von 17 Patientinnen als Vergleich aufgeführt. Der hohe Mittelwert plus Standardabweichung kommt dadurch zustande, dass eine Patientin starke Raucherin mit ausgeprägter Herzinsuffizienz und Lebererkrankung war, was die Darstellung stark verzerrt.

Ca-125 in kU/l	Karzinom		BOT		Benigne
	präoperativ	postchemo	präoperativ	nach Therapie	präoperativ
Kleinster	11	1	13	4	4
Größter	14775	1352	254	11	1608
Std.	2351,6	226,5	81,2	5,0	386,1
Mittelwert	1372,4	55,8	93,7	7,5	110,1

Tabelle 7: Darstellung des Ca-125 Wertes bei Diagnose sowie nach adjuvanter Chemotherapie im Kollektiv der benignen Tumore, BOT und Ovarialkarzinome

3.1.7 Primäroperation und Lymphonodektomie (LNE)

Bei allen Patientinnen erfolgte eine Primäroperation zur Diagnosesicherung und Feststellung der exakten Tumorausbreitung. Bei den 139 Ovarialkarzinompatientinnen wurde standardmäßig eine Hysterektomie, beidseitige Adnektomie und Omentektomie mit dem Ziel der makroskopischen Tumorfreiheit durchgeführt. Anhand des Operationsberichtes und der histologischen Befunde konnte nachvollzogen werden, dass 37 (26,6%) der Patientinnen eine

paraaortale LNE und 49 (35,3%) eine pelvine LNE erhielten. Bei den benignen Tumoren und BOT erfolgten keine LNE.

3.1.8 Informationen zum Tumorrest

Aussagen zum genauen Tumorrest nach der Primäroperation konnten bei 120 der Ovarialkarzinompatientinnen getroffen werden: 39 (32,5%) zeigten sich makroskopisch tumorfrei, bei 81 (67,5%) Patientinnen lag ein Tumorrest vor. Dieser war in 30 (37%) der Fälle kleiner als 1 cm und in 51 (62,9%) größer als 1 cm. Bei den benignen Tumoren und BOT gelang in allen Fällen eine vollständige Entfernung.

3.1.9 Aszites und Peritonealkarzinose

Es lagen bei 126 der Ovarialkarzinompatientinnen Informationen zur Aszitesmenge während der Primäroperation vor: 72 (57,1%) hatten 0-500 ml Aszites und 54 (42,9%) hatten mehr als 500 ml Aszitesvolumen. Alle Patientinnen mit BOT und aus der benignen Kontrollgruppe waren aszitesfrei. Es lagen bei 138 Ovarialkarzinompatientinnen Aussagen zur Peritonealkarzinose während der Primäroperation vor: 95 (68,8%) zeigten einen positiven und 43 (31,2%) einen negativen Nachweis. Bei den benignen Tumoren und BOT trat keine Peritonealkarzinose auf.

3.1.10 Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapeutika

Nach erfolgter Primäroperation lagen von 119 Ovarialkarzinompatientinnen aus der Universitätsfrauenklinik Daten zur adjuvanten first-line Chemotherapie vor. Davon wurden 100 (84%) Patientinnen mit mindestens 6 Zyklen behandelt. Es erhielten 99 (99%) Patientinnen eine platinhaltige und 1 (1%) Patientin eine nichtplatinhaltige Chemotherapie. Nach Abschluss der adjuvanten Chemotherapie zeigten 77 (77%) Patientinnen ein positives- und 23 (23%) Patientinnen ein negatives Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie. Auf Grund persönlicher Ablehnung, hohen Alters oder schlechten Allgemeinzustandes erhielten 14 (11,8%) Patientinnen keine Chemotherapie und 5 (4,2%) Patientinnen lediglich Treosulfan per os. Die Daten von 20 Ovarialkarzinompatientinnen, welche außerhalb der Universitätsfrauenklinik behandelt wurden, konnten nicht ermittelt werden. In der Gruppe der 20 BOT erhielten 15 (75%) der Patientinnen keine adjuvante first-line Chemotherapie. Obwohl es nicht zum Standardvorgehen gehört bekamen 5 (25%) Patientinnen eine platinhaltige Chemotherapie auf Grund ihres jungen Alters und dem Verdacht auf invasive Implantate. Diese 5 (100%) Patientinnen sprachen alle positiv auf die platinhaltige Chemotherapie an. Bei den benignen Tumoren erfolgten keine Chemotherapien.

3.2 Vergleich der Proteinexpression in den benignen Tumoren, BOT und Ovarialkarzinomen sowie in den verschiedenen Gradingstufen

3.2.1 Proteinexpression von „Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C“ (UBE2C)

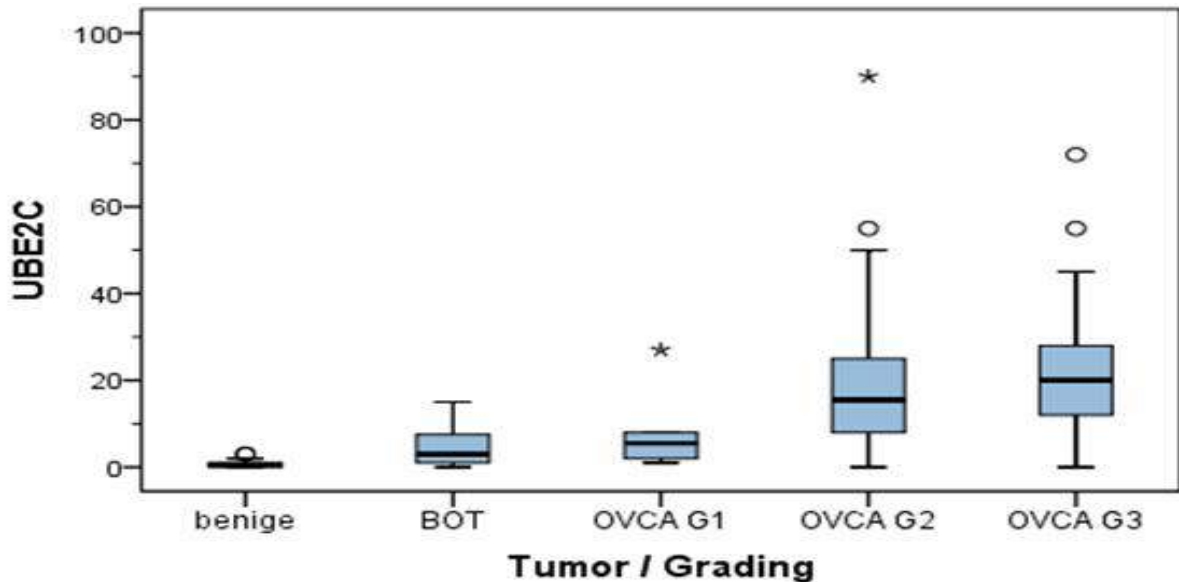


Abb. 5: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von UBE2C in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3

Die mittlere Proteinexpression von *UBE2C* in den benignen Tumoren betrug $0,78 \pm 1\%$ und lag zwischen 0 und 3% bei einem Median von 0,5%. Die mittlere Proteinexpression in den BOT betrug $4,53 \pm 4,27\%$ und lag zwischen 0 und 15% bei einem Median von 3%. Die mittlere Proteinexpression bei den Karzinomen betrug $19,54 \pm 13,8\%$ und lag zwischen 0 und 90% bei einem Median von 18%. Betrachtet man die verschiedenen Gradingstufen, so betrug die mittlere Proteinexpression bei G1 $8,17 \pm 9,70\%$ mit Werten zwischen 1 und 27% bei einem Median von 5,5%. Bei G2 betrug die mittlere Proteinexpression $18,59 \pm 15,12\%$ mit Werten zwischen 0 und 90% bei einem Median von 15,5%. Bei G3 betrug die mittlere Proteinexpression $21,22 \pm 12,58\%$ mit Werten zwischen 0 und 72% bei einem Median von 20%.

Die Expression von *UBE2C* in den benignen Tumoren unterscheidet sich somit signifikant von allen anderen ($p < 0,001$). Zwischen BOT und G1 lassen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede nachweisen ($p = 0,437$), ebenfalls nicht zwischen G2 und G3 ($p = 0,070$). Dahingegen unterscheidet sich die Expression von *UBE2C* in den BOT sowohl

von G2 als auch von G3 ($p < 0.001$) und die Expression von G1 unterscheidet sich sowohl von G2 ($p = 0.035$) als auch von G3 ($p = 0.010$).

3.2.2 Proteinexpression von „Topoisomerase II-alpha“ (TOP2A/S1)

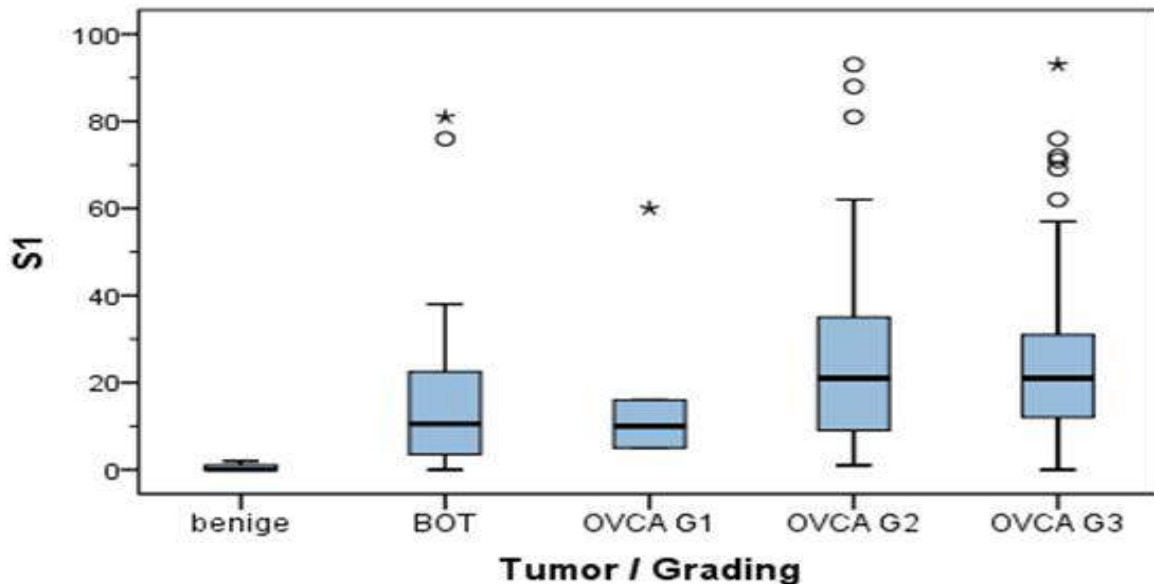


Abb. 6: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von TOP2A/S1 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3

Die mittlere Proteinexpression von TOP2A/S1 in den benignen Tumoren betrug $0,5 \pm 0,79\%$ und lag zwischen 0 und 2% bei einem Median von 0%. Die mittlere Proteinexpression in den BOT betrug $18,1 \pm 22,86\%$ und lag zwischen 0 und 81% bei einem Median von 10,5%. Die mittlere Proteinexpression bei den Karzinomen betrug $25,07 \pm 20,21\%$ und lag zwischen 0 und 93% bei einem Median von 20%. Betrachtet man die verschiedenen Gradingstufen, so betrug die mittlere Proteinexpression bei G1 $17,67 \pm 21,29\%$ mit Werten zwischen 5 und 60% bei einem Median von 10%. Bei G2 betrug die mittlere Proteinexpression $25,25 \pm 21,86\%$ mit Werten zwischen 1 und 93% bei einem Median von 21%. Bei G3 betrug die mittlere Proteinexpression $25,54 \pm 18,94\%$ mit Werten zwischen 0 und 93% bei einem Median von 21%.

Die Expression von TOP2A/S1 in den benignen Tumoren unterscheidet sich somit signifikant von allen anderen ($p < 0.001$). Zwischen BOT und G1 lassen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede nachweisen ($p = 0.836$), ebenfalls nicht zwischen G2 und G3 ($p = 0.544$). Dahingegen unterscheidet sich die Expression von TOP2A/S1 in den BOT sowohl von G2 ($p = 0.047$) als auch von G3 ($p = 0.010$). Die Expression von TOP2A/S1 in den G1 unterscheidet sich jedoch weder von G2 ($p = 0.234$) noch von G3 ($p = 0.081$).

3.2.3 Proteinexpression von „Topoisomerase II-alpha“ (TOP2A/S4)

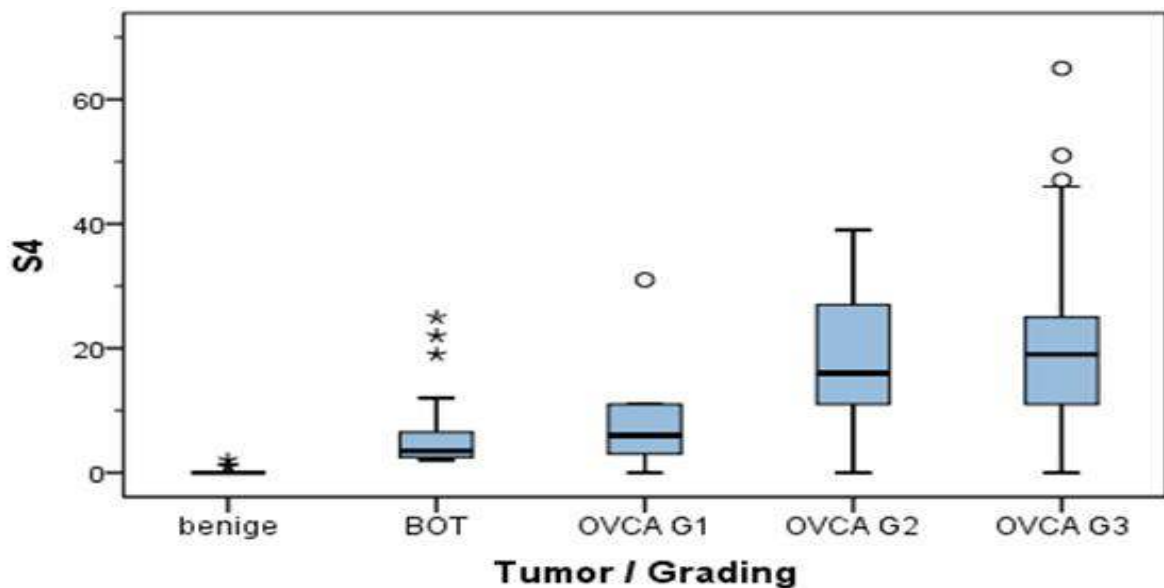


Abb. 7: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von TOP2A/S4 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3

Die mittlere Proteinexpression von *TOP2A/S4* in den benignen Tumoren betrug $0,28 \pm 0,58\%$ und lag zwischen 0 und 2% bei einem Median von 0%. Die mittlere Proteinexpression in den BOT betrug $6,7 \pm 7,06\%$ und lag zwischen 2 und 25% bei einem Median von 3,5%. Die mittlere Proteinexpression bei den Karzinomen betrug $18,88 \pm 11,23\%$ und lag zwischen 0 und 65% bei einem Median von 17%. Betrachtet man die verschiedenen Gradingstufen, so betrug die mittlere Proteinexpression bei G1 $9,5 \pm 11,17\%$ mit Werten zwischen 0 und 31% bei einem Median von 6%. Bei G2 betrug die mittlere Proteinexpression $18,28 \pm 9,95\%$ mit Werten zwischen 0 und 39% bei einem Median von 16%. Bei G3 betrug die mittlere Proteinexpression $20,11 \pm 11,91\%$ mit Werten zwischen 0 und 65% bei einem Median von 19%.

Die Expression von *TOP2A/S4* in den benignen Tumoren unterscheidet sich somit signifikant von allen anderen (**$p < 0.003$**). Zwischen BOT und G1 lassen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede nachweisen ($p = 0.494$), ebenfalls nicht zwischen G2 und G3 ($p = 0.650$). Dahingegen unterscheidet sich die Expression von *TOP2A/S4* in den BOT sowohl von G2 als auch von G3 (**$p < 0.001$**) und die Expression von G1 unterscheidet sich sowohl von G2 (**$p = 0.033$**) als auch von G3 (**$p = 0.017$**).

3.2.4 Proteinexpression von „Fatty Acid Synthase“ (FASN)

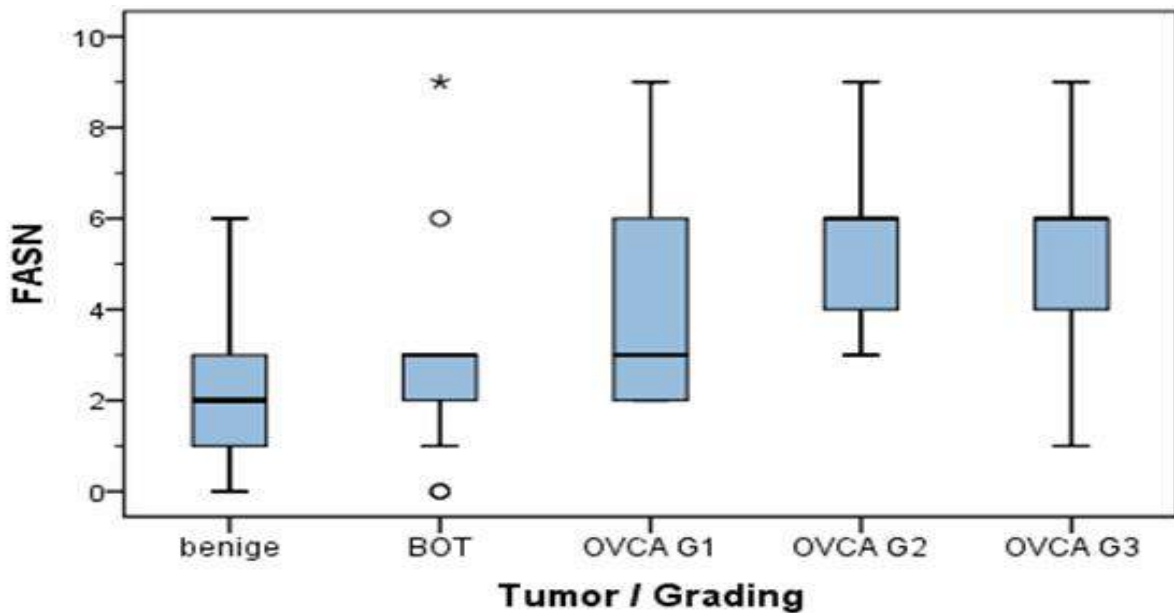


Abb. 8: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von FASN in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3

Die mittlere Proteinexpression von FASN in den benignen Tumoren betrug $2,24 \pm 1,72$ und lag zwischen 0 und 6 bei einem Median von 2. Die mittlere Proteinexpression in den BOT betrug $2,75 \pm 1,97$ und lag zwischen 0 und 9 bei einem Median von 3. Die mittlere Proteinexpression bei den Karzinomen betrug $5,37 \pm 1,90$ und lag zwischen 1 und 9 bei einem Median von 6. Betrachtet man die verschiedenen Gradingstufen, so betrug die mittlere Proteinexpression bei G1 $4,17 \pm 2,86$ mit Werten zwischen 2 und 9 bei einem Median von 3. Bei G2 betrug die mittlere Proteinexpression $5,57 \pm 1,98$ mit Werten zwischen 3 und 9 bei einem Median von 6. Bei G3 betrug die mittlere Proteinexpression $5,31 \pm 1,74$ mit Werten zwischen 1 und 9 bei einem Median von 6.

Die Expression von FASN in den benignen Tumoren unterscheidet sich signifikant von G2 und G3 ($p < 0.001$), jedoch nicht von BOT ($p = 0.517$) und G1 ($p = 0.177$). Zwischen BOT und G1 lassen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede nachweisen ($p = 0.421$), ebenfalls nicht zwischen G2 und G3 ($p = 0.627$). Dahingegen unterscheidet sich die Expression von FASN in den BOT sowohl von G2 als auch von G3 ($p < 0.001$). Die Expression von FASN in den G1 unterscheidet sich jedoch weder von G2 ($p = 0.111$) noch von G3 ($p = 0.110$).

3.2.5 Proteinexpression von „Cyclin B1“ (Cyclin B1)

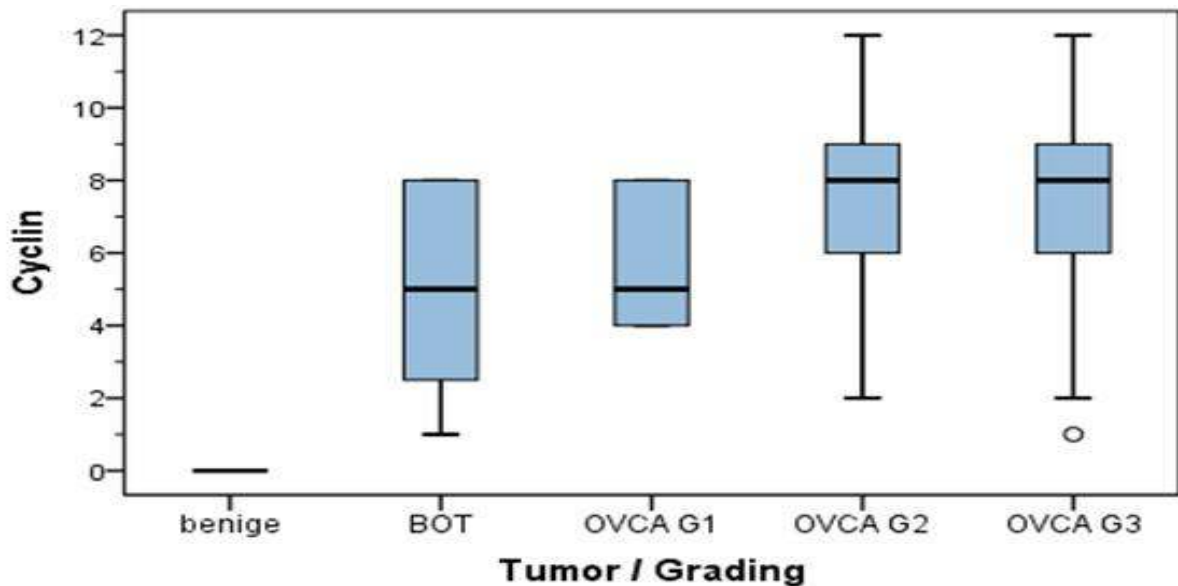


Abb. 9: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von Cyclin B1 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3

Die mittlere Proteinexpression von *Cyclin B1* in den benignen Tumoren betrug 0 ± 0 bei einem Median von 0. Die mittlere Proteinexpression in den BOT betrug $4,85 \pm 2,66$ und lag zwischen 1 und 8 bei einem Median von 5. Die mittlere Proteinexpression bei den Karzinomen betrug $7,5 \pm 2,6$ und lag zwischen 1 und 12 bei einem Median von 8. Betrachtet man die verschiedenen Gradingstufen, so betrug die mittlere Proteinexpression bei G1 $5,67 \pm 1,97$ mit Werten zwischen 4 und 8 bei einem Median von 5. Bei G2 betrug die mittlere Proteinexpression $7,56 \pm 2,51$ mit Werten zwischen 2 und 12 bei einem Median von 8. Bei G3 betrug die mittlere Proteinexpression $7,59 \pm 2,69$ mit Werten zwischen 1 und 12 bei einem Median von 8.

Die Expression von *Cyclin B1* in den benignen Tumoren unterscheidet sich somit signifikant von allen anderen ($p < 0.001$). Zwischen BOT und G1 lassen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede nachweisen ($p = 0.494$), ebenfalls nicht zwischen G2 und G3 ($p = 0.851$). Dahingegen unterscheidet sich die Expression von *Cyclin B1* in den BOT sowohl von G2 als auch von G3 ($p < 0.001$). Die Expression von *Cyclin B1* in den G1 unterscheidet sich jedoch weder von G2 ($p = 0.730$) noch von G3 ($p = 0.710$).

3.2.6 Proteinexpression von „Cyclin-dependent Kinase 1“ (CDC2)

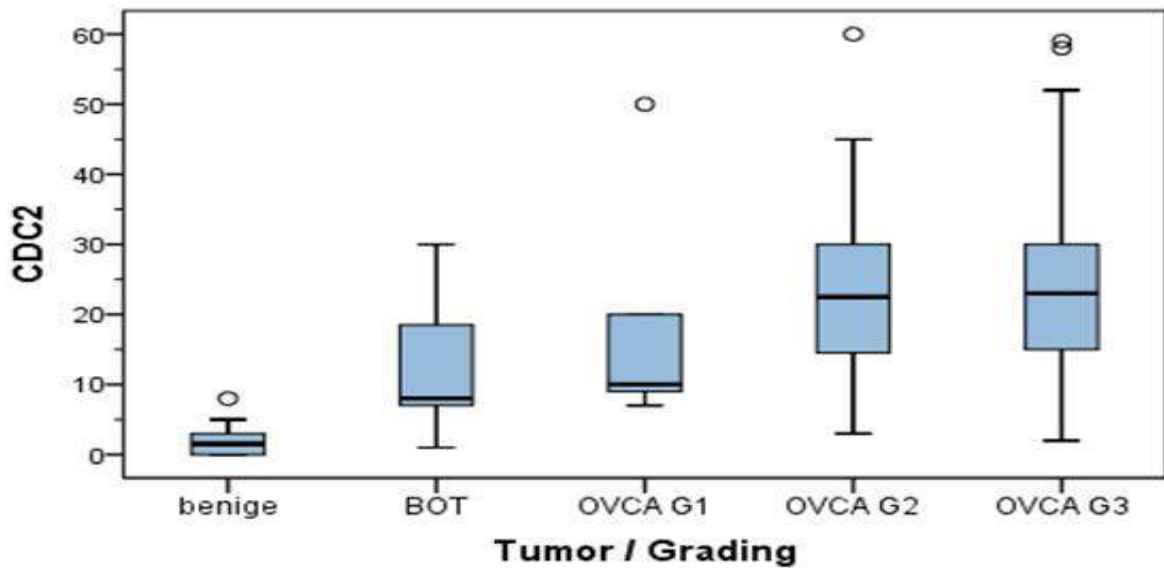


Abb. 10: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von CDC2 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3

Die mittlere Proteinexpression von *CDC2* in den benignen Tumoren betrug $2 \pm 2,28\%$ und lag zwischen 0 und 8% bei einem Median von 1,5%. Die mittlere Proteinexpression in den BOT betrug $11,79 \pm 8,03\%$ und lag zwischen 1 und 30% bei einem Median von 8%. Die mittlere Proteinexpression bei den Karzinomen betrug $23,50 \pm 12,11\%$ und lag zwischen 2 und 60% bei einem Median von 23%. Betrachtet man die verschiedenen Gradingstufen, so betrug die mittlere Proteinexpression bei G1 $19,2 \pm 17,94\%$ mit Werten zwischen 7 und 50% bei einem Median von 10%. Bei G2 betrug die mittlere Proteinexpression $22,52 \pm 11,89\%$ mit Werten zwischen 3 und 60% bei einem Median von 22,5%. Bei G3 betrug die mittlere Proteinexpression $24,54 \pm 11,92\%$ mit Werten zwischen 2 und 59% bei einem Median von 23%.

Die Expression von *CDC2* in den benignen Tumoren unterscheidet sich somit signifikant von allen anderen ($p < 0.001$). Zwischen BOT und G1 lassen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede nachweisen ($p = 0.297$), ebenfalls nicht zwischen G2 und G3 ($p = 0.430$). Dahingegen unterscheidet sich die Expression von *CDC2* in den BOT sowohl von G2 ($p < 0.001$) als auch von G3 ($p < 0.001$). Die Expression von *CDC2* in den G1 unterscheidet sich jedoch weder von G2 ($p = 0.322$) noch von G3 ($p = 0.143$).

3.2.7 Proteinexpression von „Antigen Ki-67“ (Ki-67)

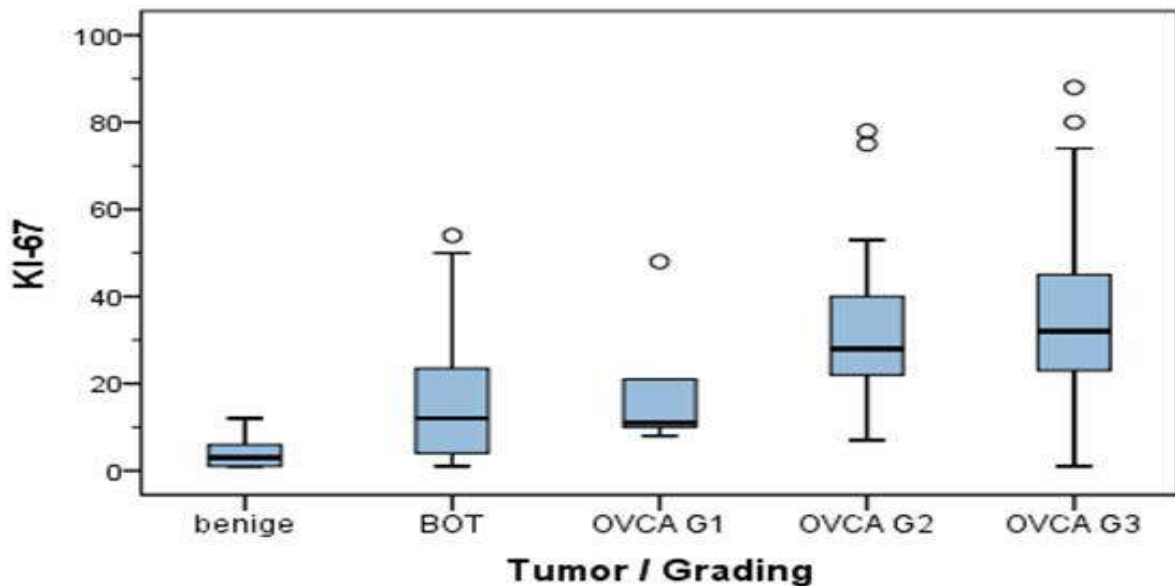


Abb. 11: Boxplot zum Vergleich der Proteinexpression von Ki-67 in den benignen Tumoren, BOT und Karzinomen sowie den verschiedenen Gradingstufen G1, G2 und G3

Die mittlere Proteinexpression von *Ki-67* in den benignen Tumoren betrug $4,11 \pm 3,68\%$ und lag zwischen 1 und 12% bei einem Median von 3%. Die mittlere Proteinexpression in den BOT betrug $16,2 \pm 15,4\%$ und lag zwischen 1 und 54% bei einem Median von 12%. Die mittlere Proteinexpression bei den Karzinomen betrug $32,06 \pm 16,2\%$ und lag zwischen 1 und 88% bei einem Median von 30%. Betrachtet man die verschiedenen Gradingstufen, so betrug die mittlere Proteinexpression bei G1 $18,17 \pm 15,3\%$ mit Werten zwischen 8 und 48% bei einem Median von 11%. Bei G2 betrug die mittlere Proteinexpression $30,98 \pm 15,05\%$ mit Werten zwischen 7 und 78% bei einem Median von 28%. Bei G3 betrug die mittlere Proteinexpression $33,99 \pm 16,68\%$ mit Werten zwischen 1 und 88% bei einem Median von 32%.

Die Expression von *Ki-67* in den benignen Tumoren unterscheidet sich somit signifikant von allen anderen ($p < 0.001$). Zwischen BOT und G1 lassen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede nachweisen ($p = 0.744$), ebenfalls nicht zwischen G2 und G3 ($p = 0.303$). Dahingegen unterscheidet sich die Expression von *Ki-67* in den BOT sowohl von G2 als auch von G3 ($p < 0.001$) und die Expression von G1 unterscheidet sich sowohl von G2 ($p = 0.034$) als auch von G3 ($p = 0.020$).

3.3 Beispiele für die immunhistochemischen Färbungen

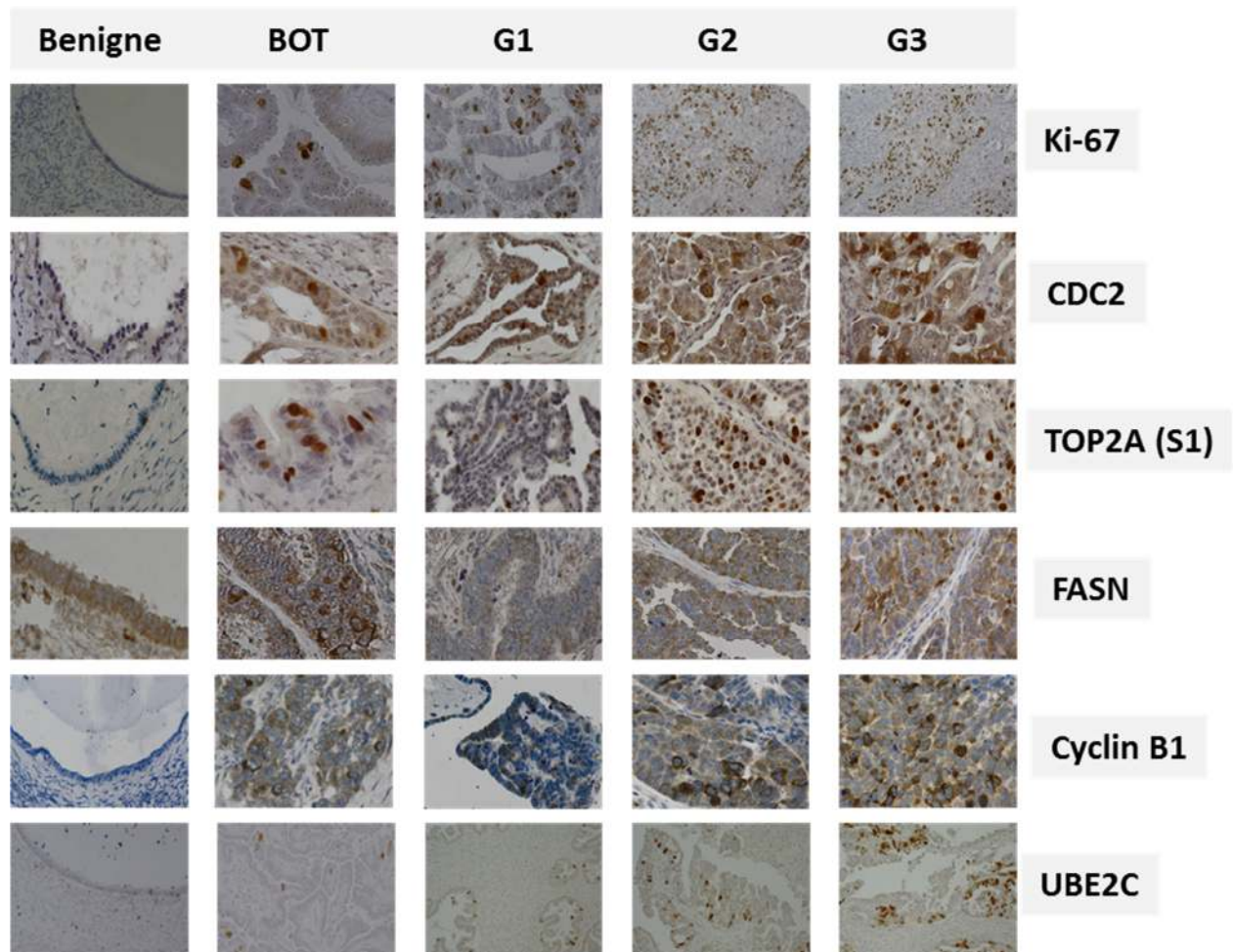


Abb. 12: Beispiele aus der immunhistochemischen Färbung für alle Marker außer TOP2A (S4)

3.4 Korrelation der Proteinexpression der Marker untereinander

Marker:	S4	S1	Ki-67	CDC2	Cyclin B1	FASN	UBE2C
S4	1,000						
S1	0,794**	1,000					
Ki-67	0,769**	0,603**	1,000				
CDC2	0,721**	0,654**	0,708**	1,000			
Cyclin B1	0,451**	0,369**	0,400**	0,368**	1,000		
FASN	0,487**	0,314**	0,482**	0,383**	0,492**	1,000	
UBE2C	0,837**	0,665**	0,779**	0,726**	0,532**	0,587**	1,000

Tabelle 8: Darstellung der Korrelation der Proteinexpression der Marker untereinander. ** Die Korrelation ist dabei für die Werte auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)

Die Korrelation der Proteinexpression der Marker untereinander ergab für alle untersuchten Marker einen mäßig bis stark positiven Zusammenhang nach der „Spearman-Rho-Korrelation“. Insgesamt zeigten die Marker *UBE2C*, *TOP2A/S1*, *TOP2A/S4*, *Ki-67* und *CDC2*

eine deutlich stärkere Korrelation der Proteinexpression untereinander, wohingegen *Cyclin β1* und *FASN* nur mäßig mit den anderen Markern korrelierten. Besonders für die speziellen Paare *UBE2C/S4* (0,837), *Top2A(S1) /TOP2A(S4)* (0,794), *UBE2C/Ki-67* (0,779) und *Ki-67/S4* (0,769) zeigte sich ein starker Zusammenhang in der Proteinexpression.

3.5 Unterscheidung der Proteinexpression in den Gruppen Low-grade (BOT/G1) versus High-grade (G2/G3)

Marker:	Errechnete Fläche unter der Kurve:	Maximaler Youden-Index:	Sensitivität:	1-Spezifität:
<i>UBE2C</i>	0,887	0,708	0,839	0,130
<i>S4</i>	0,835	0,634	0,895	0,261
<i>FASN</i>	0,814	0,597	0,815	0,217
<i>Ki-67</i>	0,794	0,546	0,806	0,261
<i>CDC2</i>	0,781	0,452	0,887	0,435
<i>Ccyclin β1</i>	0,753	0,325	0,847	0,522
<i>S1</i>	0,666	0,330	0,677	0,348

Tabelle 9: Darstellung der errechneten Fläche unter der Kurve und des maximalen Youden-Index (größte Sensitivität und größte Spezifität) für alle untersuchten Marker in den Gruppen Low-grade (BOT/G1) und High-grade (G2/G3)

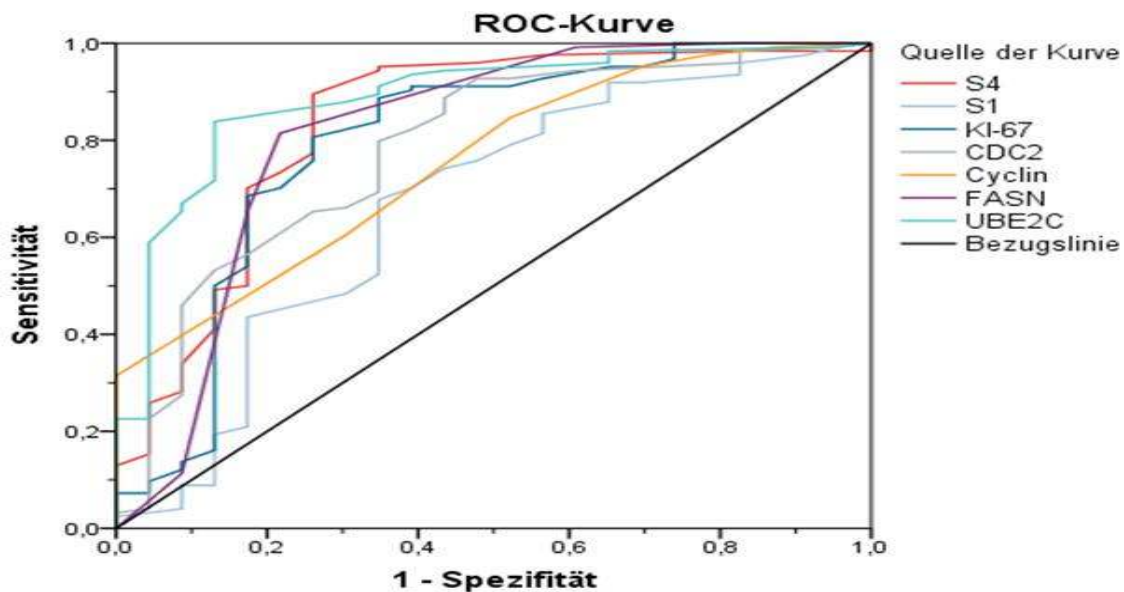


Abb. 13: Darstellung der Fähigkeit aller untersuchten Marker, die Gruppen Low-grade (BOT/G1) und High-grade (G2/G3) anhand der Proteinexpression voneinander zu trennen

Je größer die Fläche unter der Kurve, desto besser ist der jeweilige Marker geeignet, anhand der Proteinexpression, die beiden Gruppen *Low-grade* (BOT/G1) und *High-grade* (G2/G3) voneinander zu trennen. Dabei gibt der maximale Youden-Index die größte Sensitivität mit gleichzeitig größter Spezifität an. Es ergibt sich eine Reihenfolge in absteigender

Trennschärfe: *UBE2C* - *TOP2A/S4* - *FASN* - *Ki-67* - *CDC2* - *Cyclin B1* - *TOP2A/S1*. Wobei *S1* und *S4* ja beide *TOP2A* abbilden: doch auch hier ist *S4* dem Marker *S1* überlegen.

3.6 Korrelation von *UBE2C*/*Ki-67* und *UBE2C*/*TOP2A(S4)*

Es wird hier geprüft, inwieweit sich die Einteilung in *Low-grade* (BOT/G1) versus *High-grade* (G2/G3) in den BOT und Ovarialkarzinomen anhand der drei Marker *UBE2C*, *TOP2A/S4* und *Ki-67* bzw. einer Kombination aus diesen vorhersagen lässt. Es wurden nur die drei oben genannten benutzt, da die anderen in dieser Arbeit untersuchten Proteinmarker zum Teil nicht gut geeignet waren G1 von G2/G3 zu trennen: Somit fielen *CDC2*, *Cyclin B1* und *FASN* aus der Berechnung heraus, da Sie keine sichere Trennung von G1 und G2/G3 zeigen konnten. Bei *FASN* war zusätzlich keine sichere Trennung von benignen Tumoren und BOT/G1 möglich. In Bezug auf *TOP2A (S1/S4)* fiel *S1* raus, da *S4* in den weiteren Analysen überlegen war. Nur *UBE2C* bleibt im logistischen Regressionsmodell als Vorhersagevariable erhalten. Die anderen beiden Marker -*TOP2A/S4* und *Ki-67*- liefern keine zusätzlichen Informationen und entfallen somit aus dem Regressionsmodell. Die starke Abhängigkeit zwischen den drei Markern *UBE2C*, *Ki-67* und *TOP2A/S4* war schon aus der Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho ersichtlich.

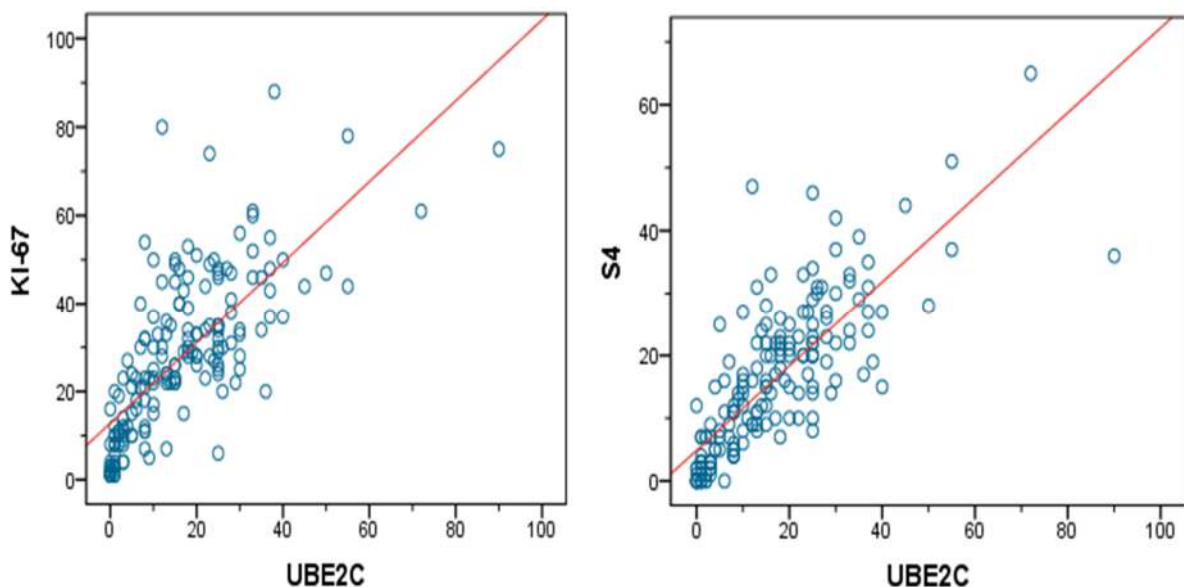


Abb. 14: Korrelation von *UBE2C*/*Ki-67* und *UBE2C*/*S4* in den BOT und Ovarialkarzinomen mittels logistischer Regression. Die Korrelation ist dabei für die Werte auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)

4 Diskussion

4.1 Validierung der Kollektivdaten

Translationale Untersuchungen des Ovarialkarzinoms unterscheiden meist nicht zwischen einzelnen Subgruppen des Ovarialkarzinoms. Dies macht Aussagen zur Diagnostik, zum Verhalten und zu möglichen, auf bestimmte Tumortypen abgestimmte, Therapien schwierig. In dieser Dissertation sollte eine immunhistochemische Bestätigung erfolgen, ob die auf Transkriptionsebene hochregulierten Gene bzw. Genprodukte *Cyclin B1*, *CDC2*, *Ki-67*, *TOP2A*, *UBE2C* sowie *FASN* auch auf Proteinebene exprimiert werden, und ob sich speziell *FASN*, *CDC2* und *TOP2A* als therapeutische Targets beim *High-grade* serösen Ovarialkarzinom eignen. Um valide Aussagen tätigen zu können ist es notwendig, dass die hier durchgeführten Expressionsanalysen auch auf größere Kollektive übertragbar sind. Insbesondere auf Alter, FIGO-Stadium, Histologie und Grading wurde Wert gelegt: Das mittlere Alter der Ovarialkarzinompatientinnen betrug entsprechend der Literatur 62 Jahre [1, 3, 4]. Die BOT wiesen ebenfalls ein mittleres Erkrankungsalter von 62 Jahren auf. Dies liegt über dem sonst beschriebenen Durchschnitt von 38-52 Jahren [4-6, 8, 151]. Eine Erklärung könnte die Rekrutierung an einer Universitätsklinik sein, welche als nicht repräsentativ für die Gesamtbevölkerung angesehen werden kann. Bei den Ovarialkarzinomen lagen entsprechend der Literatur 16% in FIGO I, 6,6% in FIGO II, 61,7% in FIGO III und 15,9% in FIGO IV vor [10, 59, 76, 151-154]. Die BOT waren zu 90% in FIGO I und zu 10% in FIGO II diagnostiziert worden. Andere Studien beschreiben bei 85-97% der Patientinnen mit BOT das FIGO-Stadium I-II [8, 9, 11, 48, 155]. Die Ovarialkarzinome ließen sich entsprechend der Literatur zu 4,3% in G1, 41,7% in G2 und 54% in G3 einteilen [59, 76, 152, 153]. Anhand der neuen Einteilung zeigen sich so 16% *Low-grade* Typ-I-Tumoren und 84% *High-grade* Typ-II-Tumoren [154]. Die Ovarialkarzinome waren zu 75% als serös und 23% als endometrioid klassifiziert [13, 39, 59, 76, 154]. Bei den BOT waren 70% als serös und 30% als muzinös oder nicht sicher klassifiziert. Der am häufigsten beschriebene BOT-Typ ist der seröse (47-90%) und der endometrioiden (2-7%) [4, 7, 9, 11, 48]. Somit sind die in dieser Arbeit erhobenen Daten valide und gut übertragbar und es konnte bestätigt werden, dass die bereits auf RNA-Ebene gezeigte Überexpression der Kandidatengene eine Entsprechung auf Proteinebene hat. Die einzelnen Kandidatengene eignen sich gut zur Unterscheidung von *Low-* und *High-grade*-Ovarialkarzinomen und könnten neben dem bereits etablierten *p53* zur Charakterisierung und Unterscheidung der zwei Tumortypen beitragen [72, 156]. Dazu

können *UBE2C*, *TOP2A*, *FASN*, *CyclinB1* und *CDC2* als mögliche therapeutische Targets für das Ovarialkarzinom genutzt werden.

4.1.1 Ubiquitin-conjugating Enzyme E2C

Die hohe Proteinexpression von *UBE2C* in *Low*- und *High-grade*-Tumoren des Ovars wurde erwartet und steht im Einklang mit der Literatur, zumal es bereits in unterschiedlichen Karzinomgeweben nachgewiesen wurde [84, 87, 92]. Es wurde dort eine Assoziation von Überexpression und niedrigem Differenzierungsgrad nachgewiesen [91, 157, 158]. Für das Ovarialkarzinom konnte diese Abhängigkeit ebenfalls gezeigt werden [89, 159, 160]. Die Beteiligung von *UBE2C* an der Malignomentstehung wurde bereits ausführlich beschrieben, doch ist der Pathomechanismus bisher unklar [86, 88, 160]. Im Normalfall ist *UBE2C* an der Zellteilung am Übergang von der Meta- zur Anaphase und der zeitgerechten Trennung der Schwesterchromatiden beteiligt [87, 88]. Es wird dabei der Eintritt in die Anaphase und die korrekte Chromatidentrennung mit *p31/UBE2C* als Promotor kontrolliert [161]. Am aktiven Zentrum verändertes *UBE2C* kann den Abbau von *Cyclin B* verhindern und Zellen in der Metaphase halten [162]. Erfolgt eine Hochregulation von *UBE2C*, so fördert dies die Bildung von aneuploiden Zellen. Daher zeigten Mäuse, in denen *UBE2C* überexprimiert war, ein breites Spektrum an spontanen Tumoren. *UBE2C* wird daraufhin als Protoonkogen, welches zu Chromosomeninstabilität und zur Tumorentstehung führt, angesehen [86]. Diese These scheint bestätigt zu werden, da eine Überexpression von *UBE2C* in Mammakarzinomzellen zu einer beschleunigten Zellprogression führt und in Kolonkarzinomzellen ein verstärktes Wachstum bewirkt [91, 157]. Eine hohe *UBE2C*-Genexpression scheint außerdem zu einer verminderten Stabilität und einem Abbau von *Cyclin B* zu führen [86]. Neben *UBE2C* sind jedoch weitere Gene und Proteine an der Zellprogression beteiligt. Interessanterweise kann daher die gleichzeitig erhöhte Proteinexpression von *UBE2C* und *Ki-67* im Mamma- und Kolonkarzinom sowie Astrozytom beobachtet werden. Für letztere wird sogar ein Einteilungssystem mit Hilfe der *UBE2C*-Proteinexpression und dem *Ki-67* Proliferationsindex vorgeschlagen [92, 163, 164]. Die vorliegende Arbeit konnte ebenfalls die gemeinsam erhöhte Proteinexpression von *UBE2C* und *Ki-67* im Ovarialkarzinom und den BOT zeigen. Zusätzlich konnte die bereits zuvor beobachtete gemeinsam erhöhte Genexpression von *TOP2A*, *Cyclin B1* und *UBE2C* auf Proteinebene bestätigt werden [165-167]. In Zukunft könnte *UBE2C* Angriffspunkt von Medikamenten werden oder es könnten Inhibitoren zur Therapie des *High-grade*-Ovarialkarzinoms genutzt werden: In Studien zum Mammakarzinom konnte durch den Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen bereits

erfolgreich die *UBE2C*-Level gesenkt und die Proliferation der Krebszellen gehemmt werden. Gleichzeitig konnte das Ansprechen auf Chemotherapie und Radiatio bei Gabe von Doxorubicin, Tamoxifen oder Letrozol verbessert werden [88, 168]. Die Erhöhung der Therapiesensitivität bei Inhibierung von *UBE2C* konnte auch beim Zervixkarzinom bestätigt werden [169]. Im Kolonkarzinom konnte durch Bortezomib die *UBE2C*-Expression vermindert und die *Cycline A/B1* stabilisiert werden. Zusätzlich zeigt sich eine verbesserte Tumorreduktion bei gemeinsamer Gabe von Bortezomib und Oxaliplatin [164]. Auch gelang durch Verminderung der *UBE2C*-Expression eine Verlangsamung des Tumorwachstums und in Kombination mit dem *DR5/TRAIL*-Rezeptor Agonisten zeigte sich ein apoptotischer Effekt auf Karzinomzellen [160]. Der Effekt des verlangsamten Tumorwachstums bei Behinderung der *UBE2C*-Proteinsynthese ist aktuell Gegenstand von weiteren Studien [89].

In dieser Arbeit konnte *UBE2C* als wichtigster Marker zur Trennung von *Low*- und *High-grade* bei malignen Neoplasien des Ovars ermittelt werden und zeigen, dass es beim *High-grade*-Karzinom als mögliches therapeutisches Target genutzt werden kann. Die Trennung kann dabei mittels *UBE2C* als solitärer Marker erfolgen, da die anderen -in dieser Arbeit untersuchten Marker- neben *UBE2C* im Regressionsmodell ohne Nutzen waren und keine zusätzlichen Informationen lieferten. Aufwändige und teure Kombinationsbestimmungen könnten somit entfallen.

4.1.2 Topoisomerase II-alpha

Die Proteinexpression von *TOP2A* in den *Low*- und *High-grade*-Tumoren des Ovars wurde erwartet und steht im Einklang mit der Literatur, wo *TOP2A* in Karzinomgeweben nachgewiesen wurde [84, 95, 170]. Für das Mamma- und Endometriumkarzinom wurde bereits eine Abhängigkeit von steigender Expression und schlecht differenziertem Grading nachgewiesen [93, 171, 172]. Für das Ovarialkarzinom konnte diese Abhängigkeit ebenfalls auf gezeigt werden [29, 98, 99]. Die Beteiligung an der Malignomentstehung wurde bereits ausführlich beschrieben, wenn auch der Pathomechanismus noch nicht geklärt ist: Unter physiologischen Bedingungen kommt *TOP2A* vor allem eine Kontroll- und Reparaturfunktion im Zellzyklus zu [94, 173]. Erfolgt jedoch die Hochregulierung, scheint dies entweder zum programmierten Zelltod zu führen oder aber zur Ausbildung von aggressivem Zellwachstum, Metastasierungstendenz und Medikamentenresistenz [100, 174, 175]. Neben *TOP2A* sind jedoch weitere Gene und Proteine an der Zellprogression beteiligt und die gemeinsam erhöhte Expression konnte bereits in anderen Karzinomen gezeigt werden: mit dem Proliferationsmarker *Ki-67* im Glioblastom, Mantelzelllymphom, Prostata-, Mamma- und

Ovarialkarzinom [96, 97, 99, 170, 171]. In malignen Tumoren konnte eine gemeinsam erhöhte Genexpression von *TOP2A* mit *FASN*, *Cyclin B1*, *CDC2* und *UBE2C* gezeigt werden [165, 166, 175-177]. Die vorliegende Arbeit konnte die gemeinsam erhöhte Proteinexpression von *TOP2A*, *Ki-67*, *FASN*, *Cyclin B1*, *CDC2* und *UBE2C* im Ovarialkarzinom und BOT bestätigen. In Zukunft könnte *TOP2A* als Target einer individualisierten Therapie genutzt werden: Der aktuelle Therapiestandard -eine platinhaltige Chemotherapie- scheint *TOP2A* nicht anzugreifen, so dass bei nachgewiesener hoher Expression mittels *TOP2A*-Inhibitoren wie z. B. Doxorubicin, Etoposid und Mitoxantrone ein besseres Ansprechen erreicht werden könnte [99]. Andere Studien weisen *TOP2A* dagegen weniger die Ausbildung einer Resistenz auf Chemotherapeutika, sondern eher eine generelle Tumoraggressivität zu. Somit könnte anhand der Expression zwischen hoch- und niedrigaggressivem Tumorverhalten selektiert und die angepasste Therapie gewählt werden [100]. Die Funktion von *TOP2A* scheint dabei durch das Tumorsuppressorgen *p53* und *Her-2/neu* beeinflusst zu werden [173, 178, 179]. So konnte eine gemeinsame *Her-2/neu* und *TOP2A*-Genamplifikation in Mammakarzinomzellen ein Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Chemotherapien voraussagen und die *TOP2A*- sowie *FASN*-Proteinexpression sank bei Therapie mit dem anti-*Her-2/neu*-Antikörper Trastuzumab [176, 178]. Neuere Studien schlagen die Behandlung mit Phloridzin vor, welche die *TOP2A*-Aktivität behindert und zum Zellzyklusarrest führt [180].

In dieser Arbeit konnte *TOP2A* als wichtiger Marker zur Trennung von *Low*- und *High-grade* bei malignen Neoplasien des Ovars ermittelt werden und zeigen, dass es beim *High-grade*-Ovarialkarzinom als mögliches therapeutisches Target genutzt werden kann. Die Trennung konnte zwar mittels *TOP2A* als solitärer Marker erfolgen, doch zeigte sich *UBE2C* bei höherer Trennschärfe besser geeignet. Sowohl *S1* als auch *S4* sind dabei bewährte Marker für *TOP2A*-Proteinexpressionsanalysen [97, 100, 172, 181]. In dieser Studie konnte jedoch, nachdem die Färbungen mit *S1* nicht optimal erschienen, mittels *S4* ein besseres Färbeergebnis und eine höhere Trennschärfe erzielt werden. Dies verwundert, da *S1* bereits erfolgreich als Marker eingesetzt wurde [100, 181]. Die in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede zwischen *S1* und *S4* lassen sich eventuell auf ein nicht ganz optimales immunhistochemisches Färbeprotokoll für *S1* und die geringe Fallzahl zurückführen. Diesbezüglich sollte die Expression von *S1* ggf. an einem größeren Kollektiv und mit verbessertem Färbeprotokoll überprüft werden.

4.1.3 Fatty Acid Synthase

Die Proteinexpression von *FASN* in den *Low*- und *High-grade*-Tumoren des Ovars wurde erwartet und steht im Einklang mit der Literatur, wo *FASN* in Karzinomgeweben nachgewiesen wurde [84, 105-108]. Für andere Karzinome wurde bereits eine Abhängigkeit von steigender Expression und schlecht differenziertem Grading nachgewiesen [107-109]. Für das Ovarialkarzinom konnte diese Abhängigkeit ebenfalls gezeigt werden [29, 104, 111, 182]. Die Beteiligung an der Malignomentstehung wurde bereits ausführlich beschrieben, doch bleibt unklar, inwieweit *FASN* dies genau verursacht: Unter physiologischen Bedingungen ist *FASN* nur in hormonsensitiven und in am Lipidstoffwechsel teilnehmenden Zellen exprimiert und für die Fettsäuresynthese und die Produktion von Zell- und Membranstrukturen zuständig [102, 103]. Erfolgt jedoch die Hochregulierung, so scheint *FASN* als Proto-Onkogen eine Rolle bei der Tumorgenese und beim Überleben von malignen Zellen durch Wechselwirkung mit anderen Proteinkinasen (*PI3K/AKT*) und dem Hormonrezeptor *Her-2/neu* zu spielen [102]. An welchem Zeitpunkt der Tumorprogression *FASN* beteiligt ist, ist noch unklar: Es gibt Studien, die eine frühe Expression vermuten lassen [109, 182, 183] und Studien, in denen *FASN* eine späte Rolle zugeordnet wird [107]. So scheint die *FASN*-Genexpression sowohl auf Transkriptionsebene als auch post-transkriptionell kontrolliert zu werden. Die verminderte Expression scheint im Zellzyklus einen Stopp am G1/S Checkpoint zu bewirken [102]. Dazu passt, dass ein *FASN*-Inhibitor die Apoptose in menschlichen Krebszellen *Cyclin B1*-abhängig in der S-Phase einleitet [114]. Neben *FASN* sind jedoch weitere Gene und Proteine an der Zellprogression beteiligt. Interessanterweise kann daher die gleichzeitig erhöhte Proteinexpression von *FASN* und dem Proliferationsmarker *Ki-67* im Kolonkarzinom und Osteosarkom beobachtet werden [107, 184]. Im Mammakarzinom scheint es eine Interaktion zwischen *FASN* und *TOP2A*-Genexpression zu geben [176]. Die vorliegende Arbeit konnte die gemeinsam erhöhte Proteinexpression von *FASN*, *Ki-67* und *TOP2A* im Ovarialkarzinom und in BOT zeigen. In Zukunft könnten *FASN*-Inhibitoren zur Therapie des *High-grade*-Ovarialkarzinoms genutzt werden, da vermutet wird, dass eine Überexpression die Resistenz auf Chemotherapeutika fördert [102]. So konnte die Blockade von *FASN* die Zytotoxizität von Taxol, Paclitaxel und Fluoracil auf Krebszellen verstärken [102, 110]. Weitere *FASN*-Inhibitoren sind aktuell Gegenstand der Forschung [113-115, 185]. Für Cerulenin und C93 konnte bereits eine Wirkung beim Ovarialkarzinom nachgewiesen werden: Cerulenin bewirkt die Apoptose der Krebszellen und C93 konnte, auch noch in platin- und paclitaxelresistenten Zellen, den programmierten Zelltod auslösen [116, 186, 187].

In dieser Arbeit konnte *FASN* als Marker zur Trennung von *Low-* und *High-grade* bei malignen Neoplasien des Ovars ermittelt werden und zeigen, dass es beim *High-grade*-Ovarialkarzinom als mögliches therapeutisches Target genutzt werden kann. Die Trennung konnte zwar mittels *FASN* als solitärer Marker erfolgen, doch zeigten sich *UBE2C* und *TOP2A/S4* besser geeignet, da mittels *FASN* nicht klar zwischen „benigne und BOT/G1“ als auch zwischen „G1 und G2/G3“ getrennt werden konnte. In den vorausgegangenen CHIP-Analysen war *FASN* hingegen in den *High-grade*-Karzinomen klar überexprimiert [29]. Dies mag eventuell an der niedrigen Fallzahl in der Gruppe G1 liegen und sollte an einem größeren Kollektiv überprüft werden.

4.1.4 Cyclin B1

Die Proteinexpression von *Cyclin B1* in den *Low-* und *High-grade*-Tumoren des Ovars wurde erwartet und steht im Einklang mit der Literatur, wo *Cyclin B1* bereits in Karzinomgeweben nachgewiesen wurde [84, 123-125]. Für das Mamma- und Mundbodenkarzinom wurde schon eine Abhängigkeit von steigender Expression und schlecht differenziertem Grading nachgewiesen [188, 189]. Für das Ovarialkarzinom konnte diese Abhängigkeit ebenfalls gezeigt werden [29, 159]. Die Beteiligung an der Malignomentstehung wurde bereits ausführlich beschrieben, doch bleibt unklar, inwieweit *Cyclin B1* dies genau verursacht: Unter physiologischen Bedingungen dient es als Regulatorprotein im Zellzyklus. Dabei ist es streng reguliert und führt bei unkontrollierter Expression zu abnormer Aktivierung der cyclinabhängigen Kinasen [84, 123, 124]. Es kann dann zu *Cyclin B1/CDC2*-Interaktion mit dem Tumorsuppressorgen *p53* und einer unkontrollierten Fortsetzung des Zellzyklus kommen [121, 125, 128]. Neben *Cyclin B1* sind jedoch weitere Gene und Proteine an der Zellprogression beteiligt. Interessanterweise kann daher die gleichzeitig erhöhte Expression von *Cyclin B1* mit *Ki-67* im Bronchial-, Oral- und Mammakarzinom sowie im non-Hodgkin Lymphom [124, 125, 188, 189], mit *TOP2A/UBE2C* im Zervix- und Mammakarzinom [165, 166], mit *CDC2* im non-Hodgkin Lymphom und Mammakarzinom gezeigt werden [121, 125]. Die vorliegende Arbeit konnte die gemeinsam erhöhte Proteinexpression von *Cyclin B1*, *Ki-67*, *TOP2A*, *UBE2C* und *CDC2* im Ovarialkarzinom und den BOT bestätigen. In Zukunft könnte *Cyclin B1* Angriffspunkt von Medikamenten werden oder es könnten Inhibitoren zur Therapie des *High-grade*-Ovarialkarzinoms genutzt werden: So inhibiert das Gadd45-Protein die Aktivität des *CDC2/Cyclin B1*-Komplexes und bewirkt einen G2/M-Arrest. Eine verminderte Genexpression von Gadd45 wurde in verschiedenen Karzinomen und bei Resistenzen auf Chemotherapeutika gefunden [190]. Diese Chemoresistenz konnte bereits mit

einer induzierten Gadd45-Expression in Pankreaskarzinomzellen überwunden werden [191]. Ebenfalls konnten durch den Chemokin-Antagonisten CXCR2 die *Cyclin B1/CDC2*-Level in Ovarialkarzinomzellen gesenkt werden, worauf ein Zellzyklusarrest erfolgte [192]. In Bronchialkarzinomzellen konnte eine ähnliche Wirkung -mit nachfolgendem Zellzyklusarrest- durch die Behandlung mit dem Alkaloid Evodiamine gezeigt werden [193]. Zusätzlich wurde über *Cyclin B1* als mögliches Tumor-assoziiertes-Antigen mit der Möglichkeit der Immuntherapie berichtet [194, 195]. Darüber hinaus scheint eine vermehrte *Cyclin B1/CDC2*-Expression für Medikamentenresistenzen verantwortlich zu sein [196]. Für platinresistente Ovarialkarzinomzellen zeigte die Therapie mit Chaetoglobosin einen *Cyclin B1*-vermittelten Zellzyklusarrest [197]. Die bereits erwähnten *FASN*-Inhibitoren könnten eventuell ebenfalls eine Wirkung auf *Cyclin B1* zeigen: So führt eine *FASN*-Reduktion zu einer *Cyclin B1* vermittelten Reduktion der cyclinabhängigen Kinaseaktivität und dann zum Zellzyklusstopp am G1/G2-Checkpoint [102].

In dieser Arbeit konnte *Cyclin B1* als Marker zur Trennung von *Low*- und *High-grade* bei malignen Neoplasien des Ovars ermittelt werden und zeigen, dass es beim *High-grade*-Ovarialkarzinom als mögliches therapeutisches Target genutzt werden kann. Es finden sich bereits Studien zur Proteinexpression mit Einbeziehung von BOT [198, 199]: Diese zeigen ein vergleichbares Expressionsprofil für *Cyclin B1* wie die Ergebnisse dieser Arbeit, doch erfolgte keine Betrachtung, ob sich BOT/G1 von G2/G3 unterscheiden. Diese Arbeit konnte nun zeigen, dass sich BOT/G1 von G2/G3 gut mithilfe von *Cyclin B1* abgrenzen lassen. Die Trennung in *Low*- und *High-grade* konnte zwar mittels *Cyclin B1* als solitärer Marker erfolgen, doch zeigten sich *UBE2C*, *TOP2A/S4*, *Ki-67* und *CDC2* als besser geeignet.

4.1.5 Cyclin-dependent Kinase 1

Die Proteinexpression von *CDC2* in den *Low*- und *High-grade*-Tumoren des Ovars wurde erwartet und steht im Einklang mit der Literatur, wo *CDC2* in Karzinomgeweben nachgewiesen wurde [84, 125, 134, 135]. Für das Mammakarzinom wurde bereits eine Assoziation von Überexpression und niedrigem Differenzierungsgrad nachgewiesen [121]. Für das Ovarialkarzinom konnte diese Abhängigkeit ebenfalls gezeigt werden [29, 198]. Die Beteiligung an der Malignomentstehung wurde in der Literatur bereits beschrieben, doch bleibt unklar, inwieweit *CDC2* dies genau verursacht: Unter physiologischen Bedingungen trägt *CDC2* zum korrekten Ablauf des Zellzyklus und zur Genomstabilität bei [117, 118, 130]. Erfolgt jedoch die Hochregulierung, so führt dies zu unkontrolliertem Zellwachstum sowie zu verstärkter Metastasierung [135]. *CDC2* wird daher auch als ein möglicher Marker zur

Erfassung des mitotischen Index empfohlen [133]. Neben *CDC2* sind jedoch weitere Gene und Proteine an der Zellprogression beteiligt. Interessanterweise kann daher die gleichzeitig erhöhte Proteinexpression mit *Ki-67* im non-Hodgkin Lymphom [125], mit *Cyclin B1* im Mammakarzinom und non-Hodgkin Lymphom [121, 125] und mit *TOP2A* im Meningeom [177] beobachtet werden. Diese Arbeit konnte die gemeinsam erhöhte Proteinexpression von *CDC2* und *Ki-67*, *Cyclin B1* und *TOP2A* im Ovarialkarzinom und bei BOT bestätigen. In Zukunft könnte *CDC2* Angriffspunkt von Medikamenten werden, indem Inhibitoren zur Therapie des *High-grade*-Ovarialkarzinoms genutzt werden: Es konnte bereits gezeigt werden, dass *CDC2*-Inhibitoren das Wachstum in *c-Myc*-abhängigen Tumoren der Maus verlangsamen [200]. Was auch beim Ovarialkarzinom eine Therapieoption darstellen könnte, da diese oft eine erhöhte *c-Myc*-Expression zeigen [201]. Die schon unter *Cyclin B1* diskutierte induzierte Gadd45-Expression könnte ebenfalls zur Therapie genutzt werden [190, 191]. Der neuer CDK-Inhibitor Dinaciclib konnte bereits erfolgreich in der Therapie des rezidivierenden multipen Myeloms getestet werden [202]. Ein weiterer neuer CDK-Inhibitor Roscovitine wird zur Behandlung von Hirntumoren im Kindesalter vorgeschlagen [138].

In dieser Arbeit konnte *CDC2* als ein Marker zur Trennung von *Low*- und *High-grade* bei malignen Neoplasien des Ovars ermittelt werden und zeigen, dass es beim *High-grade*-Ovarialkarzinom als mögliches therapeutisches Target genutzt werden kann. Es finden sich bereits Studien zum Ovarialkarzinom mit Einbeziehung von BOT [198]: Diese zeigen ein vergleichbares Expressionsprofil für *CDC2* wie die Ergebnisse dieser Arbeit, doch erfolgte bisher keine Betrachtung, ob sich BOT/G1 von G2/G3 unterscheiden. Diese Arbeit konnte nun zeigen, dass sich BOT/G1 gut von G2/G3 mithilfe von *CDC2* abgrenzen lassen. Die Trennung in *Low*- und *High-grade* konnte zwar mittels *CDC2* als solitärer Marker erfolgen, doch zeigten sich *UBE2C*, *TOP2A/S4* und *Ki-67* dafür als besser geeignet.

4.1.6 Antigen Ki-67

Die Proteinexpression von *Ki-67* in den *Low*- und *High-grade*-Tumoren des Ovars wurde erwartet und steht im Einklang mit der Literatur, wo *Ki-67* in Karzinomgeweben nachgewiesen wird [84, 107, 124, 144, 203]. Für andere Karzinome wurde bereits eine Assoziation von Überexpression und niedrigem Differenzierungsgrad nachgewiesen [96, 107, 144]. Für das Ovarialkarzinom konnte diese Abhängigkeit ebenfalls gezeigt werden [29, 43, 143, 204]. *Ki-67* wird in proliferierenden Zellen exprimiert, nicht aber in ruhenden Zellen während der G0-Phase. Es dient lediglich als Proliferationsmarker und ist nicht an der Malignomentstehung oder -Progression beteiligt [140]. Dies erklärt die gleichzeitig erhöhte

Proteinexpression von *Ki-67* mit den -in dieser Arbeit untersuchten- anderen Zellzyklusmarkern. Diese gemeinsam erhöhte Expression konnte auch für andere Karzinome gezeigt werden: Mit *Cyclin B1* im Bronchialkarzinom [124], mit *TOP2A* im Glioblastom und Mammakarzinom [96, 171], mit *UBE2C* im Mamma- und Kolonkarzinom sowie Astrozytom [92, 163, 164], mit *CDC2* in Lymphomen [125, 205] und mit *FASN* im Tuben- und Kolonkarzinom [107, 183]. In Bezug auf mögliche Therapien ist *Ki-67* aktuell nicht als Angriffspunkt von Medikamenten vorgesehen. Allerdings korreliert eine starke *Ki-67*-Proteinexpression in Karzinomen mit einem positiven Ansprechen auf Chemotherapie [143, 203]. Dies erscheint logisch, da *Ki-67* als Proliferationsmarker auf Zellen mit hoher Teilungsrate hinweist, welche auf Chemotherapeutika besonders sensibel reagieren.

In dieser Arbeit konnte *Ki-67* als Marker zur Trennung von *Low*- und *High-grade* bei malignen Neoplasien des Ovars ermittelt werden. Es finden sich bereits Studien zur Expression im Ovarialkarzinom mit Einbeziehung der BOT. Zum Teil beziehen sie sich jedoch nur auf die Prognose und das Überleben [204], oder sie zeigen die Expression in den benignen Tumoren, BOT und Ovarialkarzinomen ohne Betrachtung des Gradings [24, 43, 143, 206]. Es hat jedoch keine Studie untersucht, ob sich BOT/G1 von G2/G3 unterscheiden. Diese Arbeit konnte nun zeigen, dass sich BOT/G1 gut von G2/G3 abgrenzen lassen. Die Trennung in *Low*- und *High-grade* konnte zwar mittels *Ki-67* als solitärer Marker erfolgen, doch zeigten sich *UBE2C* und *TOP2A/S4* dafür als besser geeignet.

4.2 Limitierende Faktoren dieser Arbeit

Das untersuchte Kollektiv ist relativ klein jedoch vergleichbar mit anderen, so dass die erhobenen Daten valide erscheinen. Auf Grund der Fallzahlen wurden die histologischen Subtypen „serös und endometrioid“ zusammengefasst, es kann somit keine Aussage für einzelne Histologien getroffen werden. Gegebenenfalls könnten die Daten an einem größeren Kollektiv, sowie mit mehr Fällen von *Low-grade*-Karzinomen und endometrioider Histologie, verifiziert werden. Die Nutzung von TMA ist eine etablierte Methode zur Bestimmung der Proteinexpression im Karzinomgewebe, wo laut Literaturangaben eine einzelne Gewebestanze von 0.6 mm zur Auswertung ausreicht [149, 207]. Die Nutzung von TMA könnte jedoch vor allem beim BOT problematisch sein, da das Gewebe heterogen ist und die untersuchten Bereiche sehr klein und nicht sicher repräsentativ für den ganzen Tumor sind. In dieser Arbeit wurden daher zur sicheren Datenerhebung jeweils drei Gewebestanzen ausgewertet und der ausgewählte Bereich zuvor vom Pathologen überprüft. Es wurden keine funktionellen Analysen der untersuchten Proteinmarker durchgeführt, so dass deren Anwendung als

therapeutische Targets nicht überprüft werden konnte. Die könnte jedoch Gegenstand von Folgestudien werden. Falls in der klinischen Anwendung am HE-Schnitt durch den Pathologen aktuell keine sichere Unterscheidung in *Low-* und *High-grade* erfolgen kann, so erfolgt eine immunhistochemische Kontrolle mittels *p53* Proteinexpression [156]. Dies hätte als interne Kontrolle zum Vergleich G1 versus G2/G3 zusätzlich erfolgen können, stattdessen wurde aber der in der klinischen Routine ebenfalls etablierte Proliferationsmarker *Ki-67* gewählt.

5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist noch immer das gynäkologische Malignom mit der höchsten Todesrate und neben den Karzinomen kommen im Ovar auch niedrigmaligne Borderline-Tumoren vor. Translationale Untersuchungen unterscheiden meist jedoch nicht zwischen einzelnen Subgruppen des Ovarialkarzinoms, was Aussagen zur Diagnostik, Verhalten und auf bestimmte Tumortypen abgestimmte Therapien schwierig macht. Bei den serösen Ovarialtumoren wurde bereits eine neue Einteilung in *Low-* und *High-grade* vorgenommen, welche ausschlaggebend für die weitere Therapie ist, wobei histopathologisch eine exakte Zuordnung zu einer Gruppe oft nicht sicher möglich ist. Aktuell wird deshalb nach relevanten Proteinmarkern zur Unterscheidung gesucht und es wurden bereits Gene identifiziert, die im geringgradig differenzierten Tumor hoch und im hochgradig differenzierten Tumor sowie Borderline-Tumor gering exprimiert sind. Diese Marker sollten jetzt an einem unabhängigen Kollektiv validiert werden, um herauszufinden, ob eine bereits auf RNA-Ebene gezeigte Überexpression eine Entsprechung auf Proteinebene hat und ob sie sich ggf. als therapeutische Targets bei *High-grade* Ovarialkarzinom eignen könnten. Von Interesse waren dabei: CCNB1, CDC2, MKI67, TOP2A, UBE2C sowie FASN. Beantwortet werden sollte vor allem die Frage, ob und in welchem Umfang sie auf Proteinebene exprimiert werden und ob sie *Low-* von *High-grade* trennen können. Es wurden dafür mittels Tissue Microarrays immunhistochemische Färbungen an 139 Ovarialkarzinomen, 20 Borderline- und 20 benignen Tumoren zur Erfassung der Proteinexpression durchgeführt und anschließend ausgewertet ob die Expression von "benigne versus Borderline-Tumor versus Karzinom" signifikant ist. Dann erfolgte die Betrachtung, ob mittels Kombinationsbestimmung der untersuchten Marker die Gruppe *Low-* von *High-grade* noch sicherer unterschieden werden kann. Es zeigte sich, dass die benignen Tumoren sich bis auf FASN von den Borderline-Tumoren und den Karzinomen abgrenzen lassen und sowohl *Low-* als auch *High-grade* eine homogene Gruppe darstellt. Die Fähigkeit *Low-* von *High-grade* zu trennen zeigt dabei jedoch eine absteigende Trennschärfe in folgender Reihenfolge: UBE2C - TOP2A - FASN - Ki-67 - CDC2 - CCNB1. Betrachtet man die Gruppen auch noch getrennt nach Grading, zeigt sich, dass CDC2, CCNB1 sowie FASN keine sichere Trennung von gering- und hochgradig differenzierten Tumoren gelingt, wohingegen dies UBE2C, TOP2A und Ki-67 sicher gelingt. Durch eine Kombinationsbestimmung der drei letzteren kann jedoch keine zusätzliche Information gewonnen werden. Es kann mit dieser Arbeit somit bestätigt werden, dass die auf RNA-Ebene identifizierte Überexpression von UBE2C, TOP2A, FASN, CCNB1, CDC2 und Ki-67 auch

auf Proteinebene nachweisbar ist. Innerhalb der Gruppe *Low-* und *High-grade* lassen sich keine Expressionsunterschiede nachweisen, was die neue Einteilung unterstützt. Die Marker sind jedoch nicht alle gleich gut geeignet, die oben genannten Gruppen voneinander zu trennen. Die höchste Trennschärfe zeigt UBE2C und eine Kombinationsbestimmung mit den anderen -in dieser Arbeit- untersuchten Markern ist nicht sinnvoll. Als therapeutische Targets könnten sich UBE2C, TOP2A, FASN, Cyclin B1 und CDC2 eignen und als Angriffspunkt von Medikamenten oder als Inhibitoren genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland 2007/2008*. 2012, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Berlin. p. 76-79.
2. Kohler, B.A., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(9): p. 714-36.
3. Gloeckler Ries, L.A., et al., *Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program*. Oncologist, 2003. **8**(6): p. 541-52.
4. Auranen, A., et al., *Borderline ovarian tumors in Finland: epidemiology and familial occurrence*. Am J Epidemiol, 1996. **144**(6): p. 548-53.
5. Trope, C. and J. Kaern, *Prognosis and management of borderline tumours of the ovary*. Curr Opin Obstet Gynecol, 1996. **8**(1): p. 12-6.
6. Benedet, J.L., et al., *FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology*. Int J Gynaecol Obstet, 2000. **70**(2): p. 207-312.
7. Edgar Petru, W.J., Daniel Fink, Ossi Köchli, *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. 2005, Berlin, Heidelberg: Springer.
8. Wong, H.F., et al., *Ovarian tumors of borderline malignancy: a review of 247 patients from 1991 to 2004*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(2): p. 342-9.
9. Ewald-Riegler, N., et al., *Borderline tumors of the ovary: clinical course and prognostic factors*. Onkologie, 2012. **35**(1-2): p. 28-33.
10. Fotopoulou, C., et al., *What are the individual perceptions of patients with borderline tumours of the ovary in regard to pathogenesis and prognosis? A structured survey on 60 women*. J Psychosom Obstet Gynaecol, 2010. **31**(4): p. 265-72.
11. Kaern, J., C.G. Trope, and V.M. Abeler, *A retrospective study of 370 borderline tumors of the ovary treated at the Norwegian Radium Hospital from 1970 to 1982. A review of clinicopathologic features and treatment modalities*. Cancer, 1993. **71**(5): p. 1810-20.
12. Chen, V.W., et al., *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
13. Jelovac, D. and D.K. Armstrong, *Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(3): p. 183-203.
14. Holschneider, C.H. and J.S. Berek, *Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors*. Semin Surg Oncol, 2000. **19**(1): p. 3-10.
15. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 255-88.
16. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?* Lancet, 1971. **2**(7716): p. 163.
17. Beral, V., et al., *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls*. Lancet, 2008. **371**(9609): p. 303-14.
18. Hankinson, S.E., et al., *Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. A prospective study*. JAMA, 1993. **270**(23): p. 2813-8.
19. Fleming, J.S., et al., *Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **247**(1-2): p. 4-21.
20. Brinton, L.A., et al., *Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(12): p. 2929-35.

21. Runnebaum, I.B. and E. Stickeler, *Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk*. J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(2): p. 73-9.
22. Kindelberger, D.W., et al., *Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(2): p. 161-9.
23. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm*. Hum Pathol, 2011. **42**(7): p. 918-31.
24. Prat, J., *Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features*. Virchows Arch, 2012. **460**(3): p. 237-49.
25. Meindl, A., et al., *Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(19): p. 323-30.
26. *John Hopkins Pathology. Ovarian Cancer: Information, Inspiration and Community. Diagnosis: Types of Tumors - Epithelial Cancer - Carcinoma*. 2012 [cited 2012 Sep 05]; Available from: <http://www.ovariancancer.jhmi.edu/malignantepithelial.cfm>.
27. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1511-8.
28. Singer, G., et al., *Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma*. Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1223-8.
29. Meinhold-Heerlein, I., et al., *Molecular and prognostic distinction between serous ovarian carcinomas of varying grade and malignant potential*. Oncogene, 2005. **24**(6): p. 1053-65.
30. Heintz, A.P., et al., *Carcinoma of the ovary*. Int J Gynaecol Obstet, 2003. **83 Suppl 1**: p. 135-66.
31. Bell, D.A. and R.E. Scully, *Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases*. Cancer, 1994. **73**(7): p. 1859-64.
32. Orsulic, S., et al., *Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 53-62.
33. Bauerschlag, D.O., et al., *The role of p53 as a surrogate marker for chemotherapeutical responsiveness in ovarian cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(1): p. 79-88.
34. Shepherd, J.H., *Revised FIGO staging for gynaecological cancer*. Br J Obstet Gynaecol, 1989. **96**(8): p. 889-92.
35. Heintz, A.P., et al., *Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer*. Int J Gynaecol Obstet, 2006. **95 Suppl 1**: p. S161-92.
36. Christian Wittekind, R.H., F. L. Greene, Martin Klimpfinger, L. H. Sobin, *TNM Atlas/Illustrated guide to the TNM Classification of Malignant Tumors. 5th Edition*. 2005, New York: John Wiley & Sons.
37. Meinhold-Heerlein, I., et al., *Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2015. **75**(10): p. 1021-1027.
38. Scully R.E, R.L.H., *Histological Typing of Ovarian Tumours*. WHO. World Health Organization. International Histological Classification of Tumours. 1999, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 136.
39. Seidman, J.D., et al., *The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin*. Int J Gynecol Pathol, 2004. **23**(1): p. 41-4.
40. Stern, R.C., et al., *Malignancy in endometriosis: frequency and comparison of ovarian and extraovarian types*. Int J Gynecol Pathol, 2001. **20**(2): p. 133-9.
41. Storey, D.J., et al., *Endometrioid epithelial ovarian cancer : 20 years of prospectively collected data from a single center*. Cancer, 2008. **112**(10): p. 2211-20.

42. Shimizu, Y., et al., *Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up.* *Cancer*, 1998. **82**(5): p. 893-901.
43. Vang, R., M. Shih Ie, and R.J. Kurman, *Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems.* *Adv Anat Pathol*, 2009. **16**(5): p. 267-82.
44. Trimble, C.L. and E.L. Trimble, *Management of epithelial ovarian tumors of low malignant potential.* *Gynecol Oncol*, 1994. **55**(3 Pt 2): p. S52-61.
45. Nayar, R., et al., *Microinvasion in low malignant potential tumors of the ovary.* *Hum Pathol*, 1996. **27**(6): p. 521-7.
46. Seidman, J.D. and R.J. Kurman, *Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators.* *Hum Pathol*, 2000. **31**(5): p. 539-57.
47. Meinhold-Heerlein, I., et al., *Die Heterogenität des Ovarialkarzinoms.* *Der Gynäkologe*, 2011. **44**(9): p. 708-716.
48. Ayhan, A., et al., *Recurrence and prognostic factors in borderline ovarian tumors.* *Gynecol Oncol*, 2005. **98**(3): p. 439-45.
49. Anfinan, N., et al., *Ten years experience in the management of borderline ovarian tumors at Tom Baker Cancer Centre.* *Arch Gynecol Obstet*, 2011. **284**(3): p. 731-5.
50. *International Federation of Gynecology and Obstetrics. Classification and staging of malignant tumors in the female pelvis.* *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1971. **50**: p. 1-7.
51. Serov SF, S.R., Sobin LH: *International histology of tumors (no. 9). Histological typing of ovarian tumours.* Geneva, Switzerland, World Health Organization, 1973.
52. Eltabbakh, G.H., P.R. Yadav, and A. Morgan, *Clinical picture of women with early stage ovarian cancer.* *Gynecol Oncol*, 1999. **75**(3): p. 476-9.
53. Goff, B.A., et al., *Ovarian carcinoma diagnosis.* *Cancer*, 2000. **89**(10): p. 2068-75.
54. *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Ovarian cancer: screening, treatment, and follow-up.* *Gynecol Oncol*, 1994. **55**(3 Pt 2): p. S4-14.
55. *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. [Online im Internet:] URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0351-abgelaufen.pdf AWMF online: „Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe“. AWMF-Leitlinien Register Nr. 032/035: Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. [Stand: 04.09.2012, 16:28].*
56. Bast, R.C., Jr., *Status of tumor markers in ovarian cancer screening.* *J Clin Oncol*, 2003. **21**(10 Suppl): p. 200s-205s.
57. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, Stand 02.07.2013, 15:23.*
58. Bristow, R.E., et al., *Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis.* *J Clin Oncol*, 2002. **20**(5): p. 1248-59.
59. du Bois, A., et al., *Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO).* *Cancer*, 2009. **115**(6): p. 1234-44.

60. Kim, A., et al., *Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2012. **31**: p. 14.
61. Gershenson, D.M., et al., *Serous borderline tumors of the ovary with noninvasive peritoneal implants*. Cancer, 1998. **83**(10): p. 2157-63.
62. Gershenson, D.M., et al., *Ovarian serous borderline tumors with invasive peritoneal implants*. Cancer, 1998. **82**(6): p. 1096-103.
63. Sehoul, J., et al., [*Conventional and experimental prognostic factors in ovarian cancer*]. Zentralbl Gynakol, 2004. **126**(5): p. 315-22.
64. Panici, P.B. and R. Angioli, *Role of lymphadenectomy in ovarian cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2002. **16**(4): p. 529-51.
65. Chi, D.S., et al., *Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 2001. **82**(3): p. 532-7.
66. Hauptmann, S. and M. Kobel, [*Prognostic factors in ovarian carcinoma*]. Verh Dtsch Ges Pathol, 2005. **89**: p. 92-100.
67. Dembo, A.J., et al., *Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer*. Obstet Gynecol, 1990. **75**(2): p. 263-73.
68. Aletti, G.D., et al., *Aggressive surgical effort and improved survival in advanced-stage ovarian cancer*. Obstet Gynecol, 2006. **107**(1): p. 77-85.
69. van der Burg, M.E., *Advanced ovarian cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2001. **2**(2): p. 109-18.
70. Trope, C.G., G. Kristensen, and A. Makar, *Surgery for borderline tumor of the ovary*. Semin Surg Oncol, 2000. **19**(1): p. 69-75.
71. Fajac, A., et al., *c-erbB2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis*. Int J Cancer, 1995. **64**(2): p. 146-51.
72. Wen, W.H., et al., *p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival*. Int J Gynecol Pathol, 1999. **18**(1): p. 29-41.
73. Rose, S.L., et al., *The impact of p53 protein core domain structural alteration on ovarian cancer survival*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(11): p. 4139-44.
74. Hefler, L.A., et al., *Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(2): p. 512-7.
75. Sinn, B.V., et al., *Vascular endothelial growth factor C mRNA expression is a prognostic factor in epithelial ovarian cancer as detected by kinetic RT-PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue*. Virchows Arch, 2009. **455**(6): p. 461-7.
76. Noske, A., et al., *An intracellular targeted antibody detects EGFR as an independent prognostic factor in ovarian carcinomas*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 294.
77. Kuhn, W., et al., *Urokinase (uPA) and PAI-1 Predict Survival in Advanced Ovarian Cancer Patients (FIGO III) after Radical Surgery and Platinum-Based Chemotherapy*. Gynecologic Oncology, 1994. **55**(3): p. 401-409.
78. Coticchia, C.M., et al., *Urinary MMP-2 and MMP-9 predict the presence of ovarian cancer in women with normal CA125 levels*. Gynecol Oncol, 2011. **123**(2): p. 295-300.
79. Denkert, C., et al., *Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma*. Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 893-903.
80. Li, W., et al., *Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on ovarian carcinoma in vivo*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(1): p. 668-81.
81. Kristiansen, G., et al., *CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival*. Am J Pathol, 2002. **161**(4): p. 1215-21.
82. Manzano, R.G., et al., *CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential*. Oncogene, 2002. **21**(28): p. 4435-47.

83. Sturgeon, C.M., et al., *National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers*. Clin Chem, 2008. **54**(12): p. e11-79.
84. *Human Protein Atlas*. [cited 2012 05 Apr]; Available from: https://www.proteinatlas.org/tissue#gene_information.
85. Su, V. and A.F. Lau, *Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(17): p. 2819-33.
86. van Ree, J.H., et al., *Overexpression of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UbcH10 causes chromosome missegregation and tumor formation*. J Cell Biol, 2010. **188**(1): p. 83-100.
87. Fujita, T., et al., *Overexpression of UbcH10 alternates the cell cycle profile and accelerate the tumor proliferation in colon cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 87.
88. Hao, Z., H. Zhang, and J. Cowell, *Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2C: molecular biology, role in tumorigenesis, and potential as a biomarker*. Tumour Biol, 2012. **33**(3): p. 723-30.
89. Berlingieri, M.T., et al., *UbcH10 expression may be a useful tool in the prognosis of ovarian carcinomas*. Oncogene, 2007. **26**(14): p. 2136-40.
90. Okamoto, Y., et al., *UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 4167-73.
91. Fujita, T., et al., *Clinicopathological relevance of UbcH10 in breast cancer*. Cancer Sci, 2009. **100**(2): p. 238-48.
92. Berlingieri, M.T., et al., *UbcH10 is overexpressed in malignant breast carcinomas*. Eur J Cancer, 2007. **43**(18): p. 2729-35.
93. Hellemans, P., et al., *Immunohistochemical study of topoisomerase II-alpha expression in primary ductal carcinoma of the breast*. J Clin Pathol, 1995. **48**(2): p. 147-50.
94. Wang, J.C., *Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 430-40.
95. Kruger, S., et al., *Protein expression and gene copy number analysis of topoisomerase 2alpha, HER2 and P53 in minimally invasive urothelial carcinoma of the urinary bladder--a multitissue array study with prognostic implications*. Anticancer Res, 2005. **25**(1A): p. 263-71.
96. Ho, D.M., et al., *MIB-1 and DNA topoisomerase II alpha could be helpful for predicting long-term survival of patients with glioblastoma*. Am J Clin Pathol, 2003. **119**(5): p. 715-22.
97. Schrader, C., et al., *Topoisomerase IIalpha expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome*. Leukemia, 2004. **18**(7): p. 1200-6.
98. Faggad, A., et al., *Topoisomerase IIalpha mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis*. Mod Pathol, 2009. **22**(4): p. 579-88.
99. Costa, M.J., et al., *Topoisomerase II alpha: prognostic predictor and cell cycle marker in surface epithelial neoplasms of the ovary and peritoneum*. Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**(3): p. 248-57.
100. Ferrandina, G., et al., *Prognostic role of topoisomerase-IIalpha in advanced ovarian cancer patients*. Br J Cancer, 2008. **98**(12): p. 1910-5.
101. Wakil, S.J., *Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme*. Biochemistry, 1989. **28**(11): p. 4523-30.
102. Liu, H., et al., *Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker*. Int J Biochem Mol Biol, 2010. **1**(1): p. 69-89.

103. Kusakabe, T., et al., *Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(5): p. 613-22.
104. Wang, Y., et al., *Two-site ELISA for the quantitative determination of fatty acid synthase*. Clin Chim Acta, 2001. **304**(1-2): p. 107-15.
105. Epstein, J.I., M. Carmichael, and A.W. Partin, *OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate*. Urology, 1995. **45**(1): p. 81-6.
106. Alo, P.L., et al., *Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients*. Cancer, 1996. **77**(3): p. 474-82.
107. Visca, P., et al., *Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(12): p. 4111-8.
108. Visca, P., et al., *Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma*. Anticancer Res, 2003. **23**(1A): p. 335-9.
109. Milgraum, L.Z., et al., *Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(11): p. 2115-20.
110. Menendez, J.A., et al., *Pharmacological and small interference RNA-mediated inhibition of breast cancer-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) synergistically enhances Taxol (paclitaxel)-induced cytotoxicity*. Int J Cancer, 2005. **115**(1): p. 19-35.
111. Gansler, T.S., et al., *Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival*. Hum Pathol, 1997. **28**(6): p. 686-92.
112. Menendez, J.A., R. Colomer, and R. Lupu, *Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity enhances vinorelbine (Navelbine)-induced cytotoxicity and apoptotic cell death in human breast cancer cells*. Oncol Rep, 2004. **12**(2): p. 411-22.
113. Browne, C.D., E.J. Hindmarsh, and J.W. Smith, *Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor*. FASEB J, 2006. **20**(12): p. 2027-35.
114. Zhou, W., et al., *Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7330-7.
115. Zhou, W., et al., *Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 2964-71.
116. Bauerschlag, D.O., et al., *Fatty acid synthase overexpression: target for therapy and reversal of chemoresistance in ovarian cancer*. J Transl Med, 2015. **13**: p. 146.
117. Cordon-Cardo, C., *Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia*. Am J Pathol, 1995. **147**(3): p. 545-60.
118. Hunt, T., *Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality*. Semin Cell Biol, 1991. **2**(4): p. 213-22.
119. Peter, M., et al., *In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase*. Cell, 1990. **61**(4): p. 591-602.
120. De Souza, C.P., K.A. Ellem, and B.G. Gabrielli, *Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events*. Exp Cell Res, 2000. **257**(1): p. 11-21.
121. Chae, S.W., et al., *Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications*. Yonsei Med J, 2011. **52**(3): p. 445-53.
122. Yang, J., et al., *Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3604-9.

123. Wang, A., et al., *Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers*. J Cancer Res Clin Oncol, 1997. **123**(2): p. 124-7.
124. Soria, J.C., et al., *Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4000-4.
125. Jin, Y.H. and C.K. Park, *Expression of cyclin B1 and cdc2 in nodal non-Hodgkin's lymphoma and its prognostic implications*. J Korean Med Sci, 2002. **17**(3): p. 322-7.
126. Winters, Z.E., et al., *Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21(WAF1/CIP1) in breast cancer. association with prognosis*. Eur J Cancer, 2001. **37**(18): p. 2405-12.
127. Hashiguchi, Y., et al., *Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian cancer patients*. Hum Pathol, 2004. **35**(2): p. 165-75.
128. Innocente, S.A., et al., *p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2147-52.
129. Ohta, T., et al., *T-loop deletion of CDC2 from breast cancer tissues eliminates binding to cyclin B1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21*. Cancer Res, 1998. **58**(6): p. 1095-8.
130. Enserink, J.M. and R.D. Kolodner, *An overview of Cdk1-controlled targets and processes*. Cell Div, 2010. **5**: p. 11.
131. Schwob, E., et al., *The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in S. cerevisiae*. Cell, 1994. **79**(2): p. 233-44.
132. Mendenhall, M.D. and A.E. Hodge, *Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1191-243.
133. Gannon, J.V., et al., *A measure of the mitotic index: studies of the abundance and half-life of p34cdc2 in cultured cells and normal and neoplastic tissues*. Genes Cells, 1998. **3**(1): p. 17-27.
134. Yasui, W., et al., *Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas*. Int J Cancer, 1993. **53**(1): p. 36-41.
135. Bidus, M.A., et al., *Prediction of lymph node metastasis in patients with endometrioid endometrial cancer using expression microarray*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(1): p. 83-8.
136. Shi, H.R. and R.T. Zhang, *[Expression and significance of P53, P21WAF1 and CDK1 proteins in epithelial ovarian cancer]*. Ai Zheng, 2009. **28**(8): p. 882-5.
137. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(3): p. 153-66.
138. Hassan, M., H. Sallam, and Z. Hassan, *The Role of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Early Drug Development with reference to the Cyclin-dependent Kinase (Cdk) Inhibitor - Roscovitine*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2011. **11**(2): p. 165-78.
139. Le, X.F., et al., *The role of p27(Kip1) in dasatinib-enhanced paclitaxel cytotoxicity in human ovarian cancer cells*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(18): p. 1403-22.
140. Gerdes, J., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. **133**(4): p. 1710-5.
141. McCormick, D., et al., *Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1*. Histopathology, 1993. **22**(4): p. 355-60.
142. Key, G., et al., *New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections*. J Clin Pathol, 1993. **46**(12): p. 1080-4.
143. Aune, G., et al., *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): p. 444-53.

144. Quintero, A., et al., *Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder*. J Clin Pathol, 2006. **59**(1): p. 83-8.
145. Nishimura, R., et al., *Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis*. World J Surg Oncol, 2011. **9**: p. 131.
146. Duchrow, M., et al., *Assessment of proliferative activity in colorectal carcinomas by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)*. Cancer Invest, 2001. **19**(6): p. 588-96.
147. Ali, A.E., et al., *Classifying B-cell non-Hodgkin lymphoma by using MIB-1 proliferative index in fine-needle aspirates*. Cancer Cytopathol, 2010. **118**(3): p. 166-72.
148. Yamashita, S., et al., *Ki-67 labeling index is associated with recurrence after segmentectomy under video-assisted thoracoscopic surgery in stage I non-small cell lung cancer*. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **17**(4): p. 341-6.
149. Torhorst, J., et al., *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2249-56.
150. Ramos-Vara, J.A., *Technical aspects of immunohistochemistry*. Vet Pathol, 2005. **42**(4): p. 405-26.
151. Paes, M.F., et al., *A retrospective analysis of clinicopathological and prognostic characteristics of ovarian tumors in the State of Espirito Santo, Brazil*. J Ovarian Res, 2011. **4**: p. 14.
152. Fotopoulou, C., et al., *Impact of obesity on operative morbidity and clinical outcome in primary epithelial ovarian cancer after optimal primary tumor debulking*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(9): p. 2629-37.
153. Harter, P., et al., *Pattern and clinical predictors of lymph node metastases in epithelial ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(6): p. 1238-44.
154. Braicu, E.I., et al., *Role of histological type on surgical outcome and survival following radical primary tumour debulking of epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancers*. Br J Cancer, 2011. **105**(12): p. 1818-24.
155. Kokawa, K., et al., *Clinical outcome and prognostic factors in borderline tumors of the ovary. Results from 17 years' experience in the Kinki District of Japan (1990-2006)*. Eur J Gynaecol Oncol, 2009. **30**(2): p. 155-61.
156. Hauptmann, S., du Bois, A., Meinhold-Herlein, I. et al. Pathologe (2014) 35: 497. doi:10.1007/s00292-014-1948-5, Der Pathologe, 2014.
157. Chen, S., et al., *Association of clinicopathological features with UbcH10 expression in colorectal cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(3): p. 419-26.
158. Han, S.S., et al., *[UbcH10 expression in hepatocellular carcinoma and its clinicopathological significance]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2011. **31**(2): p. 280-4.
159. Jazaeri, A.A., et al., *Molecular determinants of tumor differentiation in papillary serous ovarian carcinoma*. Mol Carcinog, 2003. **36**(2): p. 53-9.
160. Wagner, K.W., et al., *Overexpression, genomic amplification and therapeutic potential of inhibiting the UbcH10 ubiquitin conjugase in human carcinomas of diverse anatomic origin*. Oncogene, 2004. **23**(39): p. 6621-9.
161. Stegmeier, F., et al., *Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 876-81.
162. Townsley, F.M., et al., *Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2362-7.
163. Donato, G., et al., *Analysis of UbcH10 expression represents a useful tool for the diagnosis and therapy of astrocytic tumors*. Clin Neuropathol, 2008. **27**(4): p. 219-23.

164. Bavi, P., et al., *Bortezomib stabilizes mitotic cyclins and prevents cell cycle progression via inhibition of UBE2C in colorectal carcinoma*. Am J Pathol, 2011. **178**(5): p. 2109-20.
165. Rajkumar, T., et al., *Identification and validation of genes involved in cervical tumourigenesis*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 80.
166. Colak, D., et al., *Age-specific gene expression signatures for breast tumors and cross-species conserved potential cancer progression markers in young women*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63204.
167. Walker, G., et al., *Estrogen-regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2007. **106**(3): p. 461-8.
168. Rawat, A., et al., *Inhibition of ubiquitin conjugating enzyme UBE2C reduces proliferation and sensitizes breast cancer cells to radiation, doxorubicin, tamoxifen and letrozole*. Cell Oncol (Dordr), 2013. **36**(6): p. 459-67.
169. Sabitha, K. and T. Rajkumar, *Identification of small molecule inhibitors against UBE2C by using docking studies*. Bioinformation, 2012. **8**(21): p. 1047-58.
170. Malhotra, S., et al., *A tri-marker proliferation index predicts biochemical recurrence after surgery for prostate cancer*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20293.
171. Tokiniwa, H., et al., *Topoisomerase II alpha expression and the Ki-67 labeling index correlate with prognostic factors in estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor type-2-negative breast cancer*. Breast Cancer, 2011.
172. Bonatz, G., et al., *Immunohistochemical assessment of p170 provides prognostic information in endometrial carcinoma*. Histopathology, 1999. **34**(1): p. 43-50.
173. Larsen, A.K., et al., *DNA topoisomerases as repair enzymes: mechanism(s) of action and regulation by p53*. Acta Biochim Pol, 1998. **45**(2): p. 535-44.
174. McPherson, J.P. and G.J. Goldenberg, *Induction of apoptosis by deregulated expression of DNA topoisomerase IIalpha*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4519-24.
175. Cunha, I.W., et al., *Identification of genes associated with local aggressiveness and metastatic behavior in soft tissue tumors*. Transl Oncol, 2010. **3**(1): p. 23-32.
176. Menendez, J.A., L. Vellon, and R. Lupu, *DNA topoisomerase IIalpha (TOP2A) inhibitors up-regulate fatty acid synthase gene expression in SK-Br3 breast cancer cells: in vitro evidence for a 'functional amplicon' involving FAS, Her-2/neu and TOP2A genes*. Int J Mol Med, 2006. **18**(6): p. 1081-7.
177. Stuart, J.E., et al., *Identification of gene markers associated with aggressive meningioma by filtering across multiple sets of gene expression arrays*. J Neuropathol Exp Neurol, 2011. **70**(1): p. 1-12.
178. Wang, J., et al., *TOP2A amplification in breast cancer is a predictive marker of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy efficacy*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **135**(2): p. 531-7.
179. Liang, Z.Y., et al., *[Topoisomerase IIalpha and HER2/neu gene alterations and their correlation in pancreatic ductal adenocarcinomas]*. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2007. **36**(2): p. 102-6.
180. Nair, S.V., Ziaullah, and H.P. Rupasinghe, *Fatty acid esters of phloridzin induce apoptosis of human liver cancer cells through altered gene expression*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107149.
181. Chekerov, R., et al., *Altered expression pattern of topoisomerase IIalpha in ovarian tumor epithelial and stromal cells after platinum-based chemotherapy*. Neoplasia, 2006. **8**(1): p. 38-45.
182. Lawrenson, K., et al., *Identification of novel candidate biomarkers of epithelial ovarian cancer by profiling the Secretomes of three-dimensional genetic models of ovarian carcinogenesis*. Int J Cancer, 2014.

183. Sehdev, A.S., et al., *Serous tubal intraepithelial carcinoma upregulates markers associated with high-grade serous carcinomas including Rsf-1 (HBXAP), cyclin E and fatty acid synthase*. *Mod Pathol*, 2010. **23**(6): p. 844-55.
184. Liu, Z.L., et al., *Fatty acid synthase expression in osteosarcoma and its correlation with pulmonary metastasis*. *Oncol Lett*, 2012. **4**(5): p. 878-882.
185. Sadowski, M.C., et al., *The fatty acid synthase inhibitor triclosan: repurposing an anti-microbial agent for targeting prostate cancer*. *Oncotarget*, 2014. **5**(19): p. 9362-81.
186. Ueda, S.M., et al., *Expression of Fatty Acid Synthase Depends on NAC1 and Is Associated with Recurrent Ovarian Serous Carcinomas*. *J Oncol*, 2010. **2010**: p. 285191.
187. Pizer, E.S., et al., *Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer*. *Cancer Res*, 1996. **56**(6): p. 1189-93.
188. Aaltonen, K., et al., *High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer*. *Br J Cancer*, 2009. **100**(7): p. 1055-60.
189. Kushner, J., et al., *Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 1999. **28**(2): p. 77-81.
190. Tamura, R.E., et al., *GADD45 proteins: central players in tumorigenesis*. *Curr Mol Med*, 2012. **12**(5): p. 634-51.
191. Li, Y., et al., *Adenoviral-mediated gene transfer of Gadd45a results in suppression by inducing apoptosis and cell cycle arrest in pancreatic cancer cell*. *J Gene Med*, 2009. **11**(1): p. 3-13.
192. Yang, G., et al., *CXCR2 promotes ovarian cancer growth through dysregulated cell cycle, diminished apoptosis, and enhanced angiogenesis*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(15): p. 3875-86.
193. Hong, J.Y., et al., *Anti-proliferative effects of evodiamine in human lung cancer cells*. *J Cancer Prev*, 2014. **19**(1): p. 7-13.
194. Egloff, A.M., L.A. Vella, and O.J. Finn, *Cyclin B1 and other cyclins as tumor antigens in immunosurveillance and immunotherapy of cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(1): p. 6-9.
195. Liu, W., et al., *Detection of autoantibodies to multiple tumor-associated antigens (TAAs) in the immunodiagnosis of breast cancer*. *Tumour Biol*, 2014.
196. Tsaour, I., et al., *The cdk1-cyclin B complex is involved in everolimus triggered resistance in the PC3 prostate cancer cell line*. *Cancer Lett*, 2011. **313**(1): p. 84-90.
197. Li, B., et al., *Chaetoglobosin K induces apoptosis and G2 cell cycle arrest through p53-dependent pathway in cisplatin-resistant ovarian cancer cells*. *Cancer Lett*, 2014.
198. Lee, Y.H., et al., *Significance of cell cycle regulatory proteins as malignant and prognostic biomarkers in ovarian epithelial tumors*. *Int J Gynecol Pathol*, 2011. **30**(3): p. 205-17.
199. Scott, I.S., et al., *A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens*. *Br J Cancer*, 2004. **90**(8): p. 1583-90.
200. Goga, A., et al., *Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC*. *Nat Med*, 2007. **13**(7): p. 820-7.
201. Ross, J.S., et al., *Comprehensive genomic profiling of epithelial ovarian cancer by next generation sequencing-based diagnostic assay reveals new routes to targeted therapies*. *Gynecol Oncol*, 2013. **130**(3): p. 554-9.
202. Kumar, S.K., et al., *Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single agent activity in patients with relapsed multiple myeloma*. *Blood*, 2014.
203. Nishimura, R., et al., *Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis*. *Breast Cancer*, 2010. **17**(4): p. 269-75.

204. Heeran, M.C., et al., *Prognostic value of tissue protein expression levels of MIB-1 (Ki-67) in Danish ovarian cancer patients. From the 'MALOVA' ovarian cancer study.* APMIS, 2013. **121**(12): p. 1177-86.
205. Hui, D., et al., *Immunohistochemical detection of cdc2 is useful in predicting survival in patients with mantle cell lymphoma.* Mod Pathol, 2005. **18**(9): p. 1223-31.
206. Marinas, M.C., et al., *EGFR, HER2/neu and Ki67 immunoexpression in serous ovarian tumors.* Rom J Morphol Embryol, 2012. **53**(3): p. 563-7.
207. Hecht, J.L., et al., *Validation of tissue microarray technology in ovarian cancer: results from the Nurses' Health Study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(11): p. 3043-50.

7 Danksagung

Zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, welchen ich zu tiefem Dank verpflichtet bin. Vor allem da sie immer an das, doch noch erfolgreiche Entstehen, dieser langwierigen Arbeit geglaubt haben:

Prof. Dr. Norbert Arnold und Prof. Dr. Nicolai Maass danke ich für die Nutzung des onkologischen Labors in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UK-SH, Campus Kiel und die großzügige Versorgung mit allen benötigten Labormaterialien und Geräten. Als dortiger Mitarbeiterin danke ich Sigrid Haman für die ersten Einweisungen in die Welt der Forschung und die Hilfestellung, bei allen im Labor auftretenden Fragen, sowie die Perfektionierung meiner „Kochrezepte“.

Dem pathologischen Institut des UK-SH, Campus Kiel danke ich für die Bereitstellung der verwendeten Gewebeproben. Dabei danke ich dort speziell Katharina Balschun für die kompetente Beratung bei der Erstellung der TMA und die unermüdliche Betreuung der immunhistochemischen Färbungen sowie ihrer Auswertung.

Ganz besonders danke ich jedoch Prof. Dr. Ivo Meinhold-Heerlein für das spannende Thema und die jahrelange Betreuung der gesamten Arbeit. Die tolle Betreuung auch über den Atlantik hinweg bis nach San Francisco: Ivo, ohne dich hätte ich es nie geschafft!

Und zum Schluss gebührt der größte Dank meinen Eltern, meiner Oma und meinem Ehemann Christoph, welche immer für mich da sind und mich bei allen Zielen im Leben unterstützen.