**Aus dem Pathologischen Institut**
**der Ludwig-Maximilians-Universität München**
**Direktor: Professor Dr. T. Kirchner**

# Her-2/neu-, Topoisomerase IIα- und ErbB1-Genaberrationen als prädiktive Marker beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom – Umfassende retrospektive Analyse mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) und der Immunhistochemie (IHC) an Tissue Microarrays

**Dissertation**
**zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin**
**an der Medizinischen Fakultät der**
**Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von**

**Judith Boda**

**aus Regensburg**

**2009**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Priv. Doz. Dr. Doris Mayr |
| Mitberichterstatter: | Priv. Doz. Dr. Ursula Strobl<br>Priv. Doz. Dr. Christian Schindlbeck |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 25.05.2009 |

*Meinen Eltern*

INHALTSVERZEICHNIS


***1 Einleitung ..... 1***

**1.1. Ovarialtumoren ..... 1**

*1.1.1 Epidemiologie ..... 1*

*1.1.2 Histiogenese und Ätiologie von Ovarialkarzinomen ..... 2*

**1.2 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms .. 3**

**1.3 Tumorausbreitung ..... 7**

**1.4 Klinik ..... 8**

*1.4.1 Symptome ..... 8*

*1.4.2 Diagnostik und Prognosefaktoren ..... 8*

*1.4.3 Therapie ..... 9*

**1.5 Her-2 und EGFR: Zwei Rezeptoren der ErbB Familie ..... 10**

**1.6 Topoisomerase IIα ..... 12**

**1.7 Fragestellung ..... 14**

***2 Material und Methoden ..... 15***

**2.1 Materialien und Bezugsquellen ..... 15**

*2.1.1 Auswahl der Patientinnen ..... 15*

*2.1.2 Geräte ..... 15*

*2.1.3 Verbrauchsmaterial ..... 16*

*2.1.4 Chemikalien ..... 17*

*2.1.5 Färbe-/Hybridisierungs-Kits ..... 18*

**2.2 Stanzen der Tissue Microarray Blöcke ..... 19**

*2.2.1 Lagepläne ..... 19*

*2.2.2 Das Stanzen ..... 19*

*2.2.3 Systematik der Originalblöcke ..... 21*

**2.3 Schneiden der Blöcke ..... 22**

**2.4 Immunhistochemische Tests ..... 23**

*2.4.1 Der Her-2-Test* ... *23*
*2.4.2 Der Topoisomerase IIα-Test* ... *23*
*2.4.3 Der EGFR-Test* ... *24*
**2.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung** ... **24**
*2.5.1 Entparaffinierung* ... *24*
*2.5.2 Vorbehandlung der Präparate* ... *24*
*2.5.3 Proteasebehandlung* ... *24*
*2.5.4 Denaturierung und Hybridisierung mit der Her2/neu-Sonde* ... *25*
*2.5.5 Waschung und Detektion* ... *25*
*2.5.6 Problematisches Material aus der Frauenklinik* ... *26*
**2.6 Auswertungen** ... **26**
*2.6.1 HE-Schnitte* ... *26*
*2.6.2 Immunhistochemische Tests* ... *26*
*2.6.3 FISH* ... *28*
2.6.3.1 Verwendete Sonden ... 28
2.6.3.2 Vorgehen und Auswertungskriterien ... 29
*2.6.3.2.1 Beurteilung der Her-2/neu-Sonde* ... *30*
*2.6.3.2.2 Beurteilung der Topoisomerase IIα-Sonde* ... *32*
*2.6.3.2.3 Beurteilung der EGFR-Sonde* ... *32*
*2.6.4 Statistische Auswertung* ... *33*
***3 Ergebnisse*** ... ***34***
**3.1 Tissue Microarrays** ... **34**
**3.2 Tumorgehalt der einzelnen Stanzen und Verlust von Stanzenmaterial** ... **34**
**3.3 Auswertbarkeit der Untersuchungen** ... **36**
**3.4 Ergebnisse der Immunhistochemie** ... **37**
*3.4.1 Her-2-Test* ... *37*
*3.4.2 Topoisomerase IIα-Test* ... *38*
*3.4.3 EGFR-Test* ... *38*
**3.5 Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung** ... **38**
*3.5.1 Her-2/neu* ... *38*
*3.5.2 Topoisomerase IIα* ... *40*
*3.5.3 ErbB1* ... *41*

**3.6 Vergleich der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen ..... 42**
*3.6.1 Her-2/neu und Topoisomerase IIα ..... 42*
*3.6.2 Her-2/neu und ErbB1 ..... 43*
*3.6.3 Topoisomerase IIα und ErbB1 ..... 43*
**3.7 Vergleich zwischen Proteinexpression und Genaberration ..... 44**
*3.7.1 Her-2 und Her-2/neu ..... 44*
*3.7.2 Topoisomerase IIα ..... 45*
*3.7.3 EGFR und ErbB1 ..... 47*
**3.8 Überleben ..... 47**
*3.8.1 Korrelation zwischen IHC-Ergebnissen und der Überlebensdauer ..... 48*
3.8.1.1 Her-2 und das Überleben ..... 48
3.8.1.2 Topoisomerase IIα und das Überleben ..... 50
3.8.1.3 EGFR und das Überleben ..... 52
*3.8.2 Korrelation zwischen FISH-Ergebnissen und der Überlebensdauer ..... 54*
3.8.2.1 Her-2/neu und das Überleben ..... 54
3.8.2.2 Topoisomerase IIα und das Überleben ..... 56
3.8.2.3 ErbB1 und das Überleben ..... 58
***4 Diskussion ..... 61***
**4.1 Gen- und Chromosomenaberrationen beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom ..... 62**
*4.1.1 Häufigkeit der Her-2/neu-Gen- und Chromosomenaberration ..... 62*
*4.1.2 Häufigkeit der Topoisomerase IIα-Gen- und Chromosomenaberration ..... 65*
*4.1.3 Häufigkeit der ErbB1-Gen- und Chromosomenaberrationen ..... 67*
**4.2 Vergleich der Häufigkeiten der FISH-positiven Her-2/neu-, Topoisomerase IIα- und ErbB1-Untersuchungen ..... 68**
**4.3 Koamplifikationen ..... 69**
*4.3.1 Koamplifikationen zwischen Her-2/neu und Topoisomerase IIα ..... 69*
*4.3.2 Koamplifikationen zwischen Her-2/neu und ErbB1 ..... 70*
*4.3.3 Koamplifikationen zwischen Topoisomerase IIα und ErbB1 ..... 71*
**4.4 Topoisomerase IIα-Deletion ..... 71**
**4.5 Gegenüberstellung der IHC und der FISH ..... 72**
*4.5.1 Der Her-2-Rezeptor und Her-2/neu ..... 72*

*4.5.2 Topoisomerase IIα ..... 75*
*4.5.3 EGFR und ErbB1 ..... 77*
**4.6 Korrelation zwischen Proteinexpression bzw. Genaberrationen und dem Überleben ..... 78**
**4.7 Schlussfolgerung ..... 82**
***5 Zusammenfassung ..... 84***
***6 Literaturverzeichnis ..... 87***
***7 Danksagung ..... 99***
***8 Lebenslauf ..... 100***
***9 Anhang ..... 101***

# 1 Einleitung

## 1.1. Ovarialtumoren

### *1.1.1 Epidemiologie*

Das Ovarialkarzinom ist die am häufigsten tödlich verlaufende Tumorerkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane und mit anderen Krebserkrankungen des Ovars die fünft-häufigste Tumorerkrankung der Frau in Deutschland nach Brust-, Darm-, Lungen- und Gebärmutterkörperkrebs (Deutsche Krebsgesellschaft e. V. 2007, Remmele et al. 1997). Jährlich erkranken ca. 9.660 Frauen an Ovarialtumoren, die 4,7 % der bösartigen Neubildungen der Frau ausmachen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2008). Im Jahr 2006 starben 5.636 Patientinnen alleine in der Bundesrepublik durch diese bösartigen Neubildungen (Statistisches Bundesamt 2008). Da eine Erkrankung zunächst symptomlos verläuft und keine ausreichenden Screeningverfahren vorhanden sind, wird bei ca. 75 % der Patientinnen ein Ovarialkarzinom erst im FIGO-Stadium III diagnostiziert, wenn es meist nur noch palliativ behandelbar ist. 60 % Heilungschance sind in Stadium I und II gegeben. In Stadium III liegt diese nur mehr bei ca. 10 % (Remmele et al. 1997). Betrachtet man die Gruppe von Patientinnen im FIGO-Stadium III isoliert, so fällt auf, dass trotz gleichen Tumorstadiums und gleicher Therapie Unterschiede bezüglich der Überlebensdauer zu beobachten sind (Goff et al. 1998, Kaern et al. 2005).

Momentan liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Ovarialkarzinome bei 47 %, was eine nur leichte Verbesserung gegenüber den vergangenen Jahren darstellt. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 67 bis 68 Jahren (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2008). Interessant ist, dass geographische Unterschiede bei der Häufigkeit des Auftretens von Ovarialkrebs bestehen. So ist die Inzidenz in China viel geringer als in den meisten westlichen Ländern. In Shanghai erkranken 5,0 von 100.000 Frauen und in San Francisco Bay Area 12,9 von 100.000 (Chen et al. 1992).

Die oben aufgeführten Zahlen machen deutlich, dass sowohl bei der Früherkennung, als auch bei den Therapiemöglichkeiten dringend Fortschritte nötig sind.

### *1.1.2 Histiogenese und Ätiologie von Ovarialkarzinomen*

Epitheliale Tumoren des Ovars entstehen durch eine autonome Proliferation des Oberflächenepithels, dem sog. Müller-Deckepithel und bilden mit 65-75 % die größte Gruppe der Ovarialtumoren. Die Proliferationen können oberflächlich als papilläre Läsion auftreten, die Mehrzahl der Läsionen findet sich jedoch in Einschlußzysten.

Histogenetisch stammt das Epithel des Ovars, der Tube, des Uterus und der Zervix vom Zölomepithel des paramesonephrischen Ganges ab. Man geht davon aus, dass die verschiedenen zytologischen Differenzierungen von Ovarialkarzinomen (serös, muzinös, endometrioid, klarzellig oder Brenner-typisch) durch die sog. Transmutabilität zustande kommen, d.h. durch die Mutation des pluripotenten Zölomepithels (Remmele et al. 1997).

Die Ätiologie von Ovarialkarzinomen ist weitgehend unklar. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken mit hormonellen Einflüssen einher geht. So werden eine frühe erste Regelblutung und ein spätes Einsetzen der Wechseljahre mit einem signifikant erhöhten Risiko verbunden. Fortwährende Eisprünge und die dazu gehörige Wundheilung vergrößern die Wahrscheinlichkeit der genetischen Instabilität und können anschließend zur Mutagenese führen (Tung et al. 2004). Auch eine Hormonersatztherapie nach der Menopause erhöht das Risiko an einem Ovarialtumor zu erkranken (Pike et al. 2004). Dagegen wirken sich ovulationshemmende Faktoren, wie die Einnahme oraler Kontrazeptiva, Schwangerschaft und Stillzeit risikoverringernd aus. Da die Zahl der Eisprünge mit dem Alter abnimmt, profitieren v.a. junge Frauen unter 20 Jahren von der ovulationshemmenden Wirkung der Pille und damit von der Senkung des Erkrankungsrisikos (Tung et al. 2004). Gebärt eine Frau nach dem 35. Lebensjahr reduziert sich ihr Ovarialtumor Risiko um 51 %, jede weitere Geburt (auch frühere) senkt das Risiko noch weiter (Pike et al. 2004).

Ca. 10 % der Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt; bei familiärer Belastung besteht eine zwanzigmal höhere Wahrscheinlichkeit für Verwandte ersten Grades, also Töchter oder Schwestern der Erkrankten, selbst einen Ovarialtumor zu entwickeln (Interdisziplinäre S2k-Leitlinie 2007, Remmele et al. 1997, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2008).

### 1.2 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms

Innerhalb der Ovarialtumoren gibt es mehrere histologische Gruppen. Die neueste histologische Klassifikation der Ovarialtumoren der WHO stammt von 2003 (Tavassoli et Devilee). Ihre Einteilung erfolgt nach dem Ursprung der abnorm proliferierenden Zellen in drei große Untergruppen. Die epithelial-stromalen Oberflächentumoren umfassen die serösen, muzinösen, endometrioiden, Klarzell-, Transitionalzell-, squamösen, epithelialen Mischtypen und undifferenzierten Tumoren sowie unklassifizierte Tumoren. Davon werden u.a. die Keimstrangstromaltumoren abgegrenzt, worunter man die Granulosazelltumoren, die Sertolizelltumoren, die Keimstrangstromaltumoren vom Misch- oder unklassifizierten Zelltyp und die Steroidzelltumoren zusammenfasst. Als dritte Untergruppe sind die Keimzelltumoren zu nennen.

In den drei Gruppen werden außerdem benigne, borderline und maligne Varianten unterschieden. Die Gruppe der Borderlinetumoren umfasst Tumoren, die durch atypische Proliferationen charakterisiert sind, aber kein infiltratives Wachstum zeigen.

Da im Rahmen dieser Dissertation nur epitheliale Tumoren untersucht wurden, folgt die WHO-Einteilung der Oberflächenepithel-Stromatumoren:

**A) Seröse Tumoren**

*a) Benigne*

- Zystadenom
- Papilläres Zystadenom
- Oberflächenpapillom
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

*b) Borderlinetumoren*

- Papillär-zystischer Tumor
- Oberflächlich-papillärer Tumor
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

*c) Maligne*

- Adenokarzinom
- Oberflächlich-papilläres Adenokarzinom

- Adenokarzinofibrom (malignes Adenofibrom)

**B) Muzinöse Tumoren**

*a) Benigne*

- Zystadenom
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

*b) Borderlinetumoren*

- Intestinaler Typ
- Endozervikaler Typ

*c) Maligne*

- Adenokarzinom
- Adenokarzinofibrom (malignes Adenofibrom)

*d) Muzinös zystischer Tumor mit Wandknoten*

*e)* Muzinös zystischer Tumor mit Pseudomyxoma peritonei

**C) Endometrioide Tumoren mit squamös differenzierten Varianten**

*a) Benigne*

- Zystadenom
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

*b) Borderlinetumoren*

- Zystischer Tumor
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

*c) Maligne*

- Adenokarzinom, ohne anderweitige Spezifizierung
- Adenokarzinofibrom (malignes Adenofibrom)
- Maligner Müllerscher Mischtumor (Karzinosarkom)
- Adenosarkom
- Endometrioides Stromasarkom
- Undifferenziertes Ovarialsarkom

**D) Klarzelltumoren**

*a) Benigne*

- Zystadenom
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

*b) Borderlinetumoren*

- Zystischer Tumor
- Adenofibrom und Zystadenofibrom

*c) Maligne*

- Adenokarzinom
- Adenokarzinofibrom (malignes Adenofibrom)

**E) Transitional-Zelltumoren**

*a) Benigne*

- Brenner-Tumor
- metaplastische Variante

*b) Borderlinetumor*

- Borderline Brenner-Tumor
- proliferierende Variante

*c) Maligne*

- Transitional-Zellkarzinom (Nicht-Brenner-Typ)
- Maligner Brenner-Tumor

**F) Squamöse Tumoren**

*a) Squamöses Karzinom*

*b) Epidermoidzyste*

**G) Epitheliale Mischtumoren**

*a) Benigne*

*b) Borderlinetumoren*

*c) Maligne*

**H) Undifferenzierte und unklassifizierte Tumoren**

*a) Undifferenziertes Karzinom*

*b) Anderweitig nicht spezifiziertes Adenokarzinom*

Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem FIGO-System (Fédération Internationale de Gynécologie et d`Obstétrique) oder nach dem TNM-System der UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Die Abkürzung T steht hierbei für Tumor, N für Nodulus (Lymphknoten) und M für Metastase. Das TNM-Schema ist tumor- und lokalisationsbezogen; dies bedeutet, dass z.B. die Klassifikationen für Ovarialkarzinome und Mundhöhlenkarzinome unterschiedlich sind. Das FIGO-System und das TNM-System für Ovarialkarzinome decken sich größtenteils (s. Tab. 1).

Tab. 1 : Einteilung der Tumorstadien nach dem FIGO- und TNM-System (Tavassoli et Devilee 2003)

| TNM | FIGO | Kriterien |
|---|---|---|
| **Tx** | | **Primärtumor nicht beurteilbar** |
| **T0** | | **Kein Anhalt für Primärtumor** |
| **T1** | **I** | **Tumor auf die Ovarien beschränkt** |
| T1a | IA | Tumor in einem Ovar, Kapsel intakt, keine Aszites |
| T1b | IB | Tumor in beiden Ovarien, Kapsel intakt |
| T1c | IC | Tumor in einem oder beiden Ovarien, Kapselruptur, Tumor an der Oberfläche, maligne Zellen in der Peritoneallavage oder im Aszites |
| **T2** | **II** | **Tumor auf das Becken beschränkt** |
| T2a | IIA | Befall von Uterus und / oder Tuben, ohne Aszites |
| T2b | IIB | Befall anderer Beckengewebe, ohne Aszites |
| T2c | IIC | Befall von Beckenorganen, maligne Zellen in der Peritoneallavage oder im Aszites |
| **T3** | **III** | **Tumor in einem oder beiden Ovarien, peritoneale Metastasen und / oder regionäre Lymphknotenmetastasen** |
| T3a | IIIA | mikroskopische peritoneale Metastasen |
| T3b | IIIB | makroskopische peritoneale Metastasen < 2cm |

| | | |
|---|---|---|
| T3c | IIIC | Metastasen > 2cm und / oder regionäre Lymphknotenmetastasen |
| **M1** | **IV** | **Fernmetastasen** (Lunge, Leber, Skelett, ZNS) außerhalb der Bauchhöhle |
| **N0** | | kein Anhalt für Befall der regionären Lymphknoten |
| **N1** | | Befall regionärer Lymphknoten |

Weiterhin werden Ovarialkarzinome nach dem histopathologischen Grading (G) in 5 Gruppen eingeteilt:

GX: Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
GB: Borderline-Malignität
G1: gut differenziert
G2: mäßig differenziert
G3-4: schlecht differenziert/undifferenziert

Internationale Einigkeit über spezielle Regeln zum Grading bei Ovarialkarzinomen besteht jedoch nicht (Silverberg 2000, Scully 1999, Scully et al. 1996). Ein besonders strittiger Punkt ist, ob man ein einheitliches Grading für alle histologischen Typen anwendet, oder ob man je nach Tumortyp unterschiedlich verfahren sollte (Silva et Gershenson 1998).

### 1.3 Tumorausbreitung

Maligne Ovarialtumoren breiten sich bevorzugt im Peritonealraum oder über die Lymphbahnen aus. Selten ist die hämatogene Metastasierung (Trastour et al. 2004).
Auf dem intraperitonealen Weg gelangen die Tumorzellen im Allgemeinen in den Douglasraum, den parakolischen Raum, zur Leberkapsel, zur Serosa des Darms, zum Mesenterium und Omentum. Meist bleiben die Metastasen auf den peritonealen Raum begrenzt. Es kommen jedoch, wenn auch seltener, Metastasen in retroperitonealen Organen und in weiter entfernten Regionen, wie dem Gehirn vor (Aydin et al. 2008). Auf dem lymphatischen Weg metastasiert das Ovarialkarzinom ins Becken und in die paraaortalen Lymphknoten, von denen aus letztendlich auch die retroperitonealen Lymphknoten erreicht werden können (Kamura T. et Jeon J. D. 2002).

## 1.4 Klinik

### *1.4.1 Symptome*

Leider sind epitheliale Ovarialtumoren im Frühstadium symptomarm. Erst bei fortgeschrittenen Läsionen treten Beschwerden auf, die selbst dann noch oft verkannt werden. Die Patientinnen nehmen die Symptome nicht ernst, weil sie intermittierend auftreten oder weil sie sie in Zusammenhang mit dem Alter oder der Menopause setzen (Olsen et al. 2007). Typische (Spät-)Symptome, die beachtet werden müssen sind eine Zunahme des Leibesumfanges ohne Gewichtszunahme, gastrointestinale Symptome, wie Dyspepsie, Übelkeit, Krämpfe und Durchfälle sowie allgemeine Müdigkeit und Erschöpfung. Außerdem können Schmerzen im kleinen Becken und abnormale, unregelmäßige uterine Blutungen auftreten (Deutsche Krebsgesellschaft e. V. 2007, Remmele et al. 1997).

### *1.4.2 Diagnostik und Prognosefaktoren*

Goldstandard unter den bildgebenden Verfahren zur Diagnostik des Ovarialkarzinoms ist die Transvaginalsonographie. Die Morphologie einer Läsion (Zystengröße, Wanddicke, Septen, solide Anteile) wird hierbei zur Beurteilung der Dignität herangezogen. Dennoch ist die Wahrscheinlichkeit einer Früherkennung trotz regelmäßiger Vaginalsonographie und Bestimmung des Tumormarkers CA 125 gering, weswegen ein generelles Screening momentan nicht empfohlen wird. D.h. ein zuverlässiges Staging kann nur intraoperativ erfolgen, die Diagnosesicherung pathohistologisch intraoperativ oder im Anschluss. Oft ist die Untersuchung des Resektates mit hohem Aufwand verbunden, da viele Ovarialtumoren außerordentlich heterogen aufgebaut sind. Der histologische Subtyp ist jedoch für das Überleben der Patientinnen ein prognostischer Parameter. Klarzellige und muzinöse Ovarialkarzinome haben nicht nur eine ungünstigere Prognose als serös-papilläre und endometrioide Tumoren, sondern sie sprechen auch schlechter auf die konventionelle Chemotherapie an. Wichtigste Prognosefaktoren sind das Tumorstadium und der postoperative Tumorrest. Außerdem spielen das Alter der Patientin, ihr Allgemeinzustand, sowie die Aszitesmenge eine prognostische Rolle (Interdisziplinäre S2k Leitlinie 2007, Tumorzentrum Südost-Niedersachsen 2006).

### *1.4.3 Therapie*

Es erfolgt stets eine operative Therapie, deren Ausmaß sich nach dem Tumorstadium richtet. Der Zugang erfolgt über eine Längsschnittlaparatomie. Zu entfernen sind der Uterus, die Adnexen beidseits, sowie die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten. Nur im FIGO-Stadium IA mit Grading 1 ist noch eine fertilitätserhaltende Tumorentfernung möglich. Außerdem erfolgen eine Asservierung des Aszites, eine Peritoneallavage und die manuelle Exploration des gesamten Bauchraums. Bei fortgeschritteneren Ovarialkarzinomen kommt es im Rahmen einer Radikaloperation auch zur Resektion des infragastrischen Netzes, des Peritoneums und infiltrierter Dick-/Dünndarmanteile sowie zur Appendektomie. Ziel ist stets eine vollständige Tumorentfernung, die jedoch nicht immer erreicht werden kann. In solch einem Fall versucht man den Tumor auf eine Größe unter 1 cm zu reduzieren.

Nur in Stadium IA Grad 1 ist keine adjuvante Chemotherapie nötig. Bis zum Stadium IIA wird den Patientinnen eine platinhaltige Chemotherapie in 3-6 Zyklen verabreicht. Dies verringert das Risiko des Rezidivs und eine längere Gesamtüberlebensdauer kann erreicht werden. In den FIGO-Stadien IIB bis IV werden 6 Zyklen einer platin- und taxanhaltigen Chemotherapie durchlaufen.

Tritt ein Frührezidiv innerhalb der ersten 6 Monate nach Abschluss der ersten Therapie auf, so spricht man von Platinresistenz. Eine zweite Operation ist in solchen Fällen nur selten indiziert. Es wird eine nicht-platinhaltige Chemotherapie empfohlen, deren Ziel es ist, die Lebensqualität zu verbessern oder zu erhalten und die Überlebenszeit zu verlängern. Tritt ein Rezidiv nach mehr als 6 Monaten auf und scheint eine Tumorfreiheit erreichbar kann eine Rezidivoperation durchgeführt werden. Systemisch wird das platinsensible Spätrezidiv mit einer platinhaltigen Kombinationschemotherapie behandelt (Interdisziplinäre S2k Leitlinie 2007).

Die Palliativtherapie beinhaltet eine geeignete Schmerztherapie, ggf. eine Pleura-/ Aszitesdrainage, Palliativchirurgie, eine Ernährungstherapie bei Kachexie, eine Hormontherapie und eine palliative Chemotherapie (Tumorzentrum Südost-Niedersachsen 2006)

Jede Patientin wird zusätzlich psychoonkologisch betreut (Interdisziplinäre S2k Leitlinie 2007).

### 1.5 Her-2 und EGFR: Zwei Rezeptoren der ErbB Familie

Her-2/neu ist ein Protoonkogen, lokalisiert auf dem langen Arm des Chromosom 17 und kodiert für einen 185 kDa großen, transmebranalen Tyrosinkinase Rezeptor, den Her-2-Rezeptor (Hengstler et al. 1999, Troxell et al. 2006). Genauso wie der EGF-Rezeptor gehört Her-2 der ErbB- (**er**ythro**b**lastoma; homologe Gene wurden bei Geflügel-Leukämie gefunden (Yarden 2001)) Familie an. Diese besteht aus 4 sog. Wildtyp-Rezeptoren: EGFR (Her-1), ErbB2 (Her-2), ErbB3 (Her-3) und ErbB4 (Her-4) (Future Oncology 2007). Im Folgenden werden für die Gene die Bezeichnungen Her-2/neu und ErbB1 benutzt, für die Rezeptoren Her-2 und EGFR. Die oben genannten Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Fetus und im Wachstum. Insbesondere Her-2 wird für eine normale Brustentwicklung mit verantwortlich gemacht (Yarden 2001). Eine erhöhte Expression der Protoonkogene und eine Fehlfunktion der Rezeptoren dieser Familie führt zur Störung normaler Kontrollmechanismen und wird mit Blasen-, Gehirn-, Brust-, Colon-, Kopf- und Nacken-, Lungen-, Ovarial- und Pankreastumoren in Verbindung gebracht (Lafky et al. 2008, Yarden 2001). Eine normale Zelle exprimiert zwischen 40.000 und 100.000 Rezeptoren der ErbB Familie auf ihrer Oberfläche. In Tumorzellen kann die Zahl hingegen über 2 Millionen betragen.

Die Rezeptoren der ErbB Familie bilden nach Ligandenbindung Dimere und werden dadurch aktiviert. Es gibt bis zu 30 Liganden, die zur Aktivierung befähigt sind. Die 8 wichtigsten sind EGF (Epidermal Growth Factor), TGFα (Transforming Growth Factor α), Epiregulin, HB-EGF (Heparin-binding EGF-like Growth Factor), Amphiregulin, Betacellulin und die Neureguline 1-4 (Future Oncology 2007). Her-2 ist hierbei eine Ausnahme: es besitzt keine eigene Bindungsdomäne für einen der Liganden, sondern fungiert als Co-Rezeptor. Her-2 bildet ebenfalls Dimere, jedoch nur Heterodimere mit den anderen Rezeptoren der ErbB-Familie und kann so als Korezeptor an der Signaltransduktion teilnehmen, obwohl ein spezifischer Ligand fehlt. Außerdem verstärkt Her-2 durch die Dimerisation die Wirkung seines Partnerrezeptors, der seinen Liganden nun länger binden kann. Eine besonders mitogene Kombination ist das Heterodimer Her-2/Her-3 (Future Oncology 2007, Yarden 2001).

Nach der Dimerbildung und Aktivierung durch Autophosphorylierung folgt eine intrazelluläre Signalkaskade, durch die es zur Modulation von nukleären Transkriptionsfaktoren kommt, die die Expression von Genen wie c-myc, c-jun und c-fos steuern. Diese spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und

Zellproliferation, sie sind möglicherweise auch für eine verminderte Sensitivität gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika verantwortlich zu machen (Future Oncology 2007, Hengstler et al. 1999, Ullrich et Schlessinger 1990).

In genamplifizierten/-mutierten, protein- oder liganden- überexprimierenden Tumorzellen kommt es zu vermehrtem Zellwachstum und Hemmung der Apoptose, Veränderungen epithelialer Zellen sowie Stromaproliferation und Angiogenese (Lafky et al. 2008).

Eine Her-2/neu Genamplifikation lässt sich in 20-30% aller Mammakarzinome feststellen und gilt als Prognosefaktor hinsichtlich des klinischen Verlaufs, des Ansprechens auf die Tamoxifen- (Antiöstrogen-Therapie) und die adjuvante Doxorubicin (Anthrazyklin)-Chemotherapie. Die Amplifikation des Genes wird mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben und einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit in Verbindung gebracht. Mit Trastuzumab (Herceptin; Genentech, Inc., South San Francisco, CA), einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen Her-2, können überexprimierende Tumorzellen bekämpft werden (Press et al. 2002). Seine Wirkungsweise ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch soll Trastuzumab das Recycling von Her-2 aus den Endosomen zurück an die Zelloberfläche verhindern und so zum Abbau des Rezeptors in den Lysosomen führen (Yarden 2001). Im Gegensatz zu Brustkrebs ist die Trastuzumab-Therapie bei Ovarialkarzinomen jedoch noch nicht etabliert. Die bestehenden Daten zur Her-2-Überexpression und ihre prognostische Aussagekraft bei Ovarialkarzinomen widersprechen einander (Protopapas et al. 2004, Ross et al. 1999, Meden et al. 1998, Fajac et al. 1995), weshalb der Stellenwert einer Überexpression beim Ovarialkarzinom noch geklärt werden muss. Neuere Studien von Mayr et al. (2005) und Bookman et al. (2003) räumen Her-2/neu und seinem Rezeptor bisher weder eine prognostisch, noch eine therapeutisch relevante Rolle bei Ovarialkarzinomen ein. Die Anwendung von Herceptin zeigte in klinischen Studien auch kaum Erfolg.

Beim EGF-Rezeptor (EGFR) handelt es sich um ein 170 kDa großes transmembranöses Glykoprotein, ebenfalls mit Tyrosinkinase-Aktivität (Future Oncology 2007). Das für den Rezeptor kodierende Gen liegt auf dem Chromosom 7 (Cappuzzo et al. 2005). EGFR wird von gesunden Geweben exprimiert und in verschiedenen Tumorgeweben (s.o.) überexprimiert. Als einziger der Rezeptoren der ErbB Familie ist EGFR in der Lage auch Homodimere zu bilden (Future Oncology 2007). EGFR wird in 35-70% der Ovarialtumoren überexprimiert (Dinh et al. 2008).

Er ist in Tumorgeweben an verändertem Zellwachstum, Apoptose-Hemmung, Zellmigration, Metastasierung und Angiogenese beteiligt. Außerdem wird durch EGFR in einer Art Teufelskreis eine Resistenz gegen Bestrahlung vermittelt: Ionisierende Strahlung führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und damit wiederum zur Modulation der Zelltranskription. Dies soll durch den EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbitux®, Imclone Systems Inc., and Bristol-Myers Squibb, New York, NY) sowie die Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib (Iressa®, Astra Zeneca, Macclesfield, UK) und Erlotinib (Tarceva® OSI Pharmaceuticals Inc., Melville, NY) verhindert werden (Cerciello et al. 2007, Cappuzzo et al. 2005). Bei Lungen-, Colon- und Brustkrebs werden seit neuerem auch Dual EGFR/Her-2-Inhibitoren, wie Lapatinib verwendet. Laut Vermeij et al. (2008) hat sich die Überexpression von EGFR im Gegensatz zu anderen Tumoren bei Ovarialtumoren bisher nicht als signifikanter prognostischer Faktor etabliert. Andere verbinden die EGFR-Überexpression beim Ovarialtumor mit schlechten Überlebenschancen (Dinh et al. 2008, Psyrri et al. 2005).

### 1.6 Topoisomerase IIα

Topoisomerase IIα ist genau wie Her-2/neu auf dem langen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert (Mano et al. 2003). Das Gen liegt in zwei Kopien in allen diploiden Zellen vor und kodiert für ein 170 kDa großes Protein (Sng et al. 1999, Tsai-Pflugfelder et al. 1988). Das exprimierte Enzym spielt eine bedeutende Rolle für den Ablauf des Zellzyklus. Seine Expression findet in proliferierenden Zellen in der späten S-, der G2 und M-Phase statt und stellt somit einen Proliferationsmarker dar (Tsiambas et al. 2006, Costa et al. 2000). Es katalysiert die Entwindung der DNS, die Einführung von Einzelstrangbrüchen an beiden DNS-Strängen und die darauf folgende Passage von Doppelstrang-DNS durch die entstandenen Lücken (Fritz et al. 2005).

Eine Überexpression von Topoisomerase IIα wird sowohl mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, als auch mit einer schlechten Überlebensrate der Ovarialkarzinom-Patientinnen assoziiert (Brustmann 2004, Costa et al. 2000).

Das Enzym ist Angriffspunkt mehrerer Chemotherapeutika, wie Etoposide, Teniposide, Novobiocin und Anthrazyklinen, die auch bei einer Her-2-Überexpression verwendet werden (s. o.). Bei Brustkrebs ist die Topoisomerase IIα-Amplifikation eng mit der Her-2/neu-Amplifikation assoziiert, bedingt durch die Nähe der beiden Genloci zueinander. Es besteht die Annahme, dass nicht Her-2/neu, wie bisher angenommen, sondern

Topoisomerase IIα der eigentliche Prognosefaktor für das Ansprechen auf die Anthrazyklin-Therapie ist (Fritz et al. 2005, Mano et al. 2004). Tatsächlich wurde von Isola et al. (2000) eine Korrelation zwischen Topoisomerase IIα-Amplifikation und dem Ansprechen auf Anthrazyklin berichtet. Auch Järvinen et al. (2000) vertreten diese Ansicht und postulieren außerdem eine durch eine Topoisomerase IIα-Deletion herbeigeführte Anthrazyklin Resistenz. Eine schlechtere Prognose soll ebenfalls mit der Deletion in Verbindung stehen (Nielsen et al. 2008, Knoop et al. 2005).

Anthrazykline (Doxorubicin, Epirubicin), die zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt werden, bilden zusammen mit Topoisomerase IIα und dem DNA-Strang einen Komplex. Dadurch werden die Strangbrüche stabilisiert und die Apoptose wird in den proliferierenden Zellen eingeleitet (Fritz et al. 2005, Depowski et al. 2000). Anthrazyklinen werden jedoch auch ernsthafte unerwünschte Nebenwirkungen nachgesagt, nämlich Kardiotoxizität, toxische Wirkung im Gastrointestinaltrakt und ein erhöhtes Risiko für akute Leukämie (Tsiambas et al. 2006).

## 1.7 Fragestellung

Die vorliegenden Untersuchungen sollen zur Beantwortung folgender Fragen beitragen:

- Weisen fortgeschrittene Ovarialkarzinome (FIGO III) innerhalb ihrer Gruppe einen Unterschied in der Häufigkeit der Amplifikationen von Her-2/neu, Topoisomerase IIα und ErbB1 auf?

- Falls ja, korrelieren diese Unterschiede mit den unterschiedlichen Überlebensdauern (kurz, mittel, lang)?

- Korreliert dabei die Amplifikation von Her-2/neu mit der Amplifikation von Topoisomerase IIα und/oder mit der von ErbB1?

- Falls nein, um welche Patientinnen innerhalb der Gruppe FIGO III handelt es sich, die eine Topoisomerase IIα-Amplifikation oder eine ErbB1-Amplifikation ohne Amplifikation von Her-2/neu aufweisen?

- Welche Rolle spielt die Topoisomerase IIα-Deletion?

- Korreliert insgesamt die Proteinexpression mit der jeweiligen Genamplifikation und reicht somit der immunhistochemische Nachweis als diagnostisches Verfahren aus?

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Materialien und Bezugsquellen

### *2.1.1 Auswahl der Patientinnen*

Das verwendete Tumorgewebe stammt aus den Archiven des Pathologischen Instituts (Fälle von 1991 – 2003) und der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Fälle aus dem Jahr 2000). Es handelte sich um in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material. Ausgewählt wurden ausschließlich epitheliale Tumoren im FIGO-Stadium III. Zum Zeitpunkt der Diagnose waren die Patientinnen zwischen 26,7 und 89,1 Jahre alt. Operiert wurden sie in den Jahren 1989 bis 2003. Die Follow-up-Daten wurden vom Münchner Tumorregister zur Verfügung gestellt und erstrecken sich über einen Zeitraum von 0 bis 184 Monaten.

Bei den Präparaten aus dem Archiv des Pathologischen Instituts wurden zunächst die zugehörigen HE-Schnitte herausgesucht, unter dem Lichtmikroskop beurteilt und die Tumorareale mit einem wasserfesten Stift markiert. Anhand der beurteilten HE-Schnitte wurden dann die zugehörigen Paraffinblöcke aus dem Archiv entnommen. Bei den Präparaten aus der Frauenklinik waren keine HE-Schnitte vorhanden. Diese wurden aus den zur Verfügung gestellten Blöcken neu angefertigt, anschließend lichtmikroskopisch beurteilt und wie oben beschrieben markiert.

### *2.1.2 Geräte*

| | |
|---|---|
| Stanzgerät | MTA-1 ( Micro Tissue Arrayer ), Beecher Instruments, Woodland, USA |
| Mikrotom | Jung AG, Heidelberg, Deutschland |
| Hybridisierungsofen | Binder GmbH, Weißenfeld, Deutschland |
| Brutschrank | Heraeus / Kendro, Langenselbold, Deutschland |
| Mikrowelle | Micromat Duo, AEG, Deutschland |
| Heizplatte | Präzitherm, Störk Tronic, Stuttgart, Deutschland |
| Vortex | Heidolph Elektro AG, Kehlheim, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Zentrifuge | Poly Labo, Straßburg, Frankreich |
| Wasserbad | Typ 3047, Köttermann GmbH & Co. Kg, Uetze/Hänigsen, Deutschland |
| Pipetten | Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Magnetrührer | IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland |
| pH – Meter | Schott Glass, Mainz, Deutschland |
| Autoclaven | Varioklav Dampfsterilisatoren, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland |
| Lichtmikroskop | Typ Axioskop 20, Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Fluoreszenz-Mikroskop | Typ Axioskop 20, Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Kamera für das Fluoreszenz-Mikroskop | Axio Cam MRc, Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Quecksilberdampflampe | OSRAM, Deutschland |
| Tastatur zum Wechseln der Filter | MAC 5000, LEP, Hawthorne, NY, USA |

*2.1.3 Verbrauchsmaterial*

| | |
|---|---|
| Paraffin | Gold Standard Series Peel-A-Way Micro-Cut Paraffin, Catalog Number 24198 56° to 58° C, Polysciences, Inc., Warrington, USA |
| Objektträger | Menzel-Gläser Super Frost Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland |
| Deckgläser | Menzel-Gläser, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland |

| | |
|---|---|
| feuchte Kammer | Edelstahlbox mit Aqua bidest gefüllten Pasteurpipetten |
| Abdichtklebstoff | Fixogum, Marabuwerke GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland |
| Eindeckgelatine | Kaisers Glyceringelatine, Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Immersionsöl | Zeiss, Jena / Göttingen, Deutschland |

*2.1.4 Chemikalien*

| | |
|---|---|
| Xylol (reinst) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol (reinst) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumisothiocyanat (1 M) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Acqua bidest | H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland |
| Pepsin Stock (100 mg/ml) | Sigma, München, Deutschland |
| $H_2O$ pH 2,0 | Aqua bidest und Salzsäure Maßlösung (1M), Lösung autoclaviert. Biochemica, AppliChem, Darmstadt, Deutschland |
| 20 x SSC Waschpuffer | 3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat pH 5,3, 66g 20 x SSC (im Kit enthalten) in 200 ml Aqua bidest lösen, pH mit HCl auf 5,3 einstellen, Endvolumen 250 ml. Lösung autoclavieren. Jeweils von AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, Aqua bidest von H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland |
| 0,1 x SSC | 2,5 ml 20 x SSC pH 5,3 auf 500 ml Aqua bidest von H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland |

| | |
|---|---|
| BT-Puffer | 3,1 g $NaHCO_3$ und 0,005g tri-Na-Citrat $2H_2O$ in 200 ml Aqua bidest lösen, 250 µl Tween zugeben, Endvolumen 250 ml. Jeweils von AppliChem, Darmstadt, Deutschland Aqua bidest von H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland |
| Target Retrieval Solution | Dako, Carpinteria, CA, USA |
| Protein Block | Dako, Carpinteria, CA, USA |

*2.1.5 Färbe-/Hybridisierungs-Kits*

| | |
|---|---|
| Immunhistochemischer Her-2-Test | 4B5, Ventana Medical Systems, S.A., Illkirch, Frankreich |
| Immunhistochemischer Topoisomerase IIα-Test | NCL-TOPOIIA, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK<br>Detektionssystem:<br>LSAB2 System-HRP (beinhaltet biotinylierte sekundäre Antikörper und Streptavidin), Dako, Carpinteria, CA, USA<br>Chromogen:<br>AEC, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland<br>Gegenfärbung:<br>Hematoxylin Gill's Formula, Vector Labs., Burlingame, CA, USA |
| Immunhistochemischer EGFR-Test | Confirm EGFR 3C6, Ventana Medical Systems, S.A., Illkirch, Frankreich |
| Her2/neu-Sonde | PathVysion Her-2 DNA Probe Kit, Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA |
| Topoisomerase IIa-Sonde | LSI TOP 2A Spectrum Orange / CEP 17 Spectrum Green, Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL, USA |
| ErbB1-Sonde | SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe, Zytomed-Systems, Berlin, Deutschland |

| | |
|---|---|
| DAPI | Roche, Penzberg, Deutschland |
| Vectashield | Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland |
| DAPI-Gegenfärbemittel | aus 1 ml Vectashield und 1 µl DAPI |

**2.2 Stanzen der Tissue Microarray Blöcke**

Um möglichst viele Fälle in möglichst kurzer Zeit und kostensparend auswerten zu können, wurden Tissue Microarray Blöcke (TMA-Blöcke) angefertigt. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem bis zu 1000 Gewebeproben (zylindrisch ausgestanzt) in einen Standard-Paraffinblock eingesetzt werden. Anschließend wird der Paraffinblock geschnitten und für den jeweiligen Zweck gefärbt oder hybridisiert. So können zahlreiche Fälle in einem Untersuchungsschritt gleichzeitig beurteilt werden.

*2.2.1 Lagepläne*

Vor dem Stanzen wurde für jeden Block ein Lageplan (s. Anhang 1-3) angefertigt. Auf diesem wurden die Fälle so angeordnet, dass sich ein unverwechselbares Muster innerhalb eines Koordinatensystems ergab. So konnte später jede Stanze auf dem Objektträger sicher identifiziert werden. Um die Materialverluste durch Schneide- und Hybridisierungsvorgänge möglichst gering zu halten wurde jeder Fall durch 2 Stanzen pro Block repräsentiert. Mitgeführtes Kontrollgewebe sollte eine erfolgreich durchgeführte Färbung und Hybridisierung bestätigen.

*2.2.2 Das Stanzen*

Die Tissue Microarray Blöcke wurden mit Hilfe des MTA-1 (Micro Tissue Arrayer-1, s. Abb. 1) hergestellt. Hierzu benötigte man einen Empfängerblock aus thermostabilem Paraffin, der vom institutseigenen Labor hergestellt wurde sowie die Spenderblöcke.
Um ein geeignetes Paraffin für die Empfängerblöcke zu finden, das „weich“ genug zum Stanzen und „hart“ genug zum Schneiden war, wurden vom institutseigenen Labor verschiedene Paraffine auf ihre Schneideeigenschaften getestet. Als geeignet wurden das Sherwood Paraffin und Gold Standard Series Peel-A-Way Micro-Cut Paraffin

ausgewählt. Aus beiden Paraffinen wurden Empfängerblöcke der Größe 30 x 20 x 10 mm hergestellt. Daraufhin wurde jeweils ein Testblock gestanzt und dabei beobachtet, ob beim Stanzen Risse entstehen.

In den Stanzapparat wurden zwei Stanznadeln eingespannt, zwischen denen hin und her gewechselt werden konnte. Eine Nadel hatte einen Innendurchmesser von 0,6 mm. Mit dieser wurden Paraffinzylinder aus dem Empfängerblock ausgestanzt. Die zweite Nadel hatte einen Außendurchmesser von 0,6 mm. Mit ihr wurden Gewebezylinder aus den Spenderblöcken entnommen und in den Empfängerblock eingebracht. Um die Tumorareale auf den Spenderblöcken zu identifizieren, wurden die zugehörigen, markierten HE-Schnitte mit dem Gewebe des Blocks zur Deckung gebracht. Das Einbringen des Gewebezylinders in das Stanzloch des Empfängerblocks geschah mit Hilfe einer Innennadel, durch die das Gewebe aus der Hohlnadel geschoben werden kann.

Es musste darauf geachtet werden, dass die Stanzen ca. 2 mm Abstand zu den Rändern des Blockes hatten, um beim Einstechen mit der Nadel ein Brechen des Blocks zu vermieden. Außerdem können Stanzen, die zu nah am Rand positioniert und nicht genügend vom Paraffin gefasst sind, beim Schneiden verloren gehen. Der Stanzendurchmesser betrug 0,6 mm und der Abstand von Stanzenrand zu Stanzenrand 0,4 mm.

Beide Testblöcke wurden anschließend bei –20°C, RT (Raumtemperatur) und 4°C in verschiedenen Dicken geschnitten. Die Schnitte wurden dann mit HE gefärbt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

Die besten Materialeigenschaften wies der Block aus dem Gold Standard Series Peel-A-Way Micro-Cut Paraffin auf, das somit für alle weiteren Schritte verwendet wurde. An Schnitten dieses Testblocks mit den Dicken 2 µm und 3 µm wurden anschließend Testhybridisierungen mit der Her2/neu Sonde vorgenommen.

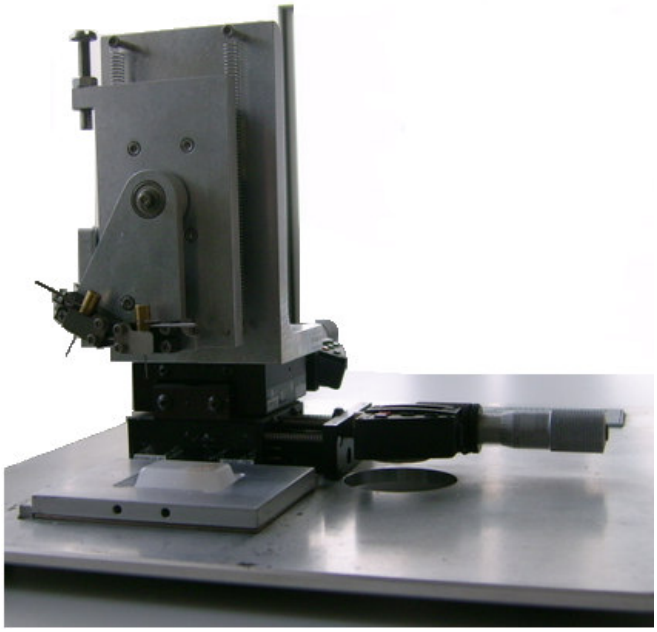


Abb.1: Stanzapparatur MTA-1

*2.2.3 Systematik der Originalblöcke*

Insgesamt wurden 3 TMA-Blöcke von 243 Fällen mit Ovarialkarzinomen im Tumorstadium FIGO III hergestellt. Die ersten beiden Blöcke bestanden jeweils aus 216 Stanzen, die sich folgendermaßen zusammensetzten:

Jeweils 2 Stanzen von 101 Tumorfällen sowie jeweils 2 Stanzen von 7 Kontrollgeweben.

Der dritte Block beinhaltete 174 Stanzen, davon jeweils 2 Stanzen von 81 Fällen mit Tumorgewebe und von 6 Fällen mit Kontrollgewebe. 40 der 81 Fälle waren Tumoren, die bereits in die ersten beiden Blöcke übertragen worden waren, dort aber verloren gegangen oder nicht auswertbar gewesen waren (s. Anhang 3).

Die folgenden Arbeitsschritte (2.3 – 2.5) wurden jeweils an allen drei TMA-Blöcken durchgeführt.

Die Anzahl der Fälle bezogen auf das Jahr der Archivierung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Anzahl der verwendeten Fälle aus den Jahren 1991-2003 des Pathologischen Institutes und der Frauenklinik

| Jahr | Fälle Pathologisches Institut | Fälle Frauenklinik |
|---|---|---|
| 1991 | 2 | |
| 1992 | 7 | |
| 1993 | 23 | |
| 1994 | 19 | |
| 1995 | 23 | |
| 1996 | 21 | |
| 1997 | 18 | |
| 1998 | 21 | |
| 1999 | 16 | |
| 2000 | 15 | 18 |
| 2001 | 31 | |
| 2002 | 28 | |
| 2003 | 1 | |

### 2.3 Schneiden der Blöcke

Die TMA-Blöcke wurden bei – 20°C für den jeweiligen Zweck in verschiedene Dicken geschnitten (s. Tab. 3). Die Schnitte wurden daraufhin in ein auf 40°C temperiertes, proteinfreies Wasserbad gegeben. Nach dem Strecken des Paraffinschnittes wurden sie auf die positive Seite eines mit SuperFrost Plus beschichteten Objektträgers aufgebracht und luftgetrocknet. Über Nacht wurden die Objektträger in den Brutschrank (56°C) gelegt, um eine optimale Verbindung zwischen Präparaten und Objektträgern zu schaffen.

Tab. 3: Die Blockschnittdicken und ihr Verwendungszweck

| Schnittdicke | Verwendungszweck |
|---|---|
| 2 µm | FISH |
| 1-2 µm | HE-Färbung |
| < 2 µm | IHC |

## 2.4 Immunhistochemische Tests

Für den Her-2-Test und den EGFR-Test wurden fertige Kits verwendet und die Färbung automatisch durchgeführt. Aus diesem Grund folgt an dieser Stelle nur für den per Hand gefärbten Topoisomerase IIα-Test eine ausführliche Beschreibung.

### *2.4.1 Der Her-2-Test*

Die immunhistochemische Färbung für den Her-2-Test mit 4B5 von Ventana wurde automatisch mit Hilfe des Benchmark® XT von Ventana durchgeführt.

### *2.4.2 Der Topoisomerase IIα-Test*

Der primäre Antikörper des verwendeten Topoisomerase IIα-Tests ist ein prokaryotisches rekombinantes Protein und gehört der IgG-Klasse an. Es bindet an das C-Terminale Ende des Topoisomerase IIα-Moleküls.

Zunächst wurden die Objektträger mit den aufgebrachten Präparaten entparaffiniert (s. auch 2.5.1 Entparaffinierung). Danach erfolgte die Vorbehandlung mit der Target Retrieval Solution in der Mikrowelle für 2 x 15 min bei 750 W. Bei RT kühlten die Präparate für 20 min ab und wurden daraufhin 2 x 5 min mit dem TRIS-Puffer (pH 7,5) gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate zuerst 10 min lang mit 7,5%-igem wässrigen Wasserstoffperoxid bei RT behandelt und anschließend 10 min fließend gewässert. Es erfolgte wieder eine 2 x 5-minütige Spülung mit dem TRIS-Puffer. Danach wurden die Präparate für 10 min mit dem Protein Block behandelt. Der nächste Schritt bestand in der Inkubation der Präparate mit dem primären Antikörper Topoisomerase IIα (Verdünnung 1:20) für 60 min bei RT. Daraufhin folgte eine 2 x 5-minütige Spülung mit dem TRIS-Puffer. Im Anschluss wurden die Präparate je 30 min lang mit biotinylierten Sekundär-Antikörpern und mit Streptavidin behandelt. Dazwischen und danach erfolgte wieder eine 2 x 5 min lange Spülung mit dem TRIS-Puffer. Das Chromogen AEC wurde aufgebracht und nach 10 min für 10 min fließend gewässert. Für die Gegenfärbung wurde Hematoxylin Gill's Formula verwendet, die 10 sec einwirkte und der eine 10-minütige fließende Wässerung folgte. Im letzten Schritt wurden die Präparate mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

### *2.4.3 Der EGFR-Test*

Die immunhistochemische Färbung für den EGFR-Test mit Confirm EGFR 3C6 von Ventana wurde automatisch mit Hilfe des Benchmark® XT von Ventana durchgeführt.

## 2.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

### *2.5.1 Entparaffinierung*

Die Präparate wurden dazu 2 x 30 min in Xylol (reinst) inkubiert. Anschließend wurden sie 2 x 10 min, um das Xylol wieder zu entfernen, in absolutem Ethanol (reinst) gewaschen und dann luftgetrocknet.

### *2.5.2 Vorbehandlung der Präparate*

1 M Natriumisothiocyanat-Lösung wurde in der Mikrowelle ca. 45 sec handwarm erwärmt, je 200-300 µl davon auf die Schnitte aufgebracht und mit langen Deckgläsern abgedeckt. Durch die Natriumisothiocyanat-Lösung werden grobe Vernetzungen, die beim Paraffinieren entstanden sind, gelöst. Für 30 min wurden die Objektträger in der feuchten Kammer bei 80°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Danach wurden die Deckgläser durch vorsichtiges Abschütteln wieder entfernt und die Präparate in Aqua bidest gespült.

### *2.5.3 Proteasebehandlung*

Für die Proteasebehandlung wurde eine Pepsinlösung aus 80µl Pepsin Stock + 920 µl Aqua bidest, pH 2,0 vorbereitet. Dieser Ansatz wurde sofort vorgetext (vortexen = mit Hilfe des Vortexgerätes rüttelnd vermischen) und im Kühlschrank zwischengelagert. Je 200 µl dieser Pepsinlösung wurden auf die Schnitte pipettiert, mit langen Deckgläsern abgedeckt und bei 37°C für 30 min im Brutschrank inkubiert. Durch den Pepsinverdau werden die Kernmembranen für die Sonde permeabel. Die Deckgläser wurden nach der Inkubation wieder vorsichtig abgeschüttelt und die Objekte kurz in Aqua bidest gespült. Während die Objektträger lufttrockneten wurde bereits die Heizplatte auf 80°C aufgeheizt.

*2.5.4 Denaturierung und Hybridisierung mit der Her2/neu-Sonde*

Die Denaturierung der DNS erfolgte, indem die getrockneten Präparate für 20 min auf die Heizplatte gelegt wurden. Nach ca. 10 min konnte die Her2/neu-Sonde aus dem Gefrierschrank genommen, auf Raumtemperatur gebracht, vorgetext, anzentrifugiert und dunkel abgedeckt bereit gestellt werden. Nach der Denaturierung wurde die Sonde vor direktem Licht geschützt und möglichst blasenfrei auf die Schnitte aufgebracht. Die Menge der Sonde richtet sich nach der Präparatgröße. Für eine 18 x 18 mm große Fläche werden ca. 8 µl Sonde benötigt. In diesem Fall wurden für jeden Schnitt 18 µl verwendet. Die Objekte wurden dann mit auf Präparatgröße zugeschnittenen Deckgläsern abgedeckt und der Übergang zwischen Objektträgerglas und Deckglas mit Fixogum abgedichtet. Die so präparierten Objekte wurden nochmals für 10 min auf die 80°C heiße Platte gelegt und danach über Nacht in der feuchten Kammer im Brutschrank (37°C) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zuerst das Wasserbad auf 42°C vorgeheizt. Währenddessen setzte man den SSC-Puffer (ein Tag haltbar) und den BT- Puffer (bei 4°C ein Woche haltbar) an. Beide wurden anschließend in Glasküvetten gefüllt und im Wasserbad auf 42°C erwärmt.

*2.5.5 Waschung und Detektion*

Das Fixogum wurde nun mit einer Pinzette von den Objektträgern entfernt und das Deckglas vorsichtig abgehoben. Die Objektträger wurden dann 3 x 10 min im SSC-Puffer gewaschen. Dabei wurde die Pufferflüssigkeit alle 10 min durch eine neue ersetzt. Danach wurden die Objektträger 5 min lang im BT-Puffer inkubiert. Während dieser Waschungen wurde das DAPI-Gegenfärbemittel von -20°C, lichtgeschützt auf Raumtemperatur gebracht. Nachdem die Objektträger aus dem BT-Puffer genommen wurden und kurz auf Zellstoff abtropften, wurden 25 µl DAPI-Gegenfärbemittel auf die Präparate pipettiert und luftblasenfrei mit einem großen Deckglas (24 x 60 mm) abgedeckt.

Dasselbe Procedere gilt auch für die Topoisomerase IIα- und ErbB1-Sonden. Bis zur Auswertung der Präparate sollten diese im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden.

### *2.5.6 Problematisches Material aus der Frauenklinik*

Bei den Paraffinblöcken aus der Frauenklinik handelte es sich um Ovarialkarzinome aus den Jahren 1990 bis 2000. Im Jahr 1999 wurde die Zusammensetzung des zur Gewebefixierung verwendeten Paraffins verändert. Bei den Blöcken aus den Jahren 1990 bis einschließlich 1999 ist das Paraffin nicht (bzw. anders) gepuffert und die Formaldehydkonzentration beträgt 10%, statt wie heute üblich 3-4%. Mit der Zunahme der Formaldehydkonzentration nimmt die Penetrationsfähigkeit des Paraffins ab und damit steigt die Autolyse der DNS. Gleichzeitig findet ein verstärktes sog. „Cross linking“ statt. Diese Vernetzungen müssen für die Hybridisierungen gelöst werden. Daher erfolgt eine stärkere Proteasebehandlung, die wiederum zur Fragmentierung der DNS führen kann. Zudem sind alle Färbe- und Hybridisierungsverfahren auf das „neue“ Paraffin abgestimmt, d.h. für alle Fälle, die aus den Jahren 1999 und früher stammten, hätten andere Konzentrationen und Einwirkzeiten der Chemikalien ausprobiert werden müssen. Außerdem waren die Blöcke in ihrer Größe nicht genormt (teilweise 10 x 5 cm groß), weswegen auch die Penetration des Paraffins von Block zu Block unterschiedlich war (je größer, desto schlechter). Einige Blöcke wurden sogar „zerkleinert“, um überhaupt mit dem Mikrotom geschnitten werden zu können. Aus diesen Gründen wurden Fälle aus der Frauenklinik erst ab dem Jahr 2000 verwendet.

## 2.6 Auswertungen

### *2.6.1 HE-Schnitte*

An den HE-Schnitten wurde unter dem Lichtmikroskop beurteilt, ob Stanzen verloren gegangen waren und ob die vorhandenen Stanzen Tumormaterial enthalten. Fehlte ein Fall oder war in keiner der beiden Stanzen Tumormaterial enthalten, wurde der dementsprechende Fall nochmals auf den dritten Block gestanzt.

### *2.6.2 Immunhistochemische Tests*

Alle Blöcke wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Expression des Her2/neu-, Topoisomerase IIα- und des ErbB1-Gens zu untersuchen.

Damit konnte ermittelt werden, wie groß die Korrelation zwischen immunhistochemischen Verfahren und der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung war.
Die Auswertung des Her-2-Tests erfolgte nach dem DakoCytomation Scoring System (2002) und den neuen Empfehlungen nach Wolff et al. (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists 2007, s. Tab. 4).

Tab. 4: Auswertungsschema für den Her-2-Test

| **Score** | **Protein-Überexpression** | **Färbemuster** |
|---|---|---|
| 0 | negativ | es ist keine Färbung erkennbar oder eine Färbung der Zellmembran in weniger als 10% der Tumorzellen |
| 1+ | negativ | eine schwach/kaum wahrnehmbare Membranfärbung ist in mehr als 10% der Tumorzellen erkennbar. Nur Teile der Membran sind angefärbt. |
| 2+ | unklar/schwach positiv | eine schwache bis moderate Färbung der gesamten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen ist zu erkennen. |
| 3+ | positiv | eine starke Färbung der gesamten Membran in mehr als 30% der Tumorzellen ist zu erkennen. |

Für den Immunhistochemischen Test von Topoisomerase IIα wurde bisher kein einheitliches Scoring System definiert (Mano et al. 2003). In der Literatur werden verschiedene Bewertungsmethoden angegeben: zum einen der Score nach Remmele (Chekerov et al. 2006), zum anderen die Auswertung nach dem prozentualen Anteil der angefärbten Tumorzellkerne, wobei ein Wert von mehr als 10% als positiv gilt (Mano et al. 2003, Di Leo et al. 2002). In dieser Untersuchung wurden beide Methoden ausprobiert. Die Entscheidung fiel letztendlich zugunsten des Remmele Scores aus, da dieser eine differenziertere Betrachtung erlaubte.
Dabei werden sowohl die Färbeintensität, als auch der Prozentsatz positiver Zellen betrachtet (s. Tab. 5). Das Produkt aus den Punkten für die Färbeintensität und den Punkten für den Prozentsatz positiver Zellkerne ergibt einen Score-Wert zwischen 0 und 12 (Remmele et Stegner 1987). Nach dem Vorbild von Chekerov et al. (2006)

wurde auch hier ein Score von 0-2 als geringe Expression interpretiert, eine Score von 3-6 als mittlere Expression und ein Score von 7-12 als starke Expression.

Tab. 5: Remmele Score, Auswertungsschema für den IHC-Test von Topoisomerase IIα

| Punkte | Färbeintensität | Prozentsatz positiver Zellkerne |
|---|---|---|
| 0 | keine Färbung | 0% |
| 1 | schwach | 1-9% |
| 2 | mäßig | 10-50% |
| 3 | stark | 51-80% |
| 4 | / | 81-100% |

Die Auswertung des EGF-Rezeptor-Tests erfolgte nach der Interpretationsanleitung von Dako. In Abwesenheit einer, sich vom Hintergrund abhebenden Färbung der Zellmembran, gilt der Tumor als EGFR-negativ. Als EGFR-positiv definiert ist der Tumor, wenn über 0% der Tumorzellen angefärbt sind, wobei auch schon eine inkomplette Färbung der Zellmembran ausreicht.

### *2.6.3 FISH*

#### *2.6.3.1 Verwendete Sonden*

Die TMA-Blöcke wurden mit jeweils drei Sondenkits hybridisiert, dem Her2/neu Sondenkit von Abbott, dem Topoisomerase IIa Sondenkit von Abbott und dem EGFR Sondenkit von Zytomed-Systems.

Das Her2/neu Sondenkit setzt sich zusammen aus der LSI Her2 Sonde, die spezifisch für das Her2/neu Gen ist und mit Spectrum Orange markiert ist, und aus der CEP 17 Sonde, spezifisch für die Alpha Satelliten des Zentromers von Chromosom 17 und markiert mit Spectrum Green (Vysis Product Catalog).

Das EGFR Sondenkit besteht ebenfalls aus zwei Sonden. Erstens, der CEN 7 Sonde, spezifisch für das Zentromer des Chromosoms 7 und mit dem orangen Fluorochrom

ZyOrange markiert (Absorption: 547 nm und eine Emission von 572 nm). Zweitens, aus der SPEC EGFR Sonde, die spezifisch für das EGFR Gen ist, markiert mit dem grünen Fluorochrom ZyGreen (Absorption 503 nm, Emission 528 nm) (Produktbeschreibung Zyto Vision).
Das Topoisomerase IIa Sondenkit markiert das Zentromer mit der Sonde CEP 17 Spectrum Green und das Topoisomerase IIa Gen mit der Sonde LSI TOP 2A Spectrum Orange.

*2.6.3.2 Vorgehen und Auswertungskriterien*

Die Auswertung der Stanzen erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop. Das Mikroskop besitzt drei Filter. Der Einfachbandpass-Filter von Dapi wird verwendet, um die Zellkerne zu beurteilen (s. Abb. 2), mit dem FITC (Green)-Einfachfilter können die grünen Signale gezählt werden und mit dem TRITC (Orange)-Einfachfilter die roten Signale. Sowohl beim Her2/neu Sondenkit, als auch beim Topoisomerase IIa Sondenkit werden die Gene rot und die Zentromere grün dargestellt (s. Abb. 7 und 8). Beim EGFR Sondenkit verhält sich dies genau umgekehrt (s. Abb. 9).

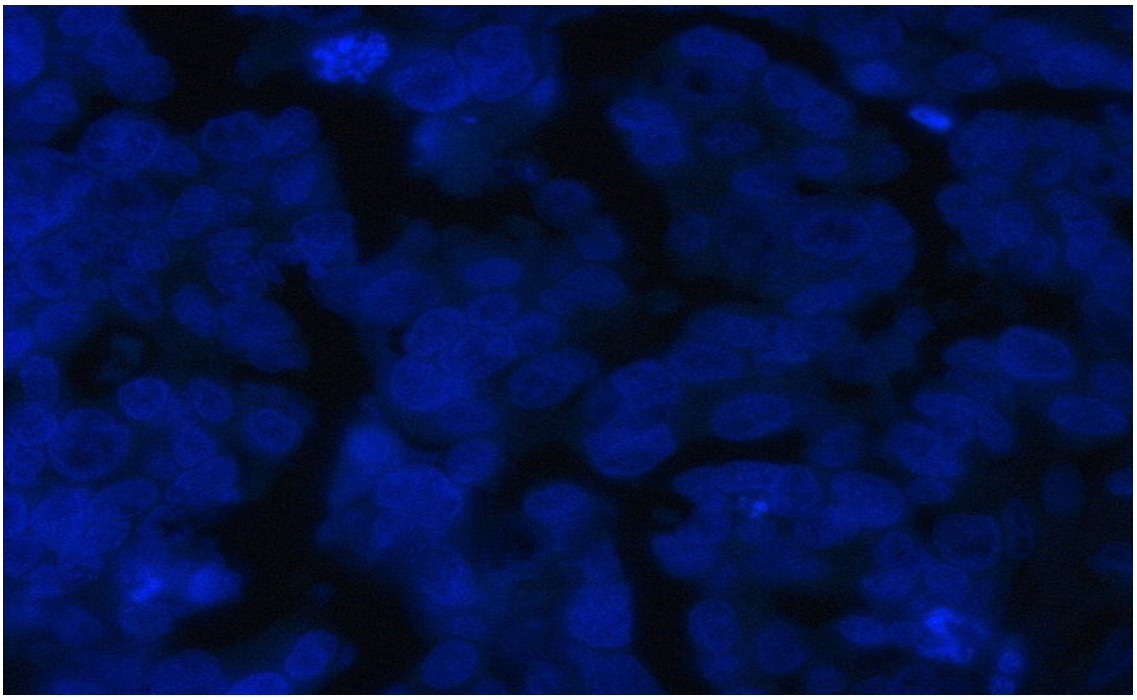


Abb. 2: Ansicht eines Tumorpräparates unter dem FISH-Mikroskop im Dapi-Filter

Zwischen den Filtern kann mit Hilfe einer Steuerungstastatur (Mac 5000, LEP) gewechselt werden. Es wird Immersionsöl auf das Deckglas des Präparates aufgetragen. Um sich auf dem Präparat zu orientieren, benutzt man die kleinste Vergrößerung (100-fach). Für die Auswertung selbst wird die 630-fache Vergrößerung verwendet, bei der das Objektiv in das Immersionsöl eintaucht. Im Dapi wurde dann zunächst ein Tumorzellkern ausgesucht, der nicht mit anderen Strukturen überlappt. Dann wurden die Gene und schließlich die Zentromere dieses Zellkerns gezählt. Nicht ausgewertet wurden Kerne, deren Grenzen nicht eindeutig feststellbar waren, deren Hintergrundfluoreszenzen zu stark, bzw. deren Signale zu schwach waren. Lagen zwei Signale mit einem geringeren Abstand als ihrem eigenen Durchmesser nebeneinander, handelte es sich um sog. Splitsignale, die als ein Signal zu werten sind. Um alle Signale, die in verschiedenen Ebenen liegen, erfassen zu können, musste jeder zu zählende Tumorkern mittels Feintrieb durchfokussiert werden. Pro Fall wurden jeweils 60 Tumorzellkerne ausgezählt.

*2.6.3.2.1 Beurteilung der Her-2/neu-Sonde*

Die Ergebnisse der Auswertungen wurden auf Formularen des Pathologischen Institutes der Universität München festgehalten und nach den Kriterien von Pauletti et al. (2000) sowie den neuen Empfehlungen von Wolff et al. (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists 2007, s. Abb. 3) beurteilt.
Diese besagen:

1. es liegt keine Genamplifikation vor, wenn der Quotient aus der Summe der Gensignale und der Summe der Zentromersignale (FISH-Quotient) weniger als 1,8 beträgt, oder der Quotient aus der Summe der Gensignale und der Anzahl der ausgezählten Kerne kleiner als 4,0 ist
2. es liegt eine Genamplifikation vor, wenn FISH-Quotient mehr als 2,2 beträgt, oder der Quotient aus der Summe der Gensignale und der Anzahl der ausgezählten Kerne größer als 6,0 ist
3. das Ergebnis ist nicht eindeutig wenn der FISH-Quotient 1,8 – 2,2 beträgt oder der Quotient aus der Summe der Gensignale und der Anzahl der ausgezählten Kerne bei 4,0 – 6,0 liegt.

4. eine Polysomie liegt vor, wenn der Quotient Gensignale/Zentromersignale kleiner 2,0 ist und der Quotient Zentromersignale/Summe der ausgezählten Kerne über 3,0 beträgt
5. eine Monosomie liegt vor, wenn über 50% der Zellkerne nur ein Gensignal und ein Zentromersignal aufweisen
6. eine Deletion liegt vor, wenn über 50% der Zellkerne ein Gensignal und zwei Zentromersignale aufweisen
7. eine Trisomie liegt vor, wenn über 50% der Zellkerne drei Gensignale und drei Zentromersignale aufweisen.

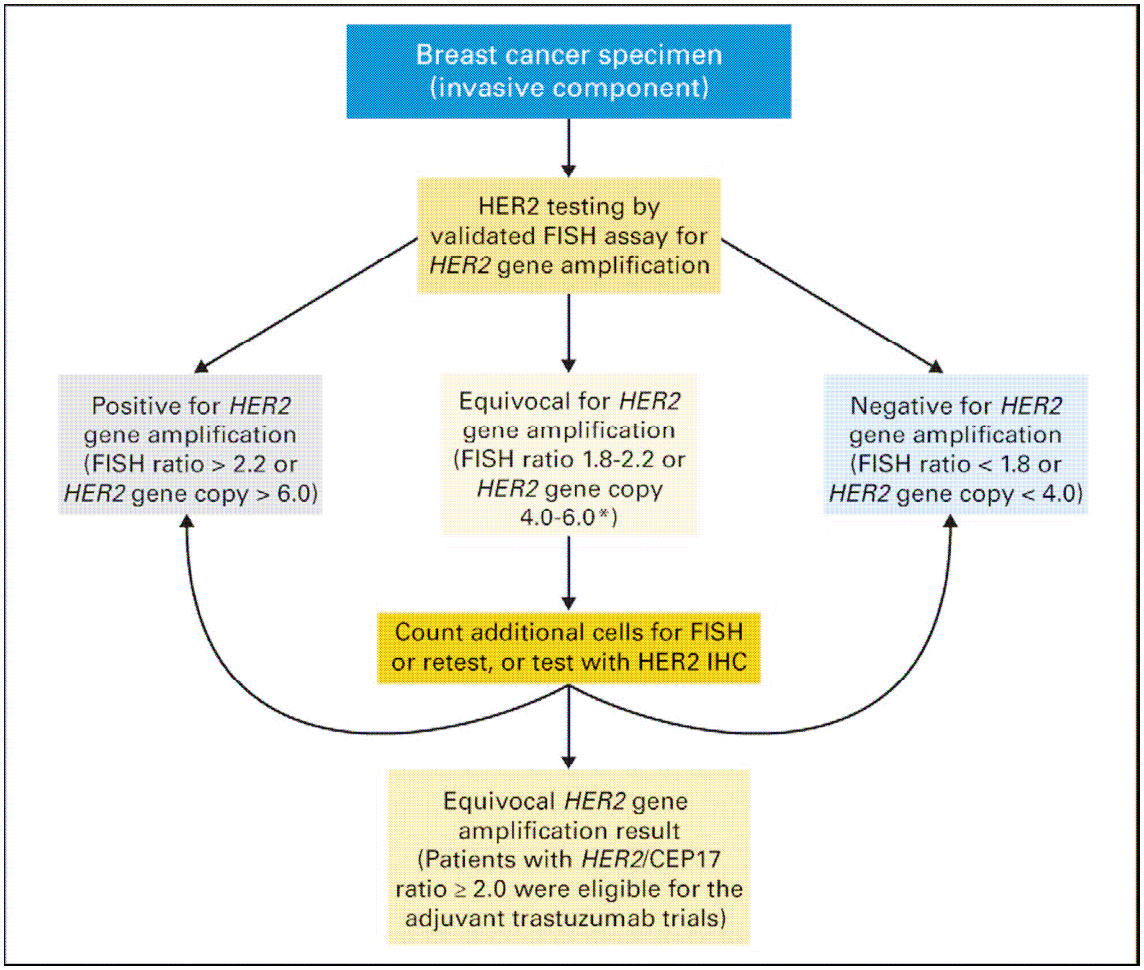



Abb. 3 : Algorithmus für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) beim Mammakarzinom (Wolff et al. 2007)

*2.6.3.2.2 Beurteilung der Topoisomerase IIα-Sonde*

Die Ergebnisse der Auswertungen wurden auf Formularen des Pathologischen Institutes der Universität München festgehalten und nach den Angaben der Firma Dako (Glostrup, Dänemark 2007) beurteilt:

1. Ein normaler Gensatz liegt vor, wenn der Quotient aus der Summe aller Gene und der Summe aller Zentromere zwischen 0,80 und weniger als 2,00 liegt

2. Eine Deletion liegt vor, wenn dieser Quotient kleiner als 0,80 ist

3. Eine Amplifikation liegt vor, wenn dieser Quotient größer oder gleich 2,00 ist.

Ergebnisse, die bei 1,80-2.20 (für Amplifikationen) und 0,70-0,90 (für Deletionen) liegen, sollten mit Vorsicht bewertet werden. Entscheidet man sich für eine Amplifikation/Deletion, muss darauf geachtet werden, dass in der Auszählung nur ein kleiner Prozentsatz normaler Kerne vorhanden ist.
Für die Fälle einer Polysomie, Trisomie oder Monosomie wurden die Regeln von Pauletti et al. (2000), wie unter 2.5.3.2.1 beschrieben, angewandt.

*2.6.3.2.3 Beurteilung der EGFR-Sonde*

Die Ergebnisse der Auswertungen wurden auf Formularen des Pathologischen Institutes der Universität München festgehalten und nach Cappuzzo et al. (2005) folgendermaßen beurteilt:

1. Eine Disomie liegt vor, wenn in mehr als 90% der Tumorzellen 2 oder weniger Genkopien vorhanden sind

2. Eine schwache Trisomie liegt vor, wenn in 40% oder mehr der Tumorzellen 2 oder weniger Genkopien vorhanden sind, sich 3 Genkopien in 10-40% der Tumorzellen finden und 4 oder mehr Genkopien in weniger als 10% der Tumorzellen sind.

3. Eine hohe Trisomie liegt vor, wenn in 40 oder mehr Prozent der Tumorzellen 2 oder weniger Genkopien vorhanden sind, sich 3 Genkopien in 40% oder mehr der Tumorzellen finden und 4 oder mehr Genkopien in weniger als 10% der Tumorzellen sind.

4. Eine schwache Polysomie liegt vor, wenn 4 oder mehr Genkopien in 10-40% der Tumorzellen zu finden sind

5. Eine hohe Polysomie liegt vor, wenn 4 oder mehr Genkopien in 40% oder mehr der Tumorzellen vorhanden sind

6. Eine Amplifikation liegt vor, wenn:
   - 15 und mehr Genkopien in 10% und mehr der Tumorzellen sind
   - Gencluster vorliegen und der Quotient Summe aller Gene/Summe aller Zentromere 2 oder mehr beträgt.

### *2.6.4 Statistische Auswertung*

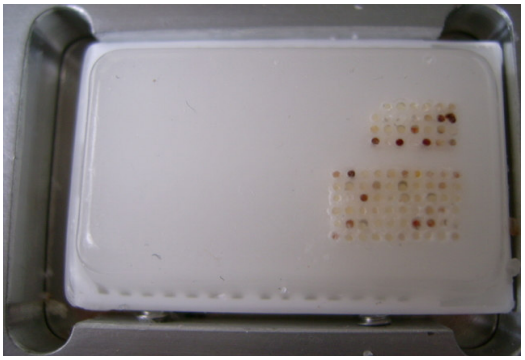
Dokumentation und statistische Auswertung erfolgten durch die SPSS Software Version 16.0. Zur Anwendung kamen Kreuztabellen, bei denen Chi-Quadrat zur Berechnung der Signifikanzen verwendet wurde. Die Berechnungen zum Überleben wurden mittels Kaplan-Meier-Überlebensanalyse (1958) angefertigt, deren Signifikanz der Log Rank Test anzeigte.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Tissue Microarrays

Von 243 Fällen aus den Jahren 1991 bis 2003 wurden insgesamt 3 Blöcke angefertigt (s. Abb. 4). Nach einer kurzen Einlernphase war die Stanzprozedur schnell und einfach zu bewerkstelligen. Jeder der Fälle war mit 2 Stanzen pro Block repräsentiert.

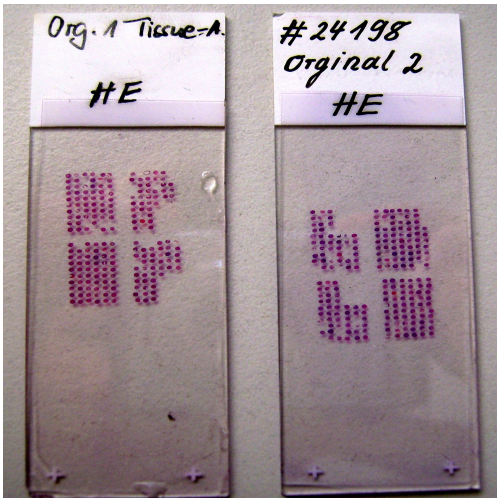
Abb. 4: Makroskopische Aufnahme des Tissue Microarray Blockes 3 nach Fertigstellung einer Hälfte



## 3.2 Tumorgehalt der einzelnen Stanzen und Verlust von Stanzenmaterial

Die HE-Schnitte dienten der Bewertung des Tumorgehalts und entsprachen jeweils der obersten Schnittebene der TMA-Blöcke (s. Abb. 5).

Abb. 5: HE-Schnitte von Block 1 (li) und Block 2 (re)



94,7% der Stanzenpaare wiesen in mindestens einer der beiden Stanzen Tumorgewebe auf. Von 243 Stanzenpaaren enthielten 6 (2,5%) kein Tumorgewebe und 5 (2,1%) gingen verloren. In 2 Fällen (0,8%) fehlte eine der Stanzen und die andere enthielt kein Tumorgewebe (s. Tab. 6). Fehlende Stanzen oder solche ohne Tumorgewebe wurden auf den Lageplänen markiert, um sie später leichter zu identifizieren.

Tab. 6: Tumorgehalt der Stanzen in der HE-Färbung

| **Qualität der Stanzen** | **Anzahl** |
|---|---|
| beide Stanzen nicht vorhanden | 5 (2,1%) |
| beide Stanzen ohne Tumorgewebe | 6 (2,5%) |
| eine Stanze fehlt, eine ohne Tumorgewebe | 2 (0,8%) |
| mind. eine Stanze mit Tumorgewebe | 230 (94,7%) |
| HE-Färbungen auswertbar | 230 |

Bei den Bearbeitungsschritten für die immunhistochemischen Färbungen und Hybridisierungen kam es infolge von thermischer und mechanischer Beanspruchung zum Verlust von Stanzen. Je weiter sich die Schnittebenen der einzelnen Schnitte von der Schnittebene der HE-Färbung entfernten, fanden sich auch des öfteren weitere Stanzen ohne Tumorgewebe (s Tab. 7). Ein Fall ging in die Bewertung ein, wenn eine Stanze eines Stanzenpaares ausreichend Tumorgewebe aufwies.

Tab. 7: Verlust von Stanzen und Stanzen ohne Tumormaterial in der IHC und FISH

| | Untersuchung | Stanzen vorhanden | Stanzen fehlen/enthalten kein Tumorgewebe |
|---|---|---|---|
| **IHC** | Her-2 | 241 (99,2%) | 2 (0,8%) |
| | Topoisomerase IIα | 223 (91,8%) | 20 (8,2%) |
| | EGFR | 229 (94,2%) | 14 (5,8%) |
| **FISH** | Her-2/neu | 233 (95,9%) | 10 (4,1%) |
| | Topoisomerase IIα | 231 (95,1%) | 12 (4,9%) |
| | ErbB1 | 230 (94,7%) | 13 (5,3%) |

### 3.3 Auswertbarkeit der Untersuchungen

Probleme bezüglich der Auswertbarkeit ergaben sich nur bei den FISH-Untersuchungen (vgl. Tab. 8). Eine schlechte Qualität der Hybridisierung führte zum Ausschluss eines Falles aus der Auswertung. Nicht ausgewertet wurden Fälle mit zu starker Hintergrundfluoreszenz, bzw. zu schwachen Signalen und Fälle, in denen Gen- und Zentromersignal nicht eindeutig einander zuordenbar waren. Außerdem durften sich die Tumorkerne nicht überschneiden und pro Fall mussten 60 Kerne ausgezählt werden können.

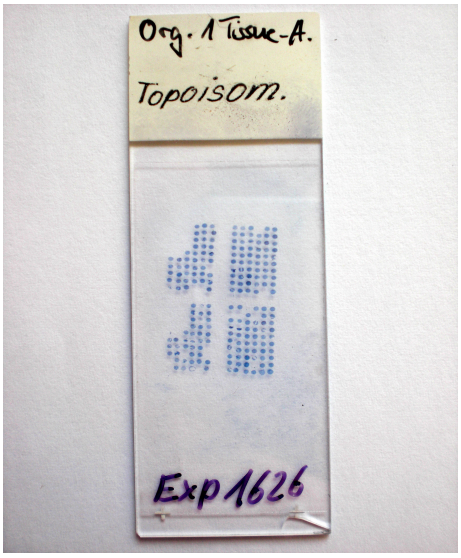
Tab. 8: Auswertbarkeit der Fälle in der IHC und FISH

| | Untersuchung | Fälle auswertbar | Fälle nicht auswertbar |
|---|---|---|---|
| **IHC** | Her-2 | 241 (100%) | 0 (0,0%) |
| | Topoisomerase IIα | 223 (100%) | 0 (0,0%) |
| | EGFR | 229 (100%) | 0 (0,0%) |
| **FISH** | Her-2/neu | 229 (98,3%) | 4 (1,7%) |
| | Topoisomerase IIα | 227 (98,3%) | 4 (1,7%) |
| | ErbB1 | 222 (96,5%) | 8 (3,5%) |

### 3.4 Ergebnisse der Immunhistochemie

Abb. 6 zeigt beispielhaft ein immunhistochemisch angefärbtes Präparat.

Abb.6: Immunhistochemische Topoisomerase IIα-Färbung (Block 1)




*3.4.1 Her-2-Test*

Alle 241 vorhandenen Fälle konnten ausgewertet werden (s. Tab. 9).

Tab. 9: Ergebnisse des Her-2-Tests

| | **0** | **1+** | **2+** | **3+** | **fehlende Fälle** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Anzahl der Fälle** | 195 (80,2%) | 33 (13,6%) | 9 (3,7%) | 4 (1,6%) | 2 (0,8%) |
| **Gesamt** | 241 (99,2%) | | | | 2 (0,8%) |

Somit waren 228 (93,8%) Fälle negativ (0 und 1+) und 9 (3,7%) Fälle unklar bzw. schwach positiv (2+). 4 (1,6%) Fälle zeigten eine deutliche Proteinüberexpression (3+).

### *3.4.2 Topoisomerase IIα-Test*

Alle 227 vorhandenen Fälle konnten ausgewertet werden (s. Tab. 10).

Tab. 10: Ergebnisse des IHC-Tests auf Topoisomerase IIα

| | **geringe Expression** | **mittlere Expression** | **starke Expression** | **fehlende Fälle** |
|---|---|---|---|---|
| **Anzahl der Fälle** | 125 (51,5%) | 98 (40,4%) | 4 (1,6%) | 16 (6,6%) |
| **Gesamt** | 227 (93,4%) | | | 16 (6,6%) |

Eine starke Expression zeigten 4 Fälle (1,6%), eine mittlere 98 Fälle (40,4%) und eine geringe 125 Fälle (51,5%).

### *3.4.3 EGFR-Test*

Alle 229 vorhandenen Fälle konnten ausgewertet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Ergebnisse des IHC-Tests auf den EGF-Rezeptor

| | **positiv** | **negativ** | **fehlende Fälle** |
|---|---|---|---|
| **Anzahl der Fälle** | 30 (12,3%) | 199 (81,9%) | 14 (5,8%) |
| **Gesamt** | 229 (94,2%) | | 14 (5,8%) |

30 Fälle (12,3%) waren EGFR-positiv und 199 Fälle (81,9%) EGFR-negativ.

## 3.5 Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

### *3.5.1 Her-2/neu*

Von 243 Fällen konnten 229 (94,2%) ausgewertet werden.

Bei der Auswertung von Her-2/neu fand sich in 10 Fällen (4,1%) eine Amplifikation (s. beispielhaft Abb. 7) und 4 Fälle (1,6%) erwiesen sich als unklar, da der FISH-Quotient zwischen 1,8 und 2,2 lag. 5 Fälle (2,1%) zeigten eine Polysomie, wobei nur 4 Fälle

auch in der Auswertung der Topoisomerase IIα polysom waren. Eine Monosomie konnte in 26 Fällen (10,7%) festgestellt werden (s. Tab. 12).

Tab. 12: Ergebnisse der FISH-Untersuchung auf das Her-2/neu-Gen

| | **normal** | **unklar** | **Amplifikation** | **Polysomie** | **Monosomie** | **Summe der fehlenden und nicht auswertbaren Fälle** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Anzahl der Fälle** | 184 (75,7%) | 4 (1,6%) | 10 (4,1%) | 5 (2,1%) | 26 (10,7%) | 14 (5,8%) |
| **Gesamt** | 229 (94,2%) | | | | | 14 (5,8%) |

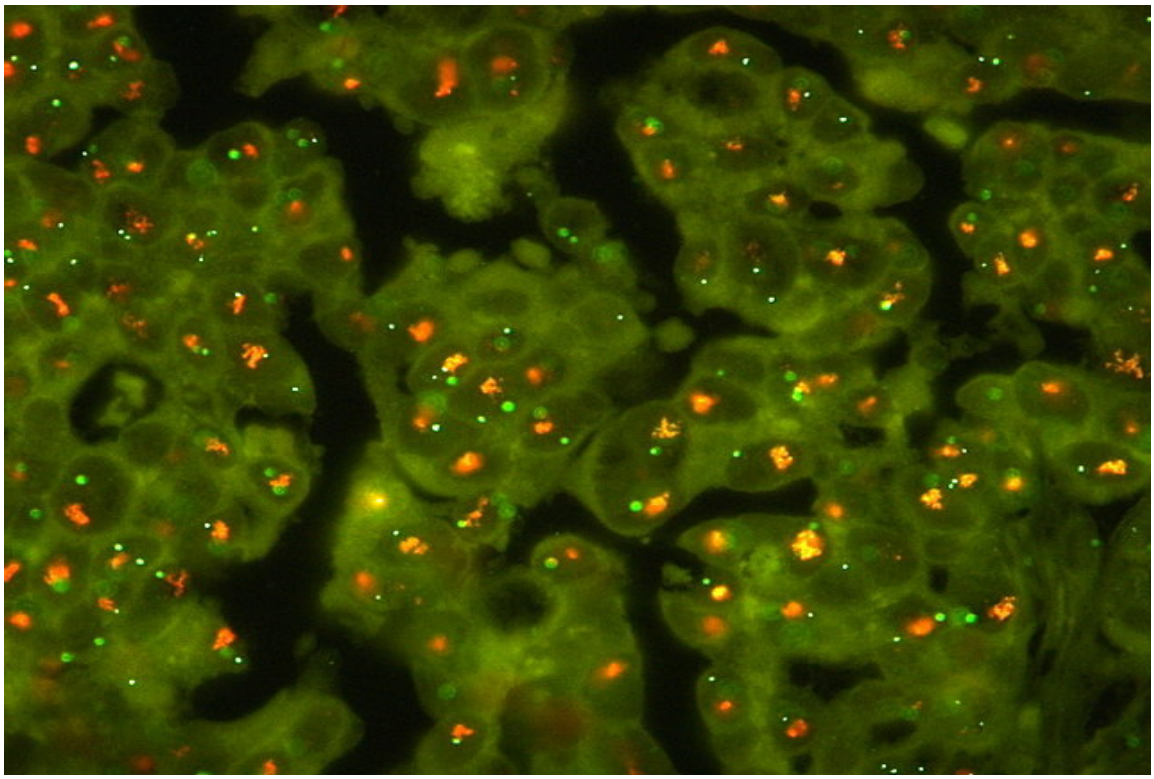


Abb. 7: Her-2/neu-Genamplifikation in Form von Clustern. Ansicht unter dem FISH-Mikroskop im FITC- und TRITC-Filter (Gene rot, Zentromere grün)

### *3.5.2 Topoisomerase IIα*

Von 243 Fällen konnten 227 (93,5%) ausgewertet werden.

In 5 Fällen (2,1%) lag eine Genamplifikation vor (vgl. Abb. 8). In den 227 ausgewerteten Fällen fand sich nur eine Deletion (0,4%). Außerdem konnte in 8 Fällen (3,3%) eine Polysomie und in 33 Fällen (13,6%) eine Monosomie festgestellt werden. 23 der monosomen Fälle deckten sich auch mit den Monosomien in der Her-2/neu-Auswertung (s. Tab. 13).

Tab. 13: Ergebnisse der FISH-Untersuchung auf das Topoisomerase IIα-Gen

| | **normal** | **Amplifikation** | **Deletion** | **Polysomie** | **Monosomie** | **Summe der fehlenden und nicht auswertbaren Fälle** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Anzahl der Fälle** | 180 (74,1%) | 5 (2,1%) | 1 (0,4%) | 8 (3,3%) | 33 (13,6%) | 16 (6,5%) |
| **Gesamt** | 227 (93,5%) | | | | | 16 (6,5%) |

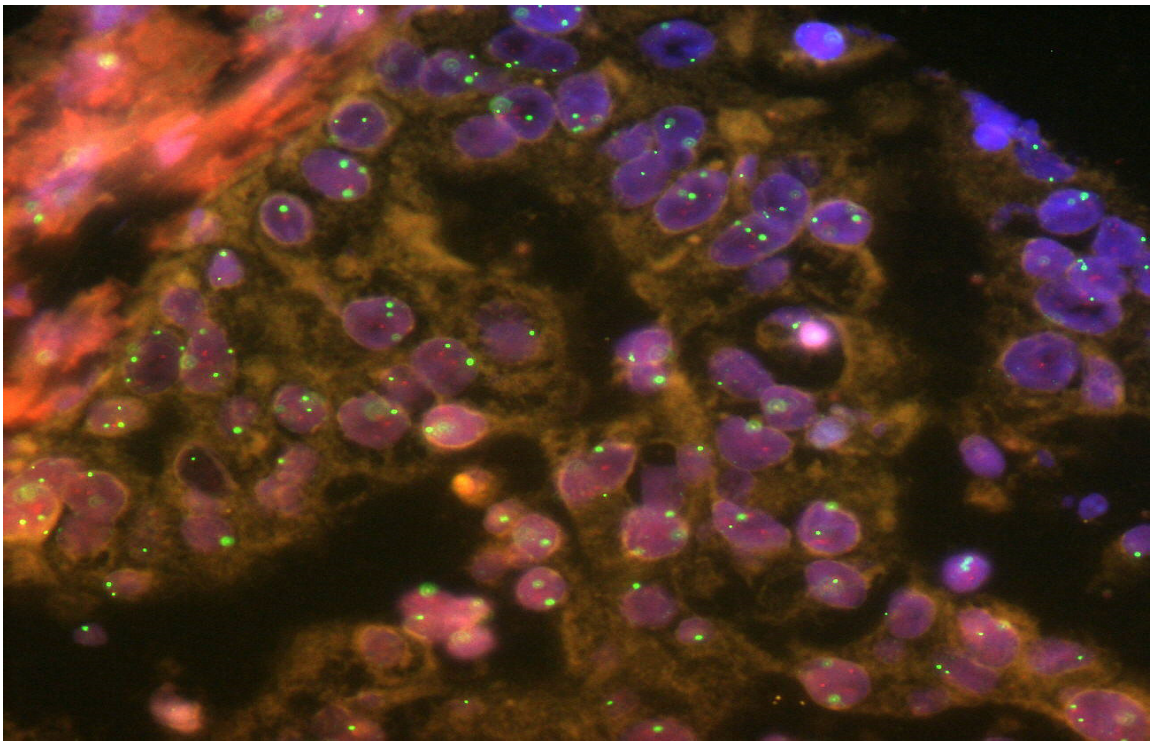


Abb. 8: Topoisomerase IIα-Amplifikation. Ansicht unter dem FISH-Mikroskop im FITC- und TRITC-Filter (Gene rot, Zentromere grün)

### *3.5.3 ErbB1*

Von 243 Fällen konnten 222 (91,4%) ausgewertet werden. In der Auswertung zeigte kein Fall eine Amplifikation. Als positiv konnten somit die 24 Fälle (9,9%) der hohen Polysomie bewertet werden. Ein großer Anteil der 222 ausgewerteten Fälle wurde in die Kategorie schwache Trisomie eingeordnet (84 Fälle, 34,4%) (s. Tab. 14). Abb. 9 zeigt einen Fall mit schwacher ErbB1-Polysomie.

Tab. 14: Ergebnisse der FISH-Untersuchung auf das ErbB1-Gen

| | **Disomie** | **schwache Trisomie** | **hohe Trisomie** | **schwache Polysomie** | **hohe Polysomie** | **Summe der fehlenden und nicht auswertbaren Fälle** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Anzahl der Fälle** | 46 (18,9%) | 84 (34,6%) | 6 (2,5%) | 62 (25,5%) | 24 (9,9%) | 21 (8,6%) |
| **Gesamt** | 222 (91,4%) | | | | | 21 (8,6%) |

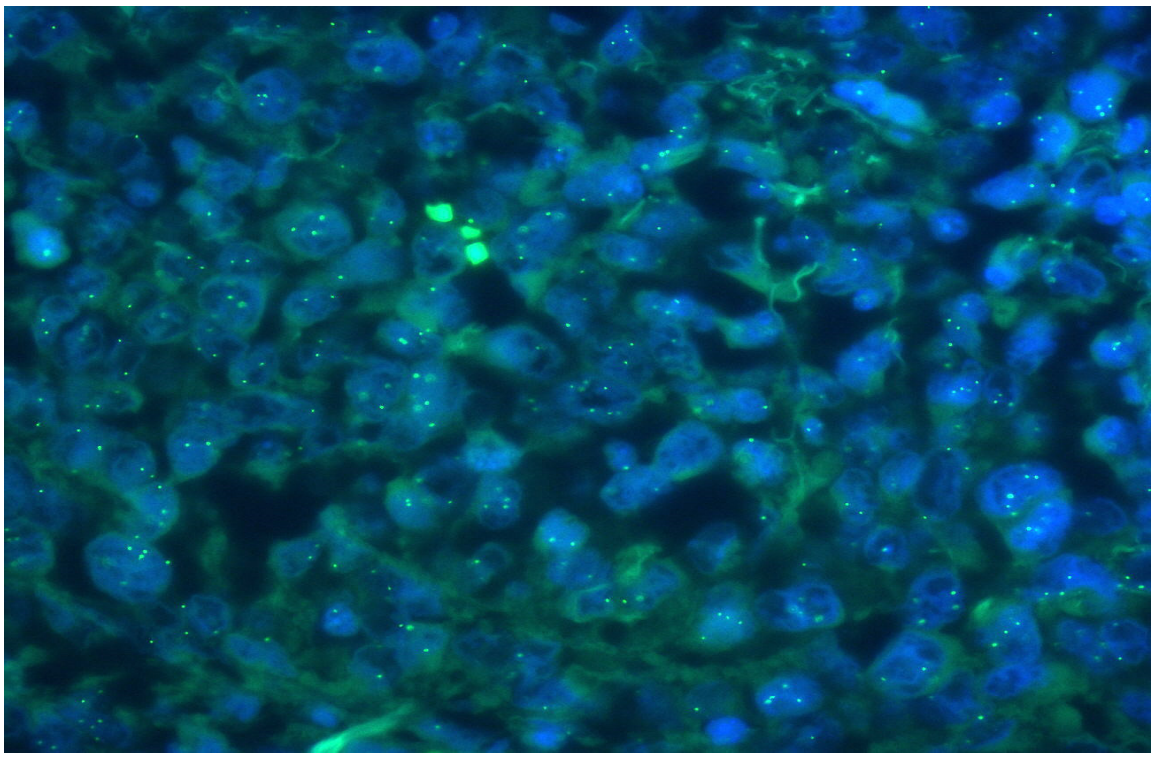


Abb. 9: Mit der EGFR-Sonde hybridisiertes Tumorpräparat: im FITC-Filter leuchten die Gene grün und zeigen eine schwache Polysomie

## 3.6 Vergleich der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen

### *3.6.1 Her-2/neu und Topoisomerase IIα*

225 Fälle (92,6%) konnten in der FISH des Her-2/neu-Genes und des Topoisomerase IIα Genes gegenübergestellt werden. 18 Fälle (7,4%) mussten mangels gleichzeitig zur Verfügung stehender Daten (Stanzenverlust oder keine Auswertbarkeit) ausgeschlossen werden. Der Vergleich ergab eine hohe Signifikanz ($p < 0,0005$).

Tab. 15: Kreuztabelle der FISH-Untersuchungen auf Her-2/neu und Topoisomerase IIα

| **FISH: Her-2/neu** | **Anzahl der Fälle** | **FISH: Topoisomerase IIα** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **normal** | **Amplifikation** | **Deletion** | **Polysomie** | **Monosomie** |
| **normal** | 180 (80,0%) | 169 (75,1%) | 0 (0,0%) | 1 (0,4%) | 0 (0,0%) | 10 (4,4%) |
| **Amplifikation** | 10 (4,4%) | 3 (1,3%) | 4 (1,8%) | 0 (0,0%) | 3 (1,3%) | 0 (0,0%) |
| **unklar** | 4 (1,8%) | 2 (0,9%) | 1 (0,4%) | 0 (0,0%) | 1 (0,4%) | 0 (0,0%) |
| **Polysomie** | 5 (2,2%) | 1 (0,4%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 4 (1,8%) | 0 (0,0%) |
| **Monosomie** | 26 (11,6%) | 3 (1,3%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 23 (10,2%) |
| **Gesamt** | 225 (100%) | 178 (79,1%) | 5 (2,2%) | 1 (0,4%) | 8 (3,6%) | 33 (14,7%) |

In 4 Fällen (1,8%) lag eine Koamplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase IIα vor. In 6 Fällen (2,6%) war Her-2/neu amplifiziert und die Topoisomerase IIα normal (3 Fälle), oder polysom (3 Fälle).

4 Fälle (1,8%) zeigten übereinstimmend eine Polysomie. In einem Fall (0,4%) der Her-2/neu-Auswertung und in 4 Fällen (1,8%) der Topoisomerase IIα-Auswertung zeigten sich weitere Polysomien. 3 Fälle (1,3%) einer Her-2/neu-Genamplifikation deckten sich mit einer Topoisomerase IIα-Polysomie.

23 Fälle (10,2%) wiesen übereinstimmend in beiden Untersuchungen eine Monosomie auf. In 3 Fällen (1,3%) der Her-2/neu Auswertungen und in 10 Fällen (4,4%) der Topoisomerase IIα Auswertungen traten weitere Monosomien auf, die in der jeweils anderen Untersuchung als normal bewertet wurden (vgl. Tab. 15).

### *3.6.2 Her-2/neu und ErbB1*

221 Fälle (90,9%) konnten in der FISH des Her-2/neu-Genes und ErbB1-Genes gegenübergestellt werden. 22 Fälle (9,1%) mussten mangels gleichzeitig zur Verfügung stehender Daten (Stanzenverlust oder keine Auswertbarkeit) ausgeschlossen werden. Bei diesem Vergleich lag ein Trend zur Signifikanz vor ($p = 0,045$).

Tab. 16: Kreuztabelle der FISH-Untersuchungen auf Her-2/neu und ErbB1

| **FISH: Her-2/neu** | **Anzahl der Fälle** | **FISH: ErbB1** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Disomie** | **schwache Trisomie** | **hohe Trisomie** | **schwache Polysomie** | **hohe Polysomie** |
| **normal** | 178 (80,5%) | 37 (16,7%) | 66 (29,9%) | 5 (2,3%) | 52 (23,5%) | 18 (8,1%) |
| **Amplifikation** | 10 (4,5%) | 0 (0,0%) | 4 (1,8%) | 0 (0,0%) | 3 (1,4%) | 3 (1,4%) |
| **unklar** | 4 (1,8%) | 0 (0,0%) | 1 (0,5%) | 0 (0,0%) | 3 (1,4%) | 0 (0,0%) |
| **Polysomie** | 5 (2,3%) | 0 (0,0%) | 1 (0,5%) | 0 (0,0%) | 2 (0,9%) | 2 (0,9%) |
| **Monosomie** | 24 (10,9%) | 9 (4,1%) | 12 (5,4%) | 1 (0,5%) | 1 (0,5%) | 1 (0,5%) |
| **Gesamt** | 221 (100%) | 46 (20,8%) | 84 (38,0%) | 6 (2,7%) | 61 (27,6%) | 24 (10,9%) |

3 Her-2/neu-Amplifikationen (1,4%) trafen auf 3 hohe Polysomien in der ErbB1 Auswertung. Die restlichen hohen Polysomien lagen in Kombination mit einem normalen Genstatus von Her-2/neu (18 Fälle), einer Polysomie (2 Fälle) oder einer Monosomie (1 Fall) vor. 4 weitere Fälle (1,8%) einer Her-2/neu-Genamplifikation waren schwach trisom hinsichtlich des ErbB1 Genes. 3 Her-2/neu-Amplifikationen trafen auf eine schwache Polysomie in der ErbB1-Auswertung (vgl. Tab. 16).

### *3.6.3 Topoisomerase IIα und ErbB1*

220 Fälle (90,5%) konnten in der FISH des ErbB1-Genes und des Topoisomerase IIα-Genes gegenübergestellt werden. 23 Fälle (9,5%) konnten mangels gleichzeitig zur Verfügung stehender Daten (Stanzenverlust oder keine Auswertbarkeit) nicht

berücksichtigt werden. Dieser Vergleich zeigte einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,0005$).

Tab. 17: Kreuztabelle der FISH-Untersuchungen auf Topoisomerase IIα und ErbB1

| **FISH: Topoiso-merase IIα** | **Anzahl der Fälle** | **FISH: ErbB1** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Disomie** | **schwache Trisomie** | **hohe Trisomie** | **schwache Polysomie** | **hohe Polysomie** |
| **normal** | 175 (79,5%) | 33 (15,0%) | 66 (30,0%) | 5 (2,3%) | 53 (24,1%) | 18 (8,2%) |
| **Amplifikation** | 5 (2,3%) | 0 (0,0%) | 3 (1,4%) | 0 (0,0%) | 2 (0,9%) | 0 (0,0%) |
| **Deletion** | 1 (0,5%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 1 (0,5%) |
| **Polysomie** | 8 (3,6%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 4 (1,8%) | 4 (1,8%) |
| **Monosomie** | 31 (14,1%) | 12 (5,5%) | 15 (6,8%) | 1 (0,5%) | 3 (1,4%) | 0 (0,0%) |
| **Gesamt** | 220 (100%) | 45 (20,5%) | 84 (38,2%) | 6 (2,7%) | 62 (28,2%) | 23 (10,5%) |

In 4 Fällen (1,8%) zeigten sich bei der Topoisomerase IIα eine Polysomie und bei ErbB1 eine hohe Polysomie. In 4 weiteren Fällen einer Topoisomerase IIα-Polysomie konnte gleichzeitig eine schwache Polysomie in der ErbB1-Auswertung gefunden werden. 18 ( 8,2%) Fälle in der ErbB1-Auswertung zeigten sich hoch polysom, während sich der Topoisomerase IIα-Genstatus als normal erwies. Die einzige Deletion von Topoisomerase IIα lag in Kombination mit einer hohen Polysomie in der ErbB1 Auswertung vor (vgl. Tab. 17).

## 3.7 Vergleich zwischen Proteinexpression und Genaberration

### *3.7.1 Her-2 und Her-2/neu*

Im Vergleich des Genstatus mit der Proteinexpression von Her-2/neu lag eine hohe Signifikanz ($p < 0,0005$) vor. 229 Fälle (94,2%) wurden miteinander verglichen, 14

Fälle (5,8%) mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden (Stanzenverlust oder keine Auswertbarkeit).

Tab. 18: Kreuztabelle der FISH- und IHC-Untersuchung auf Her-2/neu und Her-2

| **FISH: Her-2/neu** | **Anzahl der Fälle** | **Her-2-Test** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **0** | **1+** | **2+** | **3+** |
| **normal** | 184 (80,3%) | 152 (66,4%) | 29 (12,7%) | 3 (1,3%) | 0 (0,0%) |
| **Amplifikation** | 10 (4,4%) | 2 (0,9%) | 1 (0,4%) | 3 (1,3%) | 4 (1,7%) |
| **unklar** | 4 (1,7%) | 1 (0,4%) | 1 (0,4%) | 2 (0,9%) | 0 (0,0%) |
| **Polysomie** | 5 (2,2%) | 3 (1,3%) | 1 (0,4%) | 1 (0,4%) | 0 (0,0%) |
| **Monosomie** | 26 (11,4%) | 26 (11,4%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| **Gesamt** | 229 (100%) | 184 (80,3%) | 32 (14,0%) | 9 (3,9%) | 4 (1,7%) |

4 Fälle (1,7%) stellten sich in der FISH als amplifiziert dar und in der IHC als stark positiv (3+). In 3 amplifizierten Fällen (1,3%) ergab der Her-2-Test ein unklares Ergebnis (2+). 3 weitere Fälle mit Genamplifikationen (1,3%) zeigten einen negativen Her-2-Test (0 bzw. 1+).

Die 4 unklaren Fälle in der FISH verteilten sich in der IHC auf 0 (1x), 1+ (1x) und 2+ (2x).

Es lag in 5 Fällen (2,2%) ein Polysomie vor. Die zugehörigen IHC-Tests ergaben in 4 Fällen (1,7%) ein negatives (0/1+) und in einem Fall (0,4%) ein mäßig positives Ergebnis.

Die 26 monosomen Fälle (11,4%) wiesen einen negativen Her-2-Test (0) auf (vgl. Tab. 18).

### *3.7.2 Topoisomerase IIα*

Verglich man den Genstatus und die Proteinexpression der Topoisomerase IIα miteinander, war festzustellen, dass keine statistische Signifikanz erreicht wurde (p =

0,167). Es konnten 222 Fälle (91,4%) miteinander verglichen werden, 21 Fälle (8,6%) mussten ausgeschlossen werden (Stanzenverlust oder keine Auswertbarkeit).

Tab. 19: Kreuztabelle der FISH- und IHC-Untersuchung auf das Topoisomerase IIα-Gen und -Enzym

| **FISH: Topoisomerase IIα** | **Anzahl der Fälle** | **IHC: Topoisomerase IIα** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **geringe Expression** | **mittlere Expression** | **starke Expression** |
| **normal** | 176 (79,3%) | 100 (45,1%) | 73 (32,9%) | 3 (1,4%) |
| **Amplifikation** | 5 (2,3%) | 2 (0,9%) | 3 (1,4%) | 0 (0,0%) |
| **Deletion** | 1 (0,5%) | 0 (0,0%) | 1 (0,5%) | 0 (0,0%) |
| **Polysomie** | 8 (3,6%) | 2 (1,0%) | 6 (2,8%) | 0 (0,0%) |
| **Monosomie** | 32 (14,4%) | 18 (8,2%) | 13 (5,9%) | 1 (0,5%) |
| **Gesamt** | 222 (100%) | 122 (55,0%) | 96 (43,2%) | 4 (1,9%) |

3 Fälle (1,4%) einer starken Genexpression in der IHC trafen auf einen normalen Genstatus in der FISH. Eine starke Expression (0,5%) fiel mit einer Monosomie in der FISH zusammen. Somit zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen Genamplifikation und starker Expression. Immerhin 3 genamplifizierte Fälle (1,4%) wiesen in der IHC eine mittlere Expression der Topoisomerase IIα auf. Die beiden anderen amplifizierten Fälle zeigten in der IHC eine geringe Expression. Auch die polysomen Fälle in der FISH riefen keine starke Genexpression hervor, sondern in 6 Fällen (2,8%) eine mittlere und in 2 Fällen (1,0%) eine geringe Expression. Auch die einzige vorhandene Gendeletion stand mit einer mittleren Genexpression in Verbindung (vgl. Tab. 19).

### *3.7.3 EGFR und ErbB1*

Es konnten 217 Fälle (89,3%) verglichen werden, 26 Fälle (10,7%) konnten aus o.g. Gründen nicht gewertet werden. Bei diesem Vergleich lag kein Zusammenhang vor (p = 0,817).

Tab. 20: Kreuztabelle der FISH- und IHC-Untersuchung auf ErbB1 und EGFR

| **FISH: ErbB1** | **Anzahl der Fälle** | **IHC: EGFR** | |
|---|---|---|---|
| | | **negativ** | **positiv** |
| **Disomie** | 44 (20,3%) | 39 (18%) | 5 (2,3%) |
| **schwache Trisomie** | 82 (37,8%) | 73 (33,6%) | 9 (4,1%) |
| **hohe Trisomie** | 6 (2,8%) | 5 (2,3%) | 1 (0,5%) |
| **schwache Polysomie** | 61 (28,1%) | 51 (23,5%) | 10 (4,6%) |
| **hohe Polysomie** | 24 (11,1%) | 22 (10,1%) | 2 (0,9%) |
| **Gesamt** | 217 (100%) | 190 (87,6%) | 27 (12,4%) |

Lediglich in 2 Fällen (0,9%) konnte eine Übereinstimmung zwischen der FISH und der IHC festgestellt werden, im Sinne einer hohen Polysomie und eines positiven IHC-Tests. 22 der insgesamt 24 hoch polysomen Fälle fielen mit einem negativen IHC-Test zusammen. 168 Fälle (77,4%) waren sowohl in der FISH, als auch in der IHC negativ. In 9 IHC-positiven Fällen lag in der FISH eine schwache Trisomie vor und in 10 IHC-positiven Fällen lag in der FISH eine schwache Polysomie vor (vgl. Tab. 20).

## 3.8 Überleben

Von 190 Patientinnen (78,2%) war der Überlebensstatus bekannt, von 53 Patientinnen fehlten die Angaben. Von den 190 Fällen waren 138 Patientinnen (56,8%) zum Zeitpunkt der Datenerhebung verstorben, 52 (21,4%) lebten (s. Tab. 21). Das Follow-up wurde über einen Zeitraum von 0 - 184 Monaten erhoben.

Tab. 21: Allgemeiner Überlebensstatus der Patientinnen

| **Status** | **Anzahl der Fälle** | **Anzahl der Fälle ohne fehlendes follow up** |
|---|---|---|
| **lebt** | 52 (21,4%) | 52 (27,4%) |
| **verstorben** | 138 (56,8%) | 138 (72,6%) |
| **follow up fehlt** | 53 (21,8%) | |
| **Gesamt** | 243 (100%) | 190 (100%) |

Die Überlebensdauer wurde in kurz (< 3 Jahre), mittel (3-7 Jahre) und lang (> 7 Jahre) eingeteilt. Von den 138 verstorbenen Patientinnen wiesen 94 (68%) eine kurze Überlebenszeit auf, 37 (27 %) eine mittlere und 7 (5%) eine lange.

### *3.8.1 Korrelation zwischen IHC-Ergebnissen und der Überlebensdauer*

#### *3.8.1.1 Her-2 und das Überleben*

Die Her-2-Rezeptor Status ergab in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log Rank Test keine Signifikanz (p = 0,71).

Tab. 22: Die Her-2-Expression und das Überleben

| Her-2-Test:<br>0 = negativ<br>1 = negativ<br>2 = unklar<br>3 = positiv | Gesamtzahl | Anzahl der Todesfälle | Zensiert | |
|---|---|---|---|---|
| | | | N | Prozent |
| 0 | 180 | 106 | 74 | 41,1% |
| 1 | 32 | 22 | 10 | 31,2% |
| 2 | 7 | 5 | 2 | 28,6% |
| 3 | 4 | 3 | 1 | 25,0% |
| Gesamt | 223 | 136 | 87 | 39,0% |

Die Sterbefälle wiesen eine gleichmäßige prozentuale Verteilung auf. Zum Tode kam es in 59% bzw. 69% (106/180 und 22/32) der negativen Fälle (0 bzw. 1+), in 71% der unklaren Fälle (5/7) und in 75% der positiven Fälle (3/4) (s. Tab. 22).

Die positiven Fälle zeichnen sich durch eine kurze maximale Überlebenszeit aus, die an der Grenze zur mittleren Überlebenszeit liegt. Die negativen und unklaren Fälle zeigen eine lange Überlebenszeit (s. Abb. 10 und 11).

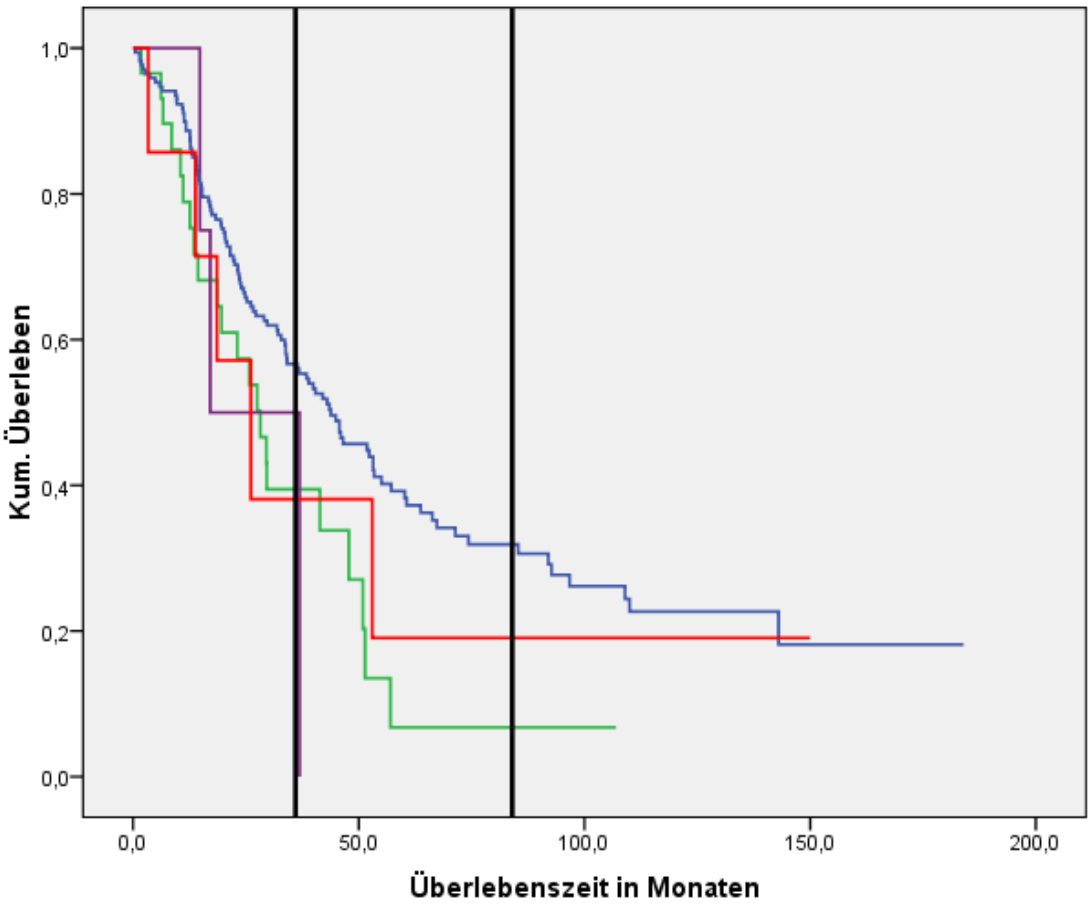



Abb. 10: Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der Her-2-Expression
negativ (0), negativ (1+), unklar (2+), positiv (3+)
Die beiden senkrechten schwarzen Linien kennzeichnen 3 und 7 Jahre

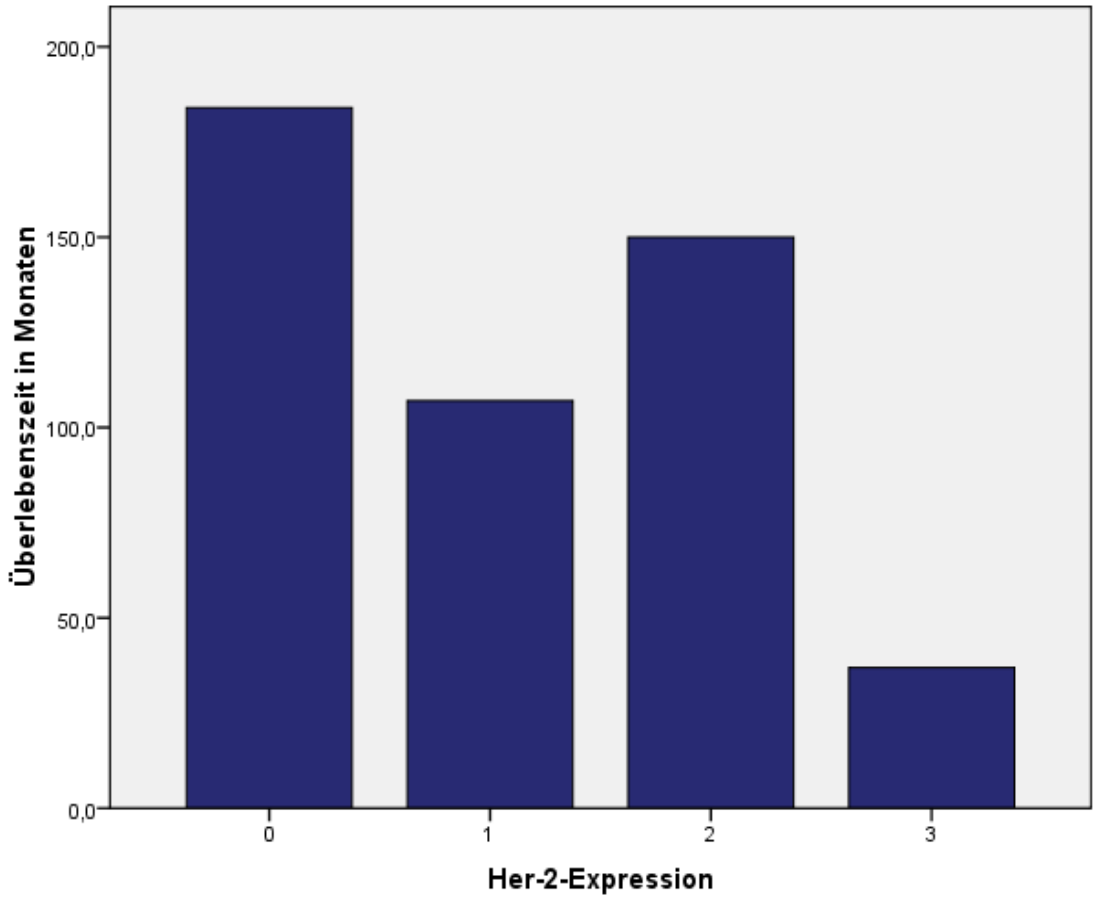



Abb. 11: Balkendiagramm: Überleben in Abhängigkeit von der Her-2-Expression
0 = negativ (0), 1 = negativ (1+), 2 = unklar (2+), 3 = positiv (3+)

### *3.8.1.2 Topoisomerase IIα und das Überleben*

Die Topoisomerase IIα-Expression ergab in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log Rank Test keine Signifikanz (p = 0,406).

Tab. 23: Die Topoisomerase IIα-Expression und das Überleben

| Topoiso-merase IIα Expression | Gesamtzahl | Anzahl der Todesfälle | Zensiert | |
|---|---|---|---|---|
| | | | N | Prozent |
| gering | 114 | 66 | 48 | 42,1% |
| mittel | 92 | 62 | 30 | 32,6% |
| stark | 4 | 2 | 2 | 50,0% |
| Gesamt | 210 | 130 | 80 | 38,1% |

In 58% der Fälle mit geringer Expression (66/114), in 67% der Fälle mit mittlerer Expression (62/92) und in 50% der Fälle mit starker Expression (2/4) kam es zum Tode (s. Tab. 23). Eine maximal mittlere Überlebenszeit wiesen die Fälle mit starker Expression auf. Eine lange Überlebenszeit zeigten die Fälle mit geringer und mittlerer Expression (s. Abb. 12 und 13).

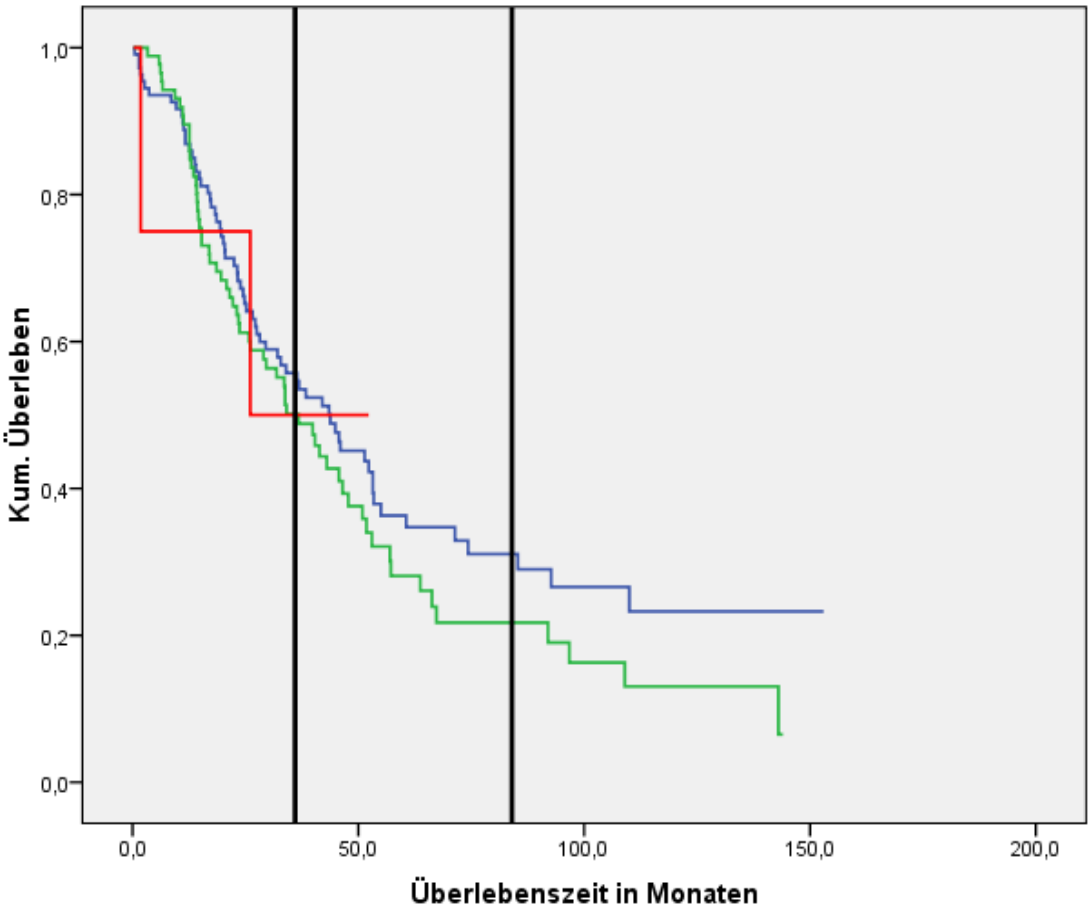



Abb. 12: Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der Topoisomerase IIα-Expression
geringe Expression, mittlere Expression, starke Expression
Die beiden senkrechten schwarzen Linien kennzeichnen 3 und 7 Jahre

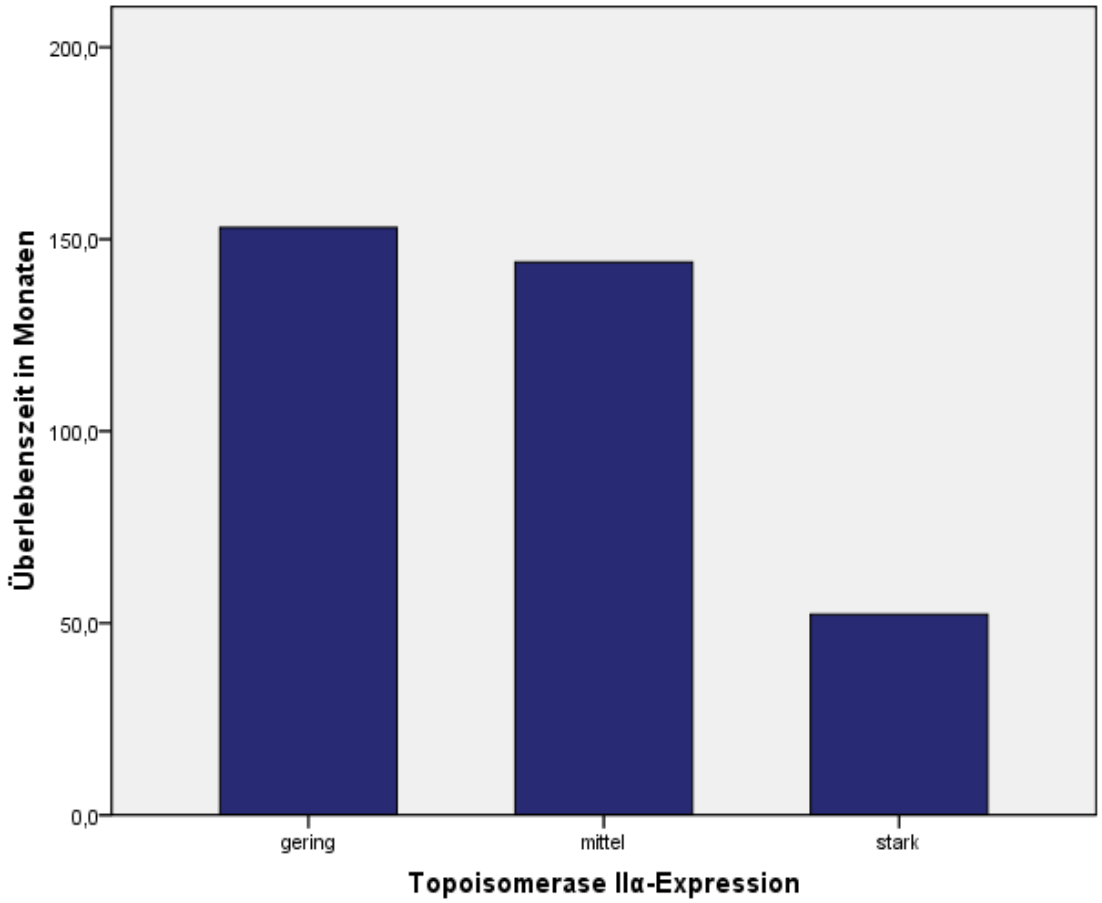



Abb. 13: Balkendiagramm: Überleben in Abhängigkeit von der Topoisomerase IIα-Expression

### *3.8.1.3 EGFR und das Überleben*

Auch der EGF-Rezeptor Status wies in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log Rank Test keine Signifikanz auf (p = 0,814).

Tab. 24: Die EGFR-Expression und das Überleben

| EGFR-Expression | Gesamtzahl | Anzahl der Todesfälle | Zensiert | |
|---|---|---|---|---|
| | | | N | Prozent |
| negativ | 185 | 117 | 68 | 36,8% |
| positiv | 30 | 16 | 14 | 46,7% |
| Gesamt | 215 | 133 | 82 | 38,1% |

Zum Tode kam es in 63% der negativen Fälle (117/185) und in 53% der positiven Fälle (16/30) (s. Tab. 24). Beide Gruppen wiesen eine lange Überlebensdauer auf (s. Abb. 14 und 15).

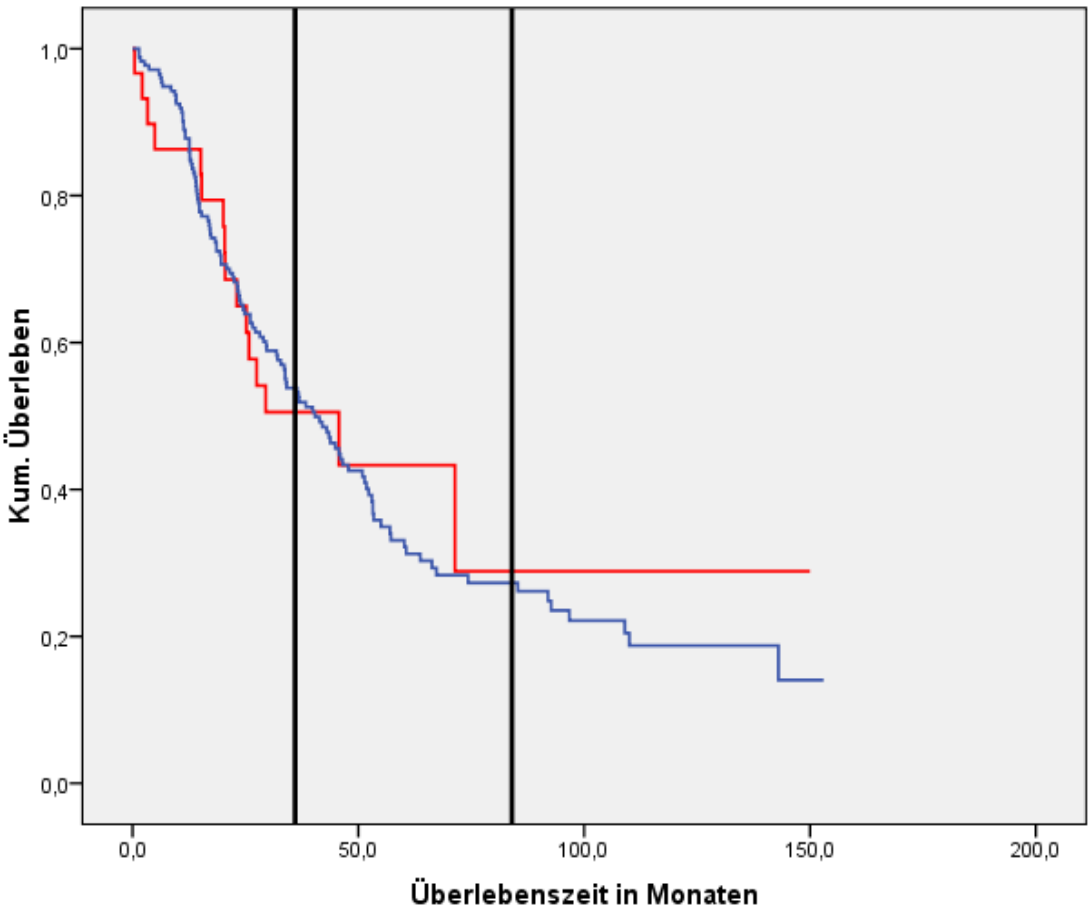



Abb. 14: Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der EGFR-Expression
negativ, positiv
Die beiden senkrechten schwarzen Linien kennzeichnen 3 und 7 Jahre

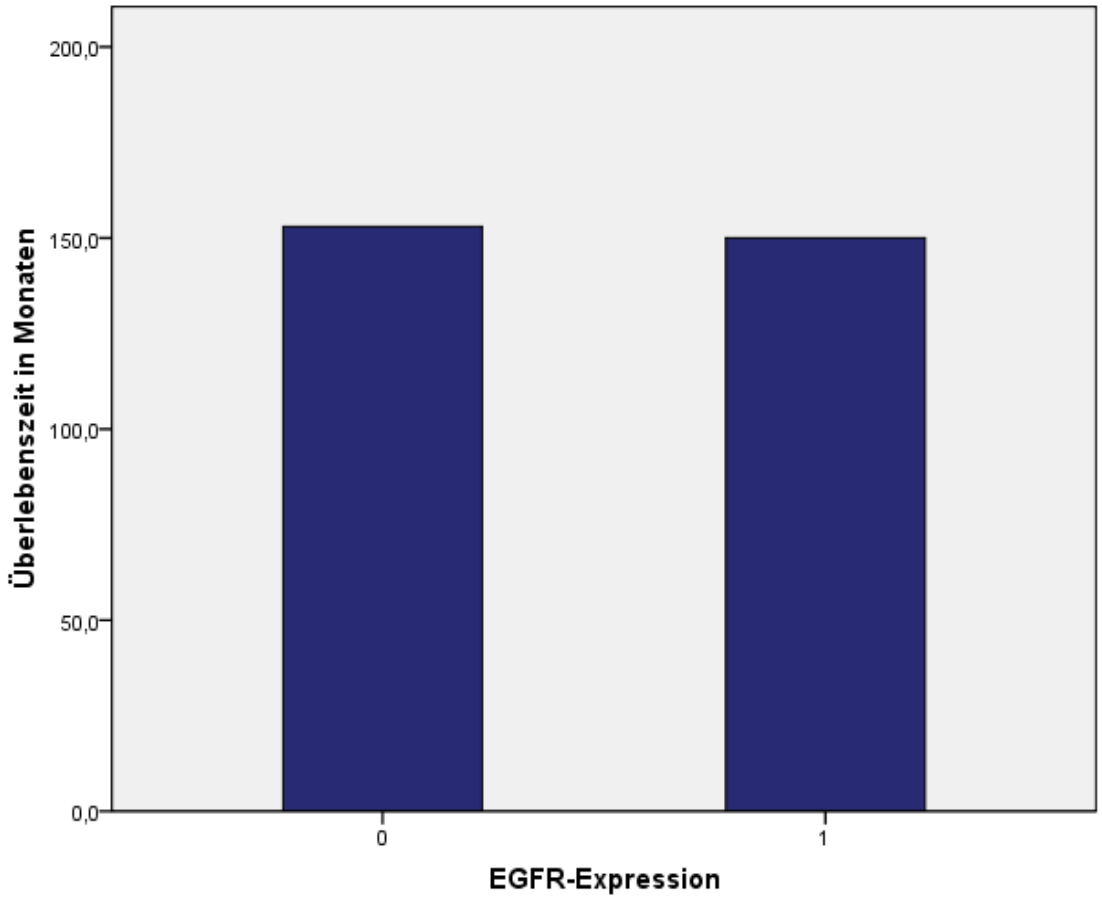



Abb. 15: Balkendiagramm: Überleben in Abhängigkeit von der EGFR-Expression
0 = negativ, 1 = positiv

*3.8.2 Korrelation zwischen FISH-Ergebnissen und der Überlebensdauer*

*3.8.2.1 Her-2/neu und das Überleben*

Bei der Betrachtung des Zusammenhangs des Her-2/neu-Status mit dem Überleben der Patientinnen in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ergab der Log Rank Test keine Signifikanz (p = 0,143).

In 78% der amplifizierten Fälle (7/9) waren die Patientinnen verstorben. In 100% der unklaren Fälle (3/3) und in 80% der polysomen Fälle (4/5) war es ebenfalls zum Tode gekommen (s. Tab 25).

Eine kurze Überlebensdauer von unter 3 Jahren wiesen alle unklaren Fälle auf. Die polysomen Fälle erreichten maximal eine mittlere Überlebensdauer und die Fälle mit

normalem oder amplifizierten Genstatus erreichten maximale Überlebensdauern von über 7 Jahren (s. Abb. 16 und 17).

Tab. 25: Der Her-2/neu-Status und das Überleben

| Her-2/neu:<br>0 = normal<br>1 = amplifiziert<br>2 = unklar<br>3 = polysom | Gesamtzahl | Anzahl der Todesfälle | Zensiert | |
|---|---|---|---|---|
| | | | N | Prozent |
| 0 | 195 | 117 | 78 | 40,0% |
| 1 | 9 | 7 | 2 | 22,2% |
| 2 | 3 | 3 | 0 | ,0% |
| 3 | 5 | 4 | 1 | 20,0% |
| Gesamt | 212 | 131 | 81 | 38,2% |

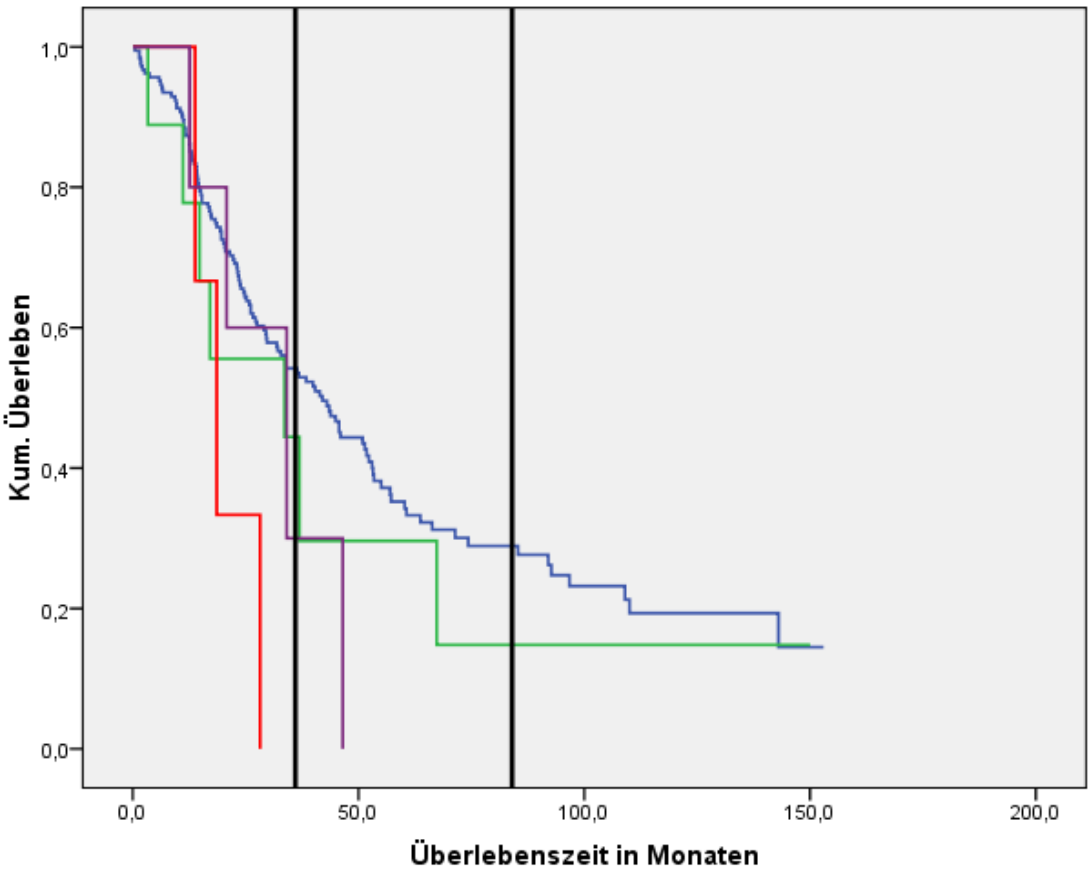



Abb.16: Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von dem Her-2/neu-Genstatus
normaler Genstatus, Amplifikation, unklar, Polysomie
Die beiden senkrechten schwarzen Linien kennzeichnen 3 und 7 Jahre

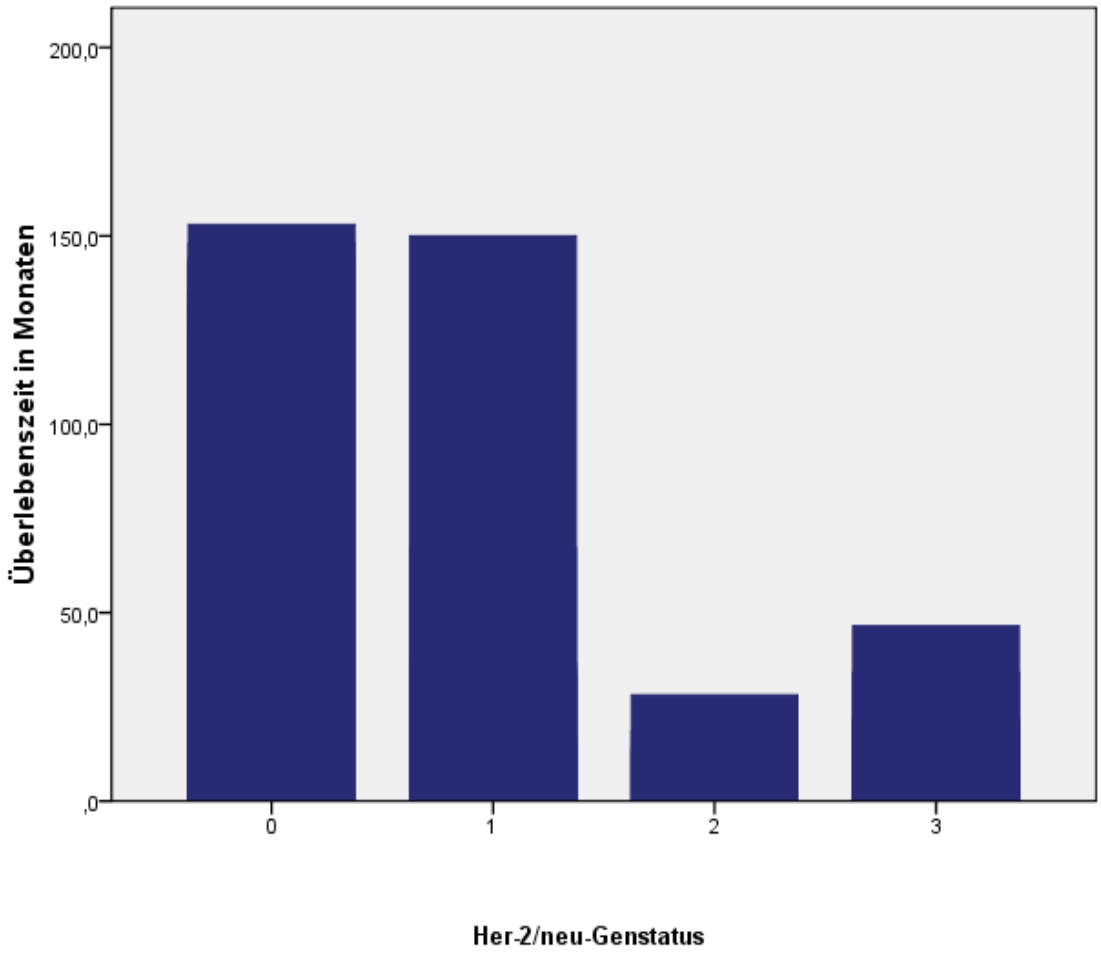



Abb. 17: Balkendiagramm: Überleben in Abhängigkeit von dem Her-2/neu-Genstatus
0 = normaler Genstatus, 1 = amplifiziert, 2 = unklar, 3 = polysom

*3.8.2.2 Topoisomerase IIα und das Überleben*

Zwischen dem Genstatus von Topoisomerase IIα und dem Überleben der Patientinnen konnte in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier laut Log Rank Test kein Zusammenhang festgestellt werden (p = 0,773).

In 75% der amplifizierten Fälle (3/4) waren die Patientinnen verstorben. Auch in 71% der polysomen Fälle (5/7) war es zum Tode gekommen (s. Tab. 26). Der Fall der Deletion lebte zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch. Unter den polysomen Fällen ergab sich eine maximal mittlere Überlebenszeit, genau wie im Falle der Deletion. Sowohl die amplifizierten Fälle, als auch die Fälle mit normalen Genstatus zeigten eine lange Überlebensdauer (s. Abb. 18 und 19).

Abb. 26: Der Topoisomerase IIα-Status und das Überleben

| Topoisomerase IIα:<br>0 = normal<br>1 = amplifiziert<br>2 = Deletion<br>3 = polysom<br>4 = monosom | Gesamtzahl | Anzahl der Todesfälle | Zensiert | |
|---|---|---|---|---|
| | | | N | Prozent |
| 0 | 166 | 100 | 66 | 39,8% |
| 1 | 4 | 3 | 1 | 25,0% |
| 2 | 1 | 0 | 1 | 100,0% |
| 3 | 7 | 5 | 2 | 28,6% |
| 4 | 33 | 24 | 9 | 27,3% |
| Gesamt | 211 | 132 | 79 | 37,4% |

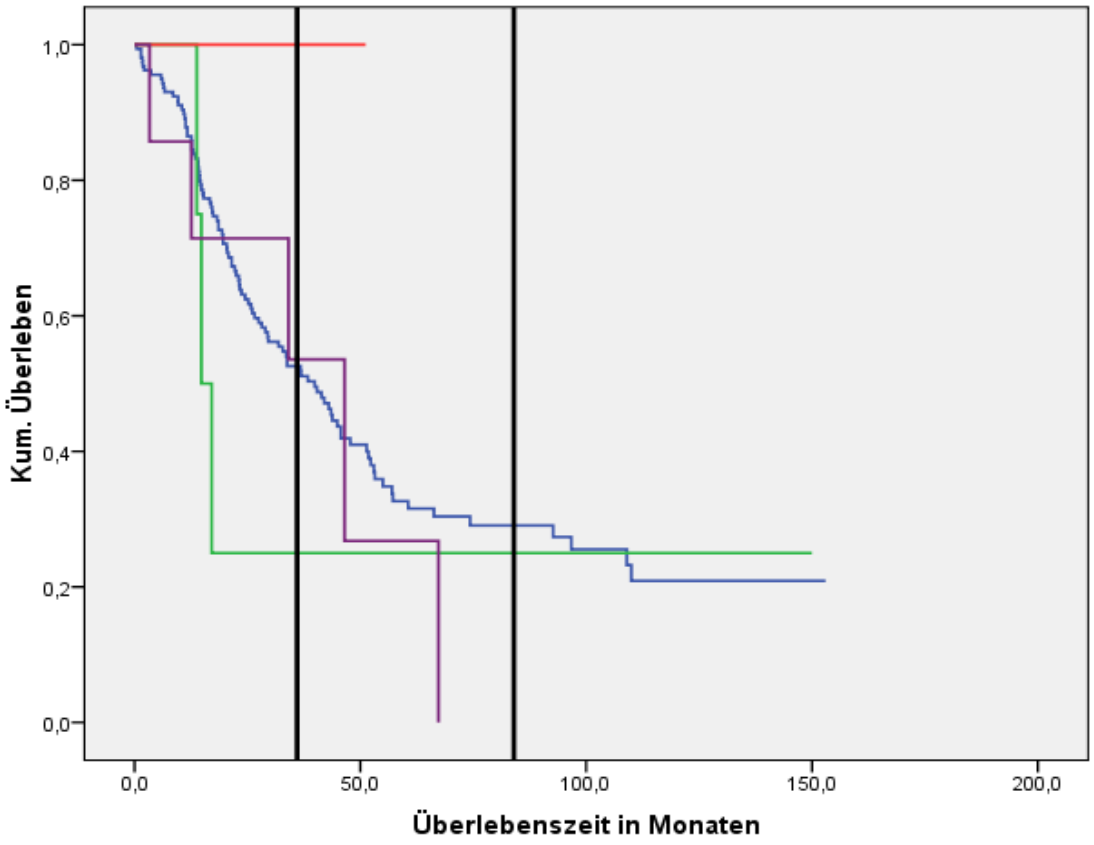



Abb. 18: Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von dem Topoisomerase IIα-Genstatus
normaler Genstatus, Amplifikation, Deletion, Polysomie
Die beiden senkrechten schwarzen Linien kennzeichnen 3 und 7 Jahre

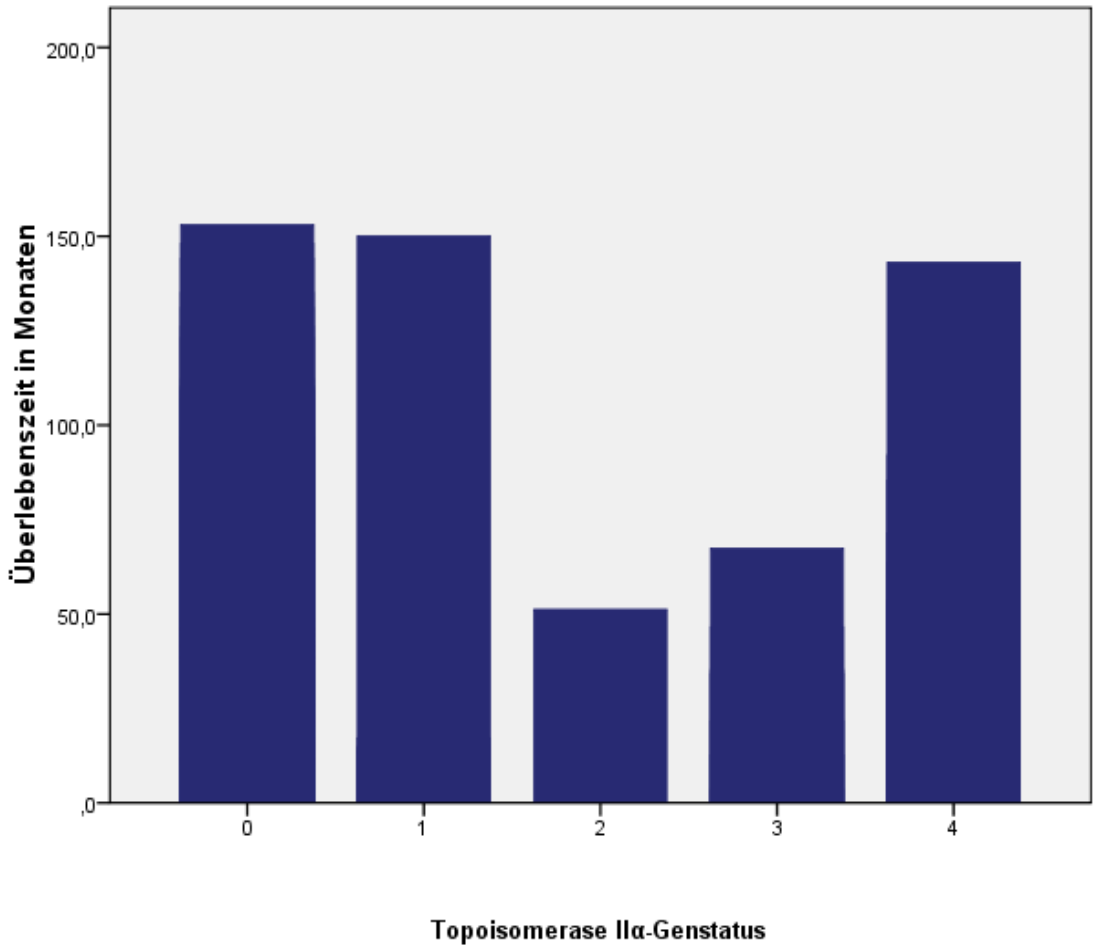



Abb. 19: Balkendiagramm: Überleben in Abhängigkeit von dem Topoisomerase IIα-Genstatus
0 = normaler Genstatus, 1 = Amplifikationen, 2 = Deletion, 3 = Polysomien,
4 = Monosomien

*3.8.2.3 ErbB1 und das Überleben*

Auch der Genstatus von ErbB1 ergab in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier im Log Rank Test keine Signifikanz (p = 0,702).

Die prozentual häufigsten Sterbefälle ereigneten sich mit je 64% bei den Fällen mit niedriger Trisomie und niedriger Polysomie (51/80 und 37/58). Mit 62% folgte in der Häufigkeit die hohe Polysomie (13/21) (s. Tab 27). Eine maximal mittlere Überlebenszeit fand sich in der Gruppe der hohen Trisomien. Alle anderen Gruppen wiesen eine lange Überlebenszeit auf (s. Abb. 20 und 21).

Tab. 27: Der ErbB1 Status und das Überleben

| ErbB1:<br>1 = Disomie<br>2 = Trisomie low<br>3 = Trisom. high<br>4 = Polysom. low<br>5 = Polys. high | Gesamtzahl | Anzahl der Todesfälle | Zensiert | |
|---|---|---|---|---|
| | | | N | Prozent |
| 1 | 44 | 24 | 20 | 45,5% |
| 2 | 80 | 51 | 29 | 36,2% |
| 3 | 4 | 1 | 3 | 75,0% |
| 4 | 58 | 37 | 21 | 36,2% |
| 5 | 21 | 13 | 8 | 38,1% |
| Gesamt | 207 | 126 | 81 | 39,1% |

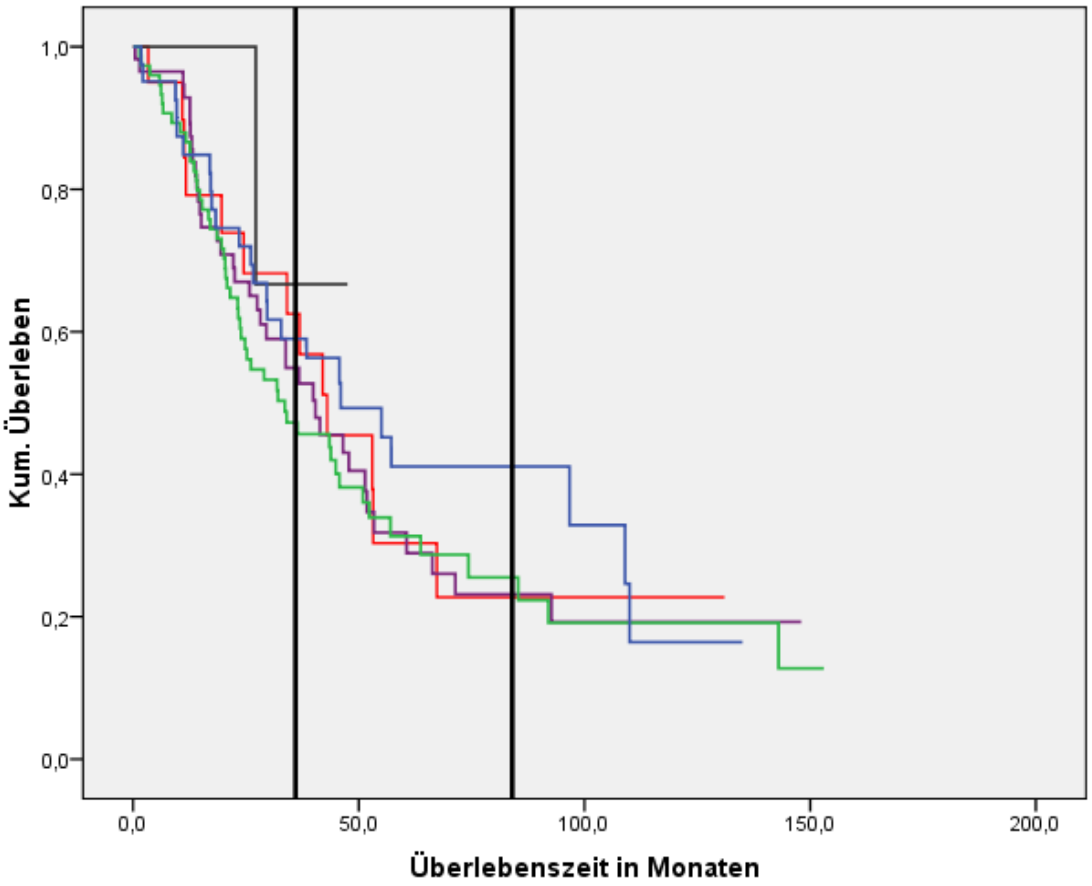



Abb. 20: Überleben nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von dem ErbB1-Genstatus
Disomien, schwache Trisomien, hohe Trisomien,
schwache Polysomien, hohe Polysomien
Die beiden senkrechten schwarzen Linien kennzeichnen 3 und 7 Jahre

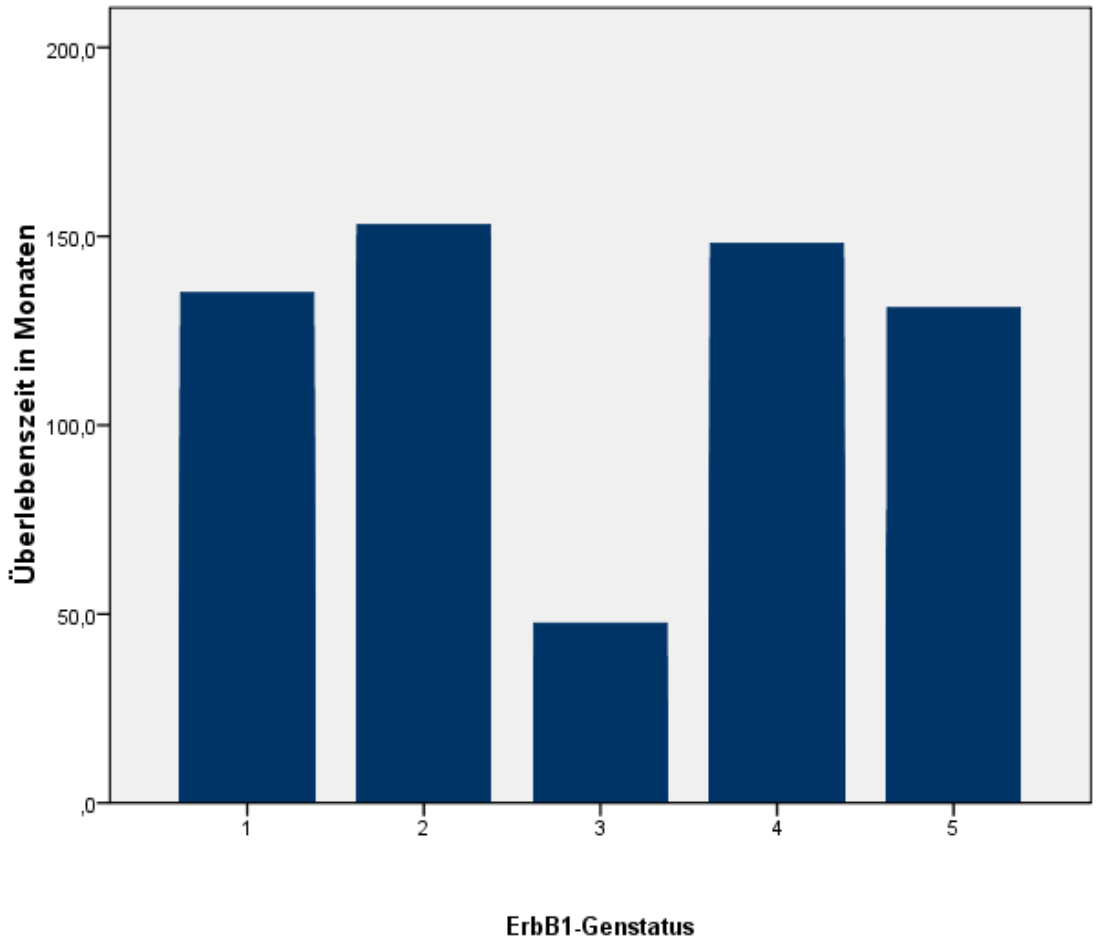



Abb. 21: Balkendiagramm: Überleben in Abhängigkeit von dem ErbB1-Genstatus
1 = Disomien, 2 = schwache Trisomien, 3 = hohe Trisomien,
4 = schwache Polysomien, 5 = hohe Polysomien

## 4 Diskussion

Tumorleiden des Ovars sind die führende Todesursache unter den gynäkologischen Tumorerkrankungen. Da die Erkrankung zunächst symptomlos verläuft und keine ausreichenden Screeningverfahren vorhanden sind, wird bei ca. 75 % der Patientinnen ein Ovarialkarzinom erst im FIGO-Stadium III diagnostiziert. Obwohl es sich um chemosensitive Tumoren handelt, liegen die Heilungschancen in diesem fortgeschrittenen Stadium nur noch bei 10% (Remmele et al. 1997, Dinh et al. 2008). Die Wiedererkrankungsrate innerhalb der ersten 2 Jahre liegt bei über 70% (Tammela et Odunsi 2004). Die Überlebensdauer innerhalb der Gruppe der FIGO III-Patientinnen ist trotz gleichen Tumorstadiums und gleicher Therapie sehr heterogen (Goff et al. 1998, Kaern et al. 2005). Aus diesem Grund wird derzeit intensiv nach Therapiemöglichkeiten gesucht, die über die chirurgische Tumorentfernung und die übliche Chemotherapie hinaus gehen. Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, eine Möglichkeit zu finden die heterogene FIGO III-Gruppe noch besser zu unterteilen und Gründe für die unterschiedlichen Überlebensdauern zu finden. Ein Ansatz liegt darin, Ovarialkarzinome auf Genamplifikationen und Genüberexpressionen zu untersuchen. Diese Untersuchungen und daraufhin eingesetzte Chemotherapeutika zeigten z.B. in der Therapie von Brustkrebs und Lungenkrebs Erfolge. Bei Mammakarzinomen spielt Her-2/neu und sein exprimierter Rezeptor Her-2 eine große Rolle. Trastuzumab, ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, der hochspezifisch an sein Antigen, den Her-2-Rezeptor, bindet und dessen extrazelluläre Domäne blockiert, wird erfolgreich als Therapeutikum eingesetzt. Damit wird die Proliferation Her-2-überexprimierender Tumorzellen gehemmt (Baselga et al. 2001, McKeage et Perry 2002). Ebenso relevant bei Mammakarzinomen ist die Topoisomerase IIα-Amplifikation, die für eine erhöhte Zellproliferation verantwortlich zu machen ist und höchst wahrscheinlich auch die Topoisomerase IIα-Deletion. Die Literatur schlägt deshalb in solchen Fällen eine Therapie mit Epirubicin, einem Anthrazyklin vor (Nielsen et al. 2008). Anthrazykline bilden zusammen mit Topoisomerase IIα und dem DNA-Strang einen Komplex. Dadurch werden eingeführte Strangbrüche stabilisiert und die Apoptose in proliferierenden Zellen eingeleitet (Depowski et al. 2000, Fritz et al. 2005).

Bei Lungenkrebs, aber auch Colon- und Brustkrebs liegt häufig eine Überexpression des EGF-Rezeptors vor. Er ist in Tumorgeweben an verändertem Zellwachstum, Apoptose-Hemmung, Zellmigration, Metastasierung und Angiogenese beteiligt. Dies

soll durch EGFR-Antikörper, sowie Tyrosinkinase-Inhibitoren verhindert werden (Cerciello et al. 2007, Capuzzo et al. 2005). Eine ErbB1-Genamplifikation tritt bei Brustkrebs in bis zu 6% der Fälle auf (Faratian et Bartlett 2008).
Mit der Intention einen Zusammenhang zwischen der heterogenen Überlebensdauer der an einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO III) erkrankten Patientinnen und Genaberrationen zu finden, wurde die Häufigkeit der Genamplifikation von Her-2/neu und ErbB1, sowie der Genamplifikation und –deletion von Topoisomerase IIα an 243 Ovarialkarzinomen untersucht. Um diese Anzahl an Fällen möglichst zeitsparend auswerten zu können, wurden Tissue Microarrays hergestellt. Mittels FISH konnte der Genstatus ermittelt und die Fälle auf Koamplifikationen hin verglichen werden. Welche Folgen ein aberranter Genstatus auf die Proteinexpression hat, sollte durch die zugehörigen IHC-Untersuchungen erfasst werden. Ein Vergleich der Untersuchungsergebnisse mit den Überlebensdaten der Patientinnen sollte Aufschluss über mögliche prognostische Informationen geben. So konnten an einer Serie von Ovarialkarzinomen umfassende Informationen auf zwei molekularen Ebenen gesammelt werden, die ggf. prognostische und therapeutische Relevanz haben.

Folgende Prozentangaben beziehen sich nicht auf die Gesamtzahl der Fälle, sondern auf die Anzahl auswertbarer Fälle.

## 4.1 Gen- und Chromosomenaberrationen beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom

### *4.1.1 Häufigkeit der Her-2/neu-Gen- und Chromosomenaberration*

In bis zu 2/3 aller Brustkrebsfälle kann eine Her-2/neu-Genamplifikation festgestellt werden. Sie gilt dort als Prognosefaktor bezüglich des klinischen Verlaufs und des Ansprechens auf die Antiöstrogen- (Tamoxifen-), Anthrazyklin- (Doxorubicin-) und Trastuzumab-Therapie (Press et al. 2002). Mit der Intention Parallelen bei Ovarialkarzinomen zu finden, ist in der vorliegenden Arbeit der Status des Her-2/neu-Genes an FIGO III-Ovarialkarzinomen mittels FISH untersucht worden.
4,3% der Fälle waren amplifiziert (10/229). Damit liegt die Häufigkeit der Genamplifikation hier weit unter der von Mammakarzinomen und auch unter den meisten bisher veröffentlichten Daten zwischen ca. 20 und 30% bzgl.

Ovarialkarzinomen (Slamon et al. 1989, Zhang et al. 1989, Kury et al. 1990, Zheng et al. 1991). Mano et al. (2004) untersuchten 73 Ovarialkarzinome mittels IHC und FISH. Für die FISH verwendeten sie HER-2 spectrum green und CEP 17 Spectrum aqua probe (Vysis, Chicago, IL, USA). Die Gruppe fand eine Amplifikation des Her-2/neu Genes in 12,5% der Fälle (8/64), wenn als Auswertungskriterium für die Amplifikation eine FISH-Ratio von 2 oder mehr herangezogen wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden die neuen, strengeren Auswertungskriterien nach Wolff et al. (2007) angewandt. Danach waren 4,3% der Fälle (10/229) amplifiziert. Wären die 3 unklaren Fälle, die eine Ratio von 2,1, 2,2 und 2,0 hatten zu den amplifizierten Fällen gezählt worden, läge die Amplifikationsrate bei 5,7% (13/229), also dennoch niedriger als die Ergebnisse von Mano et al. Zu einem sehr ähnlichen Ergebnis wie in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Amplifikationshäufigkeit kamen Mayr et al. (2005). Sie untersuchten ein Kollektiv von 262 verschiedenen Tumoren des Ovars, darunter auch 36 Borderlinetumoren, mittels FISH und IHC. 3,7% der Fälle zeigten in der FISH eine hohe Amplifikation von Her-2/neu, 2,7% der Fälle eine niedrige Amplifikation. Auch hier galten, wie bei Mano et al. (2004), die Fälle ab einer FISH-Ratio von 2 als amplifiziert. Fasst man somit die hohen und niedrigen Amplifikationen dieser Studie zusammen kommt man auf 6,4% (in der vorliegenden Arbeit: 5,7% inkl. unklarer Fälle). Auch Vermeij et al. (2008) untersuchten in ihrer Studie die Her-2/neu-Amplifikation und Überexpression an Ovarialkarzinomen. Verwendet wurden Gewebeproben von 52 Patientinnen. Die Hybridisierung erfolgte mit PathVysion LSI Her-2 Spectrum Orange und CEP 17 Spectrum Green (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Die FISH wurde nur an den 6 Fällen durchgeführt, die in der IHC mit 2+ und 3+ bewertet wurden. 3 Genamplifikationen (10%) konnten identifiziert werden. Da die FISH nicht an allen 31 Fällen vorgenommen wurde, ist bei der Studie von Vermeij et al. nicht nachvollziehbar, ob womöglich auch in der IHC negative Fälle (0/1+) eine Genamplifikation aufwiesen. Die Datenlage zur Häufigkeit der Her-2/neu-Genamplifikation bei Ovarialkarzinomen ist, wie oben dargestellt, sehr uneinheitlich. Dies mag daran liegen, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Untersuchungsmethoden zur Anwendung kommt. Angefangen bei den Hybridisierungs-Kits bis hin zu den Auswertungskriterien gibt es keine einheitlichen Standards, die ein direktes Vergleichen der einzelnen Ergebnisse erlauben. Trotz Unterschieden zeigen die meisten Untersuchungen, dass eine Her-2/neu-Amplifikation bei Ovarialkarzinomen im Gegensatz zu Mammakarzinomen nur in wenigen Fällen vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit wiesen 2,2% der Fälle (5/229) eine Polysomie des Chromosoms 17 auf. Die Polysomie wurde nach Pauletti et al. (2000) ermittelt. Diese lag vor, wenn die FISH-Ratio (Summe der Gensignale geteilt durch die Summe der Zentromersignale) kleiner 2,0 war und der Polysomiequotient (Summe der Zentromersignale geteilt durch die Summe der ausgezählten Kerne) über 3,0 betrug. Leider scheint die Anwendung des Polysomiequotienten in Studien kein Standardverfahren zu sein, obwohl er, wie im folgenden gezeigt, eine wichtiges diagnostisches Verfahren ist: Da bei einer Polysomie vermehrt Zentromersignale vorhanden sind, kommt man bei der Berechnung der FISH-Ratio häufig auf sehr niedrige Ergebnisse unter 1,8. Sie zeigt nur das Verhältnis der Zahl der Gensignale zur Zahl der Zentromersignale an. Die FISH-Ratio kann aber keine Aussage über den tatsächlichen Gen- und Chromosomenstatus treffen bzw. darüber, ob neben der Chromosomenzahl auch die Genzahl erhöht ist und die betroffenen Patientinnen dadurch eine stark erhöhte Genexpression haben. D.h. diesen Patientinnen würde aufgrund einer niedrigen FISH-Ratio eine Trastuzumab-Therapie (Trastuzumab-Therapie bei FISH-Ratio ≥ 2,2) verwehrt bleiben. Aus diesem Grund ist es wichtig bei vermehrt erscheinenden Zentromersignalen neben der FISH-Ratio auch den Polysomiequotienten zu ermitteln (Trastuzumab-Therapie bei Polysomiequotient ≥ 3,0), wodurch polysome Patientinnen nicht durch das „Diagnostik-Raster“ fallen können. Mehrere Studien verwendeten den Polysomiequotienten nicht, dafür wurden aber, neben der Bildung der FISH-Ratio, die Gensignale auch ins Verhältnis zur Summe der ausgezählten Kernen gesetzt. So konnten durch Polysomien verursachte Erhöhungen der Genzahl aufgedeckt werden. Um den Effekt einer Chromosom 17 Aneuploidie auf die Bestimmung des Her-2neu-Status zu ergründen untersuchten Ma et al. (2005) 893 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Mammakarzinome. Für die FISH wurde das PathVysion Kit (Vysis) verwendet. In dieser Studie waren 50,7% der Fälle (453/893) laut FISH-Ratio nicht amplifiziert. Von diesen 453 Fällen zeigten jedoch 67 Fälle einen erhöhten Genstatus (> 4), also 14,8% der Fälle waren polysom. Dieses Ergebnis bei Brustkrebs liegt höher als unser Ergebnis bei Ovarialkarzinomen. Troxell et al. (2006) untersuchten 5 duktale Karzinome, 1 Ovarialkarzinom und eine Probe aus einer Nadelbiopsie, ohne weitere Angaben zur Entnahmelokalisation. Verwendet wurden verschiedene Tests, die alle sowohl den Her-2/neu Status, als auch den Chromosom 17 Status wiederspiegelten: Her-2/CEP17 (PathVysion), SMS (Smith-Magenis syndrome critical region) und RARA

(retinoic acid receptor) beide aus dem Abbott-Vysis Smith-Magenis assay probe Set. Die Gruppe kam in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass 5 von 7 Fällen mit einer normalen FISH-Ratio (< 2,0) trotzdem einen erhöhten Her-2/neu-Genstatus zeigten, weil gleichzeitig eine Polysomie vorlag. Die Studien von Ma et al. und Troxell et al. (2005 und 2006) veranschaulichen, dass nicht nur die FISH-Ratio zur Anwendung kommen darf, sondern dass sowohl dem Genstatus, als auch der Chromosomenzahl unabhängig voneinander Beachtung zu schenken ist, um eine Entscheidung über eine Therapie mit Trastuzumab zu treffen. Auch wenn es sich in diesen Studien um Untersuchungen an Mammakarzinomen handelt, kann man davon ausgehen, dass die oben dargelegten Beobachtungen auch auf Ovarialkarzinome zutreffen. Zur Häufigkeit von Polysomien bei Ovarialkarzinomen konnten in der Literatur keine Daten zum Zwecke eines Vergleichs mit der vorliegenden Arbeit gefunden werden.

### *4.1.2 Häufigkeit der Topoisomerase IIα-Gen- und Chromosomenaberration*

Die Datenlage zur Topoisomerase IIα-Amplifikation bei Ovarialkarzinomen ist sehr gering. Besser erforscht ist die Situation bei Brustkrebs. Die Topoisomerase IIα-Amplifikation steht dort in engem Zusammenhang mit der Her-2/neu-Genamplifikation. Diese Erkenntnis führte zu der Spekulation, dass Topoisomerase IIα der eigentliche prädiktive Faktor für das Ansprechen auf eine Anthrazyklintherapie ist (Isola et al. 2000). Di Leo et al. (2002) untersuchte 430 Mammakarzinome u.a. auf Topoisomerase IIα-Genaberrationen, um herauszufinden, ob Voraussagen über das Anschlagen einer Anthrazyklin Therapie oder adjuvanten Therapie möglich sind. In dieser Studie wurden nur Her-2/neu-amplifizierte Fälle auf eine Topoisomerase IIα-Amplifikation untersucht. Der Anteil positiver Fälle lag bei 38%. Auch Tanner et al. (2001) untersuchten die Topoisomerase IIα-Genaberration nur an Her-2/neu positiven Fällen. Sie begründeten dieses Vorgehen damit, dass Topoisomerase IIα in ihren früheren Studien nie alleine, ohne eine Koamplifikation von Her-2/neu, amplifiziert war. Ebenso verfuhren Hannemann et al. (2006), bei denen 24% der 194 Her-2/neu amplifizierten Mammakarzinome auch eine Topoisomerase IIα-Amplifikation zeigten. Tsiambas et al. (2006) untersuchte den Topoisomerase IIα-Genstatus an endometrioiden Adenokarzinomen des Endometriums. In einer CISH-Analyse konnten in 7,5% der Fälle (3/40) eine Amplifikation festgestellt werden, in 2,5% der Fälle (1/40) eine Deletion. Eine Aneuploidie des Chromosoms 17 fand sich in 17,5% der Fälle (7/40).

Die oben genannten Studien geben einen kleinen Überblick über die Datenlage zum Thema Topoisomerase IIα-Genaberration bei Karzinomen. Letztendlich können diese Studien aber nur sehr eingeschränkt mit der vorliegenden Arbeit und untereinander verglichen werden, da die uneinheitliche Methodik sowie die unterschiedlichen Gewebearten keine sicheren Schlüsse zulassen.

Mano et al. (2004) sind eine der wenigen, die den Topoisomerase IIα-Genstatus am Ovarialkarzinom untersucht haben. Für die FISH wurden Vysis Multi-color T2a Spectrum orange und CEP17 Spectrum aqua probe (Vysis, Chicago ,IL,USA) verwendet. 64 Fälle konnten untersucht werden. Es wurden 3 Auswertungsdurchgänge vorgenommen. Im ersten galt eine FISH-Ratio von 1,5 oder höher als positiv, also als amplifiziert, wie es auch Tanner et al. (2001), jedoch bei der Untersuchung von Mammakarzinomen vorschlugen. Wie in der vorliegenden Arbeit galten im zweiten Durchgang alle Fälle mit einer FISH-Ratio größer oder gleich 2 als positiv. Im dritten Durchgang wurde eine Genkopiezahl von mehr als 4 pro Zellkern positiv bewertet. Damit kamen Mano et al. zu folgenden Ergebnissen: Der erste Durchgang ergab eine Amplifikation in 25% der Fälle (16/64), der zweite in 7,8% der Fälle (5/64) und der dritte in 31,7% der Fälle (20/63). In unserer FISH-Untersuchung ließ sich in 2,2% der Fälle (5/227) eine Amplifikation nachweisen. Es wurden die Auswertungskriterien nach den Empfehlungen von Dako verwendet, in denen eine FISH-Ratio größer oder gleich 2 als Amplifikation gilt. Unser Ergebnis liegt damit unter dem von Mano et al. im vergleichbaren zweiten Durchgang.

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich in 3,5% der Fälle (8/227) Polysomien festgestellt, womit die betroffenen Patientinnen, im Falle einer Therapie mit Anthrazyklinen, auch in die zu behandelnde Zielgruppe fallen würden. In Manos erstem und zweitem Durchgang konnte ein durch eine Polysomie „verschleierter" erhöhter Genstatus nicht erkannt werden. Dieser Tatsache wurde die Gruppe gerecht, indem sie im dritten Durchgang nur die Zahl der Genkopien beachteten. Damit stieg ihr Ergebnis stark an. Addiert man in unserer Untersuchung den Anteil der Amplifikationen mit dem der Polysomien, so kommt man auf 5,7%, d.h. auf 26% weniger als in der Arbeit von Mano et al. Diese erachteten in ihrem dritten Durchgang jedoch schon eine Genkopiezahl von mehr als 4 als amplifiziert, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit in der dies erst ab 6 Kopien pro Kern zutraf. Bei gleichen Auswertungskriterien würden sich die Zahlen einander annähern. Damit ähneln sich unsere Ergebnisse und die von Mano et al. (2004) weitgehend. Eine Topoisomerase IIα-Genamplifikation scheint bei

Ovarialkarzinomen ein weitaus selteneres Ereignis zu sein als bei Mammakarzinomen. Um diese Vermutung zu bestätigen, bedarf es jedoch noch weiteren Untersuchungen.

### *4.1.3 Häufigkeit der ErbB1-Gen- und Chromosomenaberrationen*

Bisher fokussierten die meisten Studien zum Thema Krebserkrankungen am Ovar den EGF-Rezeptor (Dinh et al. 2008), weniger das Gen. Z. B. liegt eine klinische Studie vor, die mit Tyrosinkinase Inhibitoren arbeitete, aber den Genstatus von ErbB1 vorher nicht bestimmte (Schilder et al. 2005). So blieb bisher verborgen, ob Patientinnen mit einer hohen Polysomie, analog zu Lungenkrebs, von einer Tyrosinkinaseinhibition profitieren würden. Die Behandlung unselektierter Patientengruppen kann dazu führen, dass der mögliche Erfolg einer Tyrosinkinaseinhibition nicht erkannt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde das ErbB1-Gen mittels FISH untersucht. Deren Auswertung erfolgte nach den Kriterien von Cappuzzo et al. (2005). Demnach galten hohe Polysomien und Amplifikationen als FISH-positiv. In unseren Untersuchungen lagen keine Amplifikationen vor, jedoch wiesen 10,8% der Fälle (24/222) eine hohe Polysomie auf. Stadlmann et al. (2006) untersuchten 80 fortgeschrittene seröse Ovarialtumoren mittels IHC, FISH und PCR. Bei der Hybridisierung wurde Spectrum Orange für das ErbB1 Gen und Spectrum Green für das Zentromer des Chromosoms 7 verwendet (Vysis). Unterteilt wurden die Fälle in fortgeschrittene Primärtumoren und fortgeschrittene Rezidive. In 14,1% der Primärtumoren (9/64) und in 20,4% der rezidivierenden Tumoren (10/49) lag eine hohe Polysomie vor. Eine Amplifikation wurde in 6,3% bzw. 2,0% der Fälle gefunden (6/64 und 1/49). Vermeij et al. (2008) untersuchten 52 Ovarialkarzinome in einer FISH- und IHC-Untersuchung. Auch sie verwendeten wie Stadlmann den Kit von Vysis. Die Auswertung der FISH erfolgte, wie in der vorliegenden Arbeit nach Cappuzzo et al. (2005). In der Studie von Vermeij et al. konnte keine Amplifikation festgestellt werden, aber in 13% der Fälle (4/31) eine hohe Polysomie. Im Vergleich zu Stadlmann et al. und Vermeij et al. lagen unsere Ergebnisse leicht darunter. Lassus et al. (2006) untersuchten 398 seröse Ovarialkarzinome mittels CISH und IHC. In der CISH wurden mehr als 5 Genkopien pro Zelle als Amplifikation gewertet, 3-5 Kopien pro Zelle als schwache Genvermehrung und 2 Kopien als normal. Diese Auswertungsmethode unterscheidet sich von der von Cappuzzo et al. (2005) dadurch, dass Cappuzzo erst ab 15 Genkopien in mehr als 10% der Zellen von einer Amplifikation spricht und Polysomien

mit in Betracht gezogen werden. Somit ist ein Vergleich unserer Arbeit mit der von Lassus et al. (2006), die in 12% der Fälle Amplifikationen fanden, nicht möglich und verdeutlicht die Notwendigkeit einheitlicher Auswertungskriterien, um Ergebnisse interpretierbar bzw. miteinander vergleichbar und dadurch aussagekräftig zu machen. Ähnlich unseren Ergebnissen sind die der Studien von Vermeij et al. (2008) und Stadlmann et al. (2006). Sie legen nahe, dass hohe Polysomien mit ca. 10-20 % und Amplfikationen mit ca. 0-6% bei Ovarialkarzinomen selten vorkommen.

### 4.2 Vergleich der Häufigkeiten der FISH-positiven Her-2/neu-, Topoisomerase IIα- und ErbB1-Untersuchungen

In allen drei FISH-Untersuchungen lagen die Ergebnisse prozentual niedriger als größtenteils in der Literatur angegeben. Ursächlich könnten unterschiedliche Auswertungskriterien und eine ungleiche Methodik sein. So wurden in vielen Studien Fälle, die mittels FISH untersucht werden sollten einer Vorauswahl unterzogen, d.h. z.B. einem HercepTest®, nach dem nur noch an 2+ Fällen eine FISH vorgenommen wurde, oder nur Her-2/neu-amplifizierte Fälle wurden auch auf eine Topoisomerase IIα Genaberration überprüft (Vermeij et al. 2008, Hannemann et al. 2006, Di Leo et al. 2002, Tanner et al. 2001). Aus finanzieller Sicht ist dieses Vorgehen nachvollziehbar, da eine FISH-Untersuchung sehr kostenintensiv ist.

In der vorliegenden Arbeit war das Her-2/neu-Gen am häufigsten amplifiziert, gefolgt von der Topoisomerase IIα. In der Untersuchung von ErbB1 konnte keine Amplifikation festgestellt werden. Vergleicht man diese Daten mit denen von Mano et al. (2004), Vermeij et al. (2006) und Stadlmann et al. (2006), besteht zumindest dieselbe Rangreihenfolge in der Amplifikationshäufigkeit. Auch bei den Polysomien lagen unsere Zahlen unter den Daten bisher veröffentlichter Studien zu Ovarialkarzinomen und Mammakarzinomen (Stadlmann et al. 2006, Troxell et al. 2006, Ma et al. 2005, Mano et al. 2004). ErbB1 grenzte sich in der vorliegenden Arbeit deutlich von den anderen beiden Genen ab. Die als FISH-positiv geltende hohe Polysomie lag in fast 10% der Fälle vor. Danach folgten die Topoisomerase IIα und dann Her-2/neu. Da Topoisomerase IIα und Her-2/neu auf demselben Chromosom lokalisiert sind, müsste der Anteil der Polysomien gleich groß sein. In unseren Untersuchungen liegt ein kleiner Unterschied vor. In 4 Fällen zeigte sowohl die Topoisomerase IIα, also auch

Her-2/neu eine Polysomie. In 3 Fällen war Her-2/neu amplifiziert und Topoisomerase IIα polysom oder anders herum. Dabei lag der Polysomiequotient in beiden Untersuchungen der 3 Fälle zwischen 4,2 und 7,8, es lag also in jedem der 3 Fälle eine Polysomie vor. Eine hohe Genanzahl oder Gencluster machten aus den polysomen Fällen jedoch per definitionem eine Amplifikation. In 2 weiteren Fällen hätte die Auszählung weiterer Kerne sicherlich auch zu einem einheitlichen Ergebnis geführt. Einmal lagen die Polysomiequotienten sehr nah an der Grenze (2,7 bei Topoisomerase IIα und 3,1 bei Her-2/neu) und im zweiten Fall war der Tumor heterogen. Damit kann die auf den ersten Blick erstaunliche Diskrepanz erklärt werden, was wiederum bestätigt, dass die FISH eine sehr genaue Untersuchungsmethode ist, der jedoch bisher genau definierte Auswertungskriterien fehlen.

## 4.3 Koamplifikationen

### *4.3.1 Koamplifikationen zwischen Her-2/neu und Topoisomerase IIα*

In unseren Auswertungen kam eine Her-2/neu und Topoisomerase IIα-Koamplifikation in 1,8% der Fälle (4/225) vor. 50 % der Her-2/neu-amplifizierten Fälle (5/10) waren in unseren Untersuchungen auch Topoisomerase IIα-amplifiziert; dies entspricht den Angaben in der Literatur für die Situation bei Brustkrebs (Hicks et al. 2005, Järvinen et al. 2000). Mano et al. (2004) fand eine exzellente Übereinstimmung zwischen der Her-2/neu- und Topoisomerase IIα-Amplifikation bei Ovarialkarzinomen. Prozentual weniger Koamplifikationen (24% und 38%) beobachteten Hannemann et al. (2006) sowie Di Leo et al. (2002) beim Mammakarzinom. Im Einklang zu der Studie von Tanner et al. (2001) steht, dass in der vorliegenden Arbeit keine Topoisomerase IIα-Amplifikation ohne eine Her-2/neu-Amplifikation nachgewiesen werden konnte. Jedoch ergab sich ein Fall einer Topoisomerase IIα-Amplifikation, in dem der Her-2/neu-Status mit einer FISH-Ratio von 1,8 in den unklaren Bereich fiel. Durch die Überarbeitung der Her-2/neu-Auswertungskriterien nach Wolff et al. (2007), wäre dieser Fall, bei Anwendung der Methodik von Tanner et al. (2001), nur Her-2/neu-amplifizierte Fälle auch auf eine Topoisomerase IIα-Genaberration zu untersuchen, nicht bemerkt worden. In neueren Studien wurden Veränderungen des Topoisomerase IIα-Genstatus auch an Tumoren mit einem normalen Her-2/neu-Genstatus festgestellt. Dieses

Ereignis trifft in ca. 1,7 bis 10,9% der Fälle ein (Olsen et al. 2004, Knoop et al. 2005, Hannemann et al. 2006). Deshalb ist eine Vorauswahl der Patientinnen anhand des Her-2/neu-Genstatus nicht korrekt und kann zu falschen Therapiemaßnahmen führen.
Es wird immer wieder die These aufgestellt, dass bei Brustkrebs eine Topoisomerase IIα-Amplifikation der eigentliche prädiktive Marker für die Wirksamkeit einer Anthrazyklintherapie ist (Isola et al. 2000). Präklinische und klinische Daten bestätigen diese Annahme auch (Knoop et al. 2005, Di Leo et al. 2002, Di Leo et al. 2001, Giaccone et al. 1992). Bei Ovarialkarzinomen wurden bisher v.a. die Proteinlevel von Topoisomerase IIα mittels IHC oder mRNA Analysen untersucht, was einerseits seine Berechtigung findet, da das Protein das Ziel der Chemotherapeutika ist. Andererseits fehlen dadurch jedoch Daten, die zeigen, ob man bei Ovarialkarzinomen genauso wenig von einer Genamplifikation auf eine Proteinüberexpression schließen kann, wie bei Mammakarzinomen.

### *4.3.2 Koamplifikationen zwischen Her-2/neu und ErbB1*

Da in unserer Untersuchung keine ErbB1-Amplifikation nachweisbar war, ist es nur möglich die FISH-positiven hohen Polysomien mit Her-2/neu-Amplifikationen zu vergleichen. In 12,5% der hohen Polysomien (3/24) konnte gleichzeitig eine Her-2/neu-Genamplifikation festgestellt werden. In der Mehrzahl der Fälle (75% (18/24)) lag jedoch ein normaler Her-2/neu-Genstatus vor.
Vermeij et al. (2008) verglichen in einer FISH-Analyse den Genstatus von Her-2/neu und ErbB1 an 52 Ovarialkarzinomen und konnten keine Korrelation feststellen. Für die ErbB1 Auswertung galten die Kriterien nach Cappuzzo et al., für die Her-2/neu Auswertung wurde eine FISH-Ratio über 2 als Amplifikation gewertet. In 10% der Fälle (3/31) lag eine Her-2/neu Genamplifikation vor und in 13% der Fälle (4/27) der ErbB1 Auswertung eine hohe Polysomie; eine Amplifikation gab es nicht. Keiner der FISH-positiven Fälle der beiden Untersuchungen trafen aufeinander. Sassen et al. (2008) verglichen mittels FISH an 278 Mammakarzinomen den Genstatus von Her-2/neu und ErbB1. Auch sie konnten keine signifikante Interaktion zwischen den beiden Genen feststellen. Diese Untersuchungen zeigten noch deutlicher als unsere, dass die Amplifikation/hohe Polysomie von Her-2/neu und ErbB1 zwei voneinander unabhängige Ereignisse zu sein scheinen.

Bezogen auf Kopolysomien zeigte unsere Untersuchung einen Trend zur Signifikanz. Da Her-2/neu und Topoisomerase IIα auf demselben Chromosom lokalisiert sind, wird dieser Zusammenhang im folgenden Punkt (4.3.3) erörtert.

### *4.3.3 Koamplifikationen zwischen Topoisomerase IIα und ErbB1*

Erstaunlicherweise ergab die Korrelation der FISH-Ergebnisse von Topoisomerase IIα und von ErbB1 einen signifikanten Zusammenhang ($p<0,0005$). Von den 5 Amplifikationen der Topoisomerase IIα traf keine einzige auf eine hohe Polysomie von ErbB1. Dafür korrelierte die eine Hälfte der Polysomien des Chromosom 17 (4/8) mit den hohen Polysomien und die andere Hälfte mit den schwachen Polysomien des Chromosom 7. 28 der 31 Monosomien (90,3%) des Chromosom 17 verteilten sich auf Disomien, schwache und hohe Trisomien in der ErbB1-Untersuchung. In der Literatur fanden sich dazu keine Daten. Ob diese Kopolysomien von relevanter Bedeutung sind, müssten weitere Untersuchungen zeigen.

## 4.4 Topoisomerase IIα-Deletion

In unseren Untersuchungen lag eine Deletion (0,4%) innerhalb der 227 mittels FISH untersuchten Fälle vor. In dem dazugehörigen IHC-Test ergab der deletierte Fall eine mittlere Topoisomerase IIα-Expression. D.h., die Gendeletion äußerte sich hier nicht in einer reduzierten Proteinexpression. Aufgrund der geringen Zahl von nur einer Deletion können aus diesem Ergebnis keine relevanten Schlüsse gezogen werden. Der Her-2/neu-Status dieses Falles erwies sich als normal, was noch einmal widerlegt, dass nur Her-2/neu positive Tumoren eine Topoisomerase IIα-Genaberration aufweisen. Die Untersuchung des ErbB1 Genes zeigte eine hohe Polysomie des Chromosoms 7. Ob dieses Zusammentreffen zufällig und ohne Bedeutung ist, oder ob eine prognostische Relevanz besteht müssen weitere Untersuchungen zeigen. Wie bereits erwähnt ist die Datenlage zum Topoisomerase IIα-Genstatus bei Ovarialkarzinomen gering. Deshalb können im Folgenden erneut nur Vergleiche zu FISH-Untersuchungen an anderen Geweben angestellt werden.

Di Leo et al. (2002) konnte in 8 von 73 Mammakarzinomen (11%) eine Topoisomerase IIα-Deletion feststellen. Dabei wurden allerdings nur Her-2/neu-positive Gewebeproben

untersucht. Mueller et al. (2004) fanden in ihren Untersuchungen an 81 Mammakarzinomen in 8,6% der Fälle (7/81) Deletionen. 2 Fälle davon zeigten ein Kodeletion und 5 eine Koamplifikation mit Her-2/neu. Knoop et al. (2005) untersuchten in einer retrospektiven Analyse 773 Fälle von Brustkrebs. In ihrer FISH-Untersuchung konnte die Gruppe 87 Topoisomerase IIα-Deletionen (11%) feststellen. Alle drei genannten Studien erreichen Ergebnisse (8,6-11%), die erheblich höher liegen als das in der vorliegenden Arbeit (0,4%). Es wurden in allen Arbeiten dieselben Auswertungskriterien verwendet, die besagen, dass eine Deletion als FISH-Ratio kleiner gleich 0,8 definiert ist. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Topoisomerase IIα-Gendeletionen bei Ovarialkarzinomen wesentlich seltener vorkommen als bei Mammakarzinomen. Um dies zu bestätigen, sind jedoch noch weitere Untersuchungen an Ovarialkarzinomen nötig.

Bezüglich des Ansprechens der Fälle mit Deletionen auf eine Anthrazyklintherapie kommen verschiedene Studien zu gegenteiligen Ergebnissen. Knoop et al. (2005) fanden statistisch nicht signifikante Anzeichen dafür, dass nicht nur Patientinnen mit einer Topoisomerase IIα-Amplifikation, sondern auch solche mit einer Deletion von einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie profitieren. Järvinen et al. (2000) dagegen sprechen von einer geringen Sensitivität Topoisomerase IIα-deletierter und Her-2/neu-amplifizierter Zellen auf Anthrazykline. Da der Topoisomerase IIα-Deletion erst seit kurzem Beachtung geschenkt wird, müssen noch weitere Studien durchgeführt werden, die zur Klärung dieser Frage beitragen.

## 4.5 Gegenüberstellung der IHC und der FISH

### *4.5.1 Der Her-2-Rezeptor und Her-2/neu*

Im Verlauf der Brustkrebsdiagnostik werden Tumoren zunächst mittels IHC untersucht. Im Falle eines unklaren Ergebnisses (2+) folgt eine FISH Analyse zur Bestätigung einer Genamplifikation oder Polysomie. Frauen mit solch einer Gen- bzw. Chromosmenaberration sind geeignet für die Therapie mit Trastuzumab. Ziel der vorliegenden Arbeit war es u.a. herauszufinden, ob die immunhistochemische Untersuchung alleine als diagnostisches Verfahren ausreicht, oder ob die FISH unerlässlich ist.

Laut IHC-Test lag in unserer Untersuchung der Anteil stark positiver Fälle (3+) bei 1,7% (4/241), wobei alle 4 Fälle auch eine Genamplifikation in der FISH aufwiesen. Auch Raspollini et al. (2006) konnten die Beobachtung machen, dass in ihrer Untersuchung alle in der IHC eindeutig positiven Fälle (3+) gleichzeitig in der FISH amplifiziert waren. 1990 untersuchten Berchuck et al. ein Kollektiv von 73 fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen (FIGO III und IV) auf eine Her-2-Überexpression. Als Vergleichsmaterial zogen sie normales Ovarialgewebe heran. Für die immunhistochemische Färbung wurde der monoklonale Antikörper TA1 aus dem Elite Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) verwendet. 32% der Ovarialkarzinome wiesen eine starke Färbung auf (3+). Dies liegt weit über den 1,7% eindeutig positiver Fälle in der hier vorliegenden Arbeit. Sicherlich kann diese Abweichung u.a. dadurch erklärt werden, dass mehrere Untersucher die Färbungen ein und desselben Falles unterschiedlich interpretieren. Bei Berchuck et al. kam es nach einer erneuten Auswertung aller Fälle zu einer Abweichung der Ergebnisse in 7 Fällen (9,6%). Sie berichteten auch, dass 5 von 6 Fällen des normalen Ovarialepithels eine schwache bis moderate Färbung (0-2+) aufwiesen. Das Stroma blieb dabei negativ. Wahrscheinlich handelte es sich um eine unspezifische Anfärbung durch TA1.

Die 6 übrigen der in der vorliegenden Arbeit in der FISH amplifizierten Fälle zeigten in der IHC Untersuchung moderate (3/229) und negative Färbung von 0 bzw. 1+ (2/229 bzw. 1/229). Auch Vermeij et al. (2008) untersuchten in ihrer Studie die Her-2/neu-Amplifikation und -Überexpression an Ovarialkarzinomen. Verwendet wurden Gewebeproben von 52 Patientinnen. Die IHC Färbung erfolgte mit dem HercepTest® (Dako A/S, Glostrup, Dänemark), die FISH mit PathVysion LSI Her-2 Spectrum Orange und CEP 17 Spectrum Green (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Der IHC-Test ergab in 19% der Fälle (6/31) ein positives Ergebnis, wobei sowohl die 2+, als auch die 3+ Fälle als positiv gewertet wurden. Wurden nur die 3+ Fälle als positiv bewertet, sank der Anteil der Überexpressionen auf 10% (3/31). Die FISH wurde nur an den 6 Fällen durchgeführt, die in der IHC mit 2+ und 3+ bewertet wurden. 3 Genamplifikationen (10%) wurden gefunden, wobei sich eine Amplifikation mit einem 2+ Fall deckte und 2 Amplifikationen mit 3+ Fällen. Da die FISH nicht an allen 31 Fällen vorgenommen wurde, ist bei der Studie von Vermeij et al. nicht nachvollziehbar, ob womöglich auch negative Fälle eine Genamplifikation aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit war dies in 3 Fällen so. 2 amplifizierte Fälle hatten einen negativen Her-2-Test von 0, ein amplifizierter Fall zeigte einen negativen Her-2-Test

von 1+. Es muss sich dabei um „falsch negative“ Fälle handeln, die im Verlauf der klinischen Diagnostik untergegangen wären. Laut Reddy et al. (2006) wurden nicht übereinstimmende Ergebnisse („IHC < 3+ / FISH positiv“ oder „IHC = 3+ / FISH negativ“) bei Brustkrebs in ca. 4% der 1.503, in einer zentralen Studie untersuchten Fälle, gefunden. Diese Problematik scheint u.a. mit der Gewebefixierung in Paraffin in Verbindung zu stehen. Beim Vorgang der Fixierung kommt es zu sog. „cross links“ zwischen Proteinen und Nukleinsäuren. RNA und damit Proteine, sowie DNA werden modifiziert oder gar beschädigt. Zielstrukturen für die Färbungen oder Hybridisierungen können somit keine Bindung mehr mit Antikörpern oder DNA-Fragmenten eingehen. Da für die FISH und die IHC unterschiedliche Fixierungsbedingungen optimal sind, scheint tiefgefrorenes Material für diese Untersuchungen besser geeignet zu sein (Schoenberg Fejzo et Slamon 2001). Einen anderen Erklärungsansatz machten Jacobs et al. (1999), indem sie für negative IHC-Tests in Kombination mit einer amplifizierten FISH-Analyse eine herunterregulierte Transkription und/oder Translation verantwortlich machten. Mano et al. (2004) konnte keinen Einfluss des Blockalters auf die Ergebnisse feststellen. In der vorliegenden Arbeit hatte das Alter der Blöcke einen negativen Einfluss, weswegen Gewebeproben aus der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität ausgeschlossen wurden, die aus den Jahren 1999 oder früher stammten (siehe 2.5.6). Bei den 3 Fällen mit dem „falsch negativen“ Ergebnis handelte es sich um Fälle aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität. Sie stammten aus den Jahren 1995, 1996 und 2000. Dem Alter der Gewebeblöcke und den Fixierungsmodalitäten konnte hier keine Schuld gegeben werden, da am Pathologischen Institut die Paraffinzusammenstellung seit 1993 gleich geblieben ist. Für die richtige Durchführung der IHC-Färbung und eine geeignete Paraffinfixierung in der vorliegenden Arbeit spricht, dass alle Monosomien (26/26) im Her-2-Test als negativ (0) bewertet wurden.

Die 4 in dieser Arbeit unklaren Fälle in der FISH (1,7%) verteilten sich in der IHC auf die Ergebnisse 0, 1+ und 2+. Aus Sicht der IHC gab es 9 unklare Fälle (3,9%). 4 davon (1,7%) hatten einen normalen Genstatus in der FISH. 3 Fälle (1,3%) waren amplifiziert und je ein Fall (0,4%) war in der FISH unklar bzw. polysom. Laut Slamon et al. (1989) lässt sich ein unklares/moderat positives Ergebnis (2+) in der IHC in bis zu 15% der Fälle feststellen. In diesen Fällen schlägt Wolff et al. (2007) für Mammakarzinome vor, eine FISH-Untersuchung durchzuführen. Sollte diese auch zu einem unklaren Ergebnis führen, müssen laut seines Algorithmus weitere Tumorzellen ausgezählt

werden oder die FISH wiederholt werden. Wenn daraus erneut ein unklares Ergebnis resultiert, wird abschließend eine weitere IHC-Untersuchung angeschlossen, mit der dann eine Entscheidung getroffen wird. In der vorliegenden Arbeit ist ein Fall sowohl in der IHC, als auch in der FISH unklar. Es wurden jedoch nur 60 Zellen in der FISH gezählt und kein Test wiederholt, da IHC und FISH doppelt blind ausgewertet wurden. Da die FISH-Ratio in diesem unklaren Fall 2,2 betrug, wäre bei weiteren Auszählungen eine Bewertung als Amplifikation gut möglich gewesen.

2,2% der Fälle (5/229) wiesen eine Polysomie auf. Keiner der polysomen Fälle zeigte im Her-2-Test ein Ergebnis von 3+, wie man vielleicht erwarten würde. Im Gegenteil, 4 Fälle (80%) waren in der IHC negativ (0 oder 1+) und ein Fall (20%) war unklar (2+). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Downs-Kelly et al. (2005) bei der Untersuchung von 56 Chromosom 17-polysomen Brustkrebsfällen. Die Immunhistochemie wurde mit dem Antikörper CB-11 von Ventana durchgeführt. 69% der Fälle waren in der IHC negativ (0 oder 1+), 27% der Fälle moderat positiv (2+) und 3% der Fälle stark positiv (3+). Die Autoren kamen zu der These, dass eine Chromosom 17-Polysomie in Abwesenheit einer Her-2/neu-Amplifikation keinen signifikanten biologischen Einfluss auf die Genexpression beim Mammakarzinom hat. Unsere Ergebnisse führen zu derselben Erkenntnis bzgl. Ovarialkarzinome.

Alles in Allem korrelierten die IHC und die FISH bei der Untersuchung von Her-2 und Her-2/neu sehr gut miteinander ($p < 0,0005$). Gegen eine Diagnostik ausschließlich mittels IHC sprechen die falsch negativen Fälle. Eine alleinige Diagnostik mittels FISH hingegen ist ein zeit- und kostenintensives Verfahren und daher an den meisten Instituten nicht durchführbar. Eine Mischung aus beiden Untersuchungsverfahren, wie Wolff et al. (2007) sie vorschlagen, scheint momentan das geeignetste Vorgehen zu sein.

### *4.5.2 Topoisomerase IIα*

Die gute Korrelation zwischen Genamplifikation und Proteinexpression traf bei den Topoisomerase IIα-Untersuchungen nicht zu, es konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Die 1,9% der Fälle mit einer starken Topoisomerase IIα-Expression (4/222) zeigten einen normalen Genstatus (3/4) oder eine Monosomie (1/4). Die Amplifikationen (5/222) gingen dagegen mit einer geringen (2/5) bis mittleren (3/5) Expression einher. Auch die polysomen Fälle (8/222) hatten nur eine geringe (2/8) und

mittlere (6/8) Expression aufzuweisen. Auch Van der Zee et al. (1994) und Koshiyama et al. (2001) stellten bei ihren Untersuchungen an Ovarialkarzinomen keine Korrelation von IHC und FISH bei der Topoisomerase IIα-Untersuchung fest. Mano et al. (2004) fanden zumindest eine mäßige Korrelation zwischen der Genamplifikation und Expression von Topoisomerase IIα ($p=0,01$). Dieses Ergebnis muss jedoch aufgrund der kleinen Menge an untersuchten Gewebeproben (63) mit Vorsicht betrachtet werden. Die Gruppe wertete die IHC nicht nach dem Remmele Score aus, wie in der vorliegenden Arbeit. Ihre Kriterien fielen weniger streng aus. Alle Tumoren, die einen Anteil von mehr als 10% angefärbter Zellen aufwiesen, wurden als positiv bewertet. Die Färbeintensität wurde nicht betrachtet. So kamen Mano et al. auf 21,4% IHC-positive Tumoren. Verglichen mit dem geringen Anteil starker Expressionen von nur 1,9% in der vorliegenden Arbeit erscheint die Zahl von Mano et al. sehr hoch. Addierte man den Anteil mittlerer Expressionen hinzu, kämen wir auf 45,1%. Es ist nach wie vor nicht klar, wie der Topoisomerase IIα-IHC-Test genau bewertet werden soll. Die Ergebnisse sind meist Resultate des subjektiven Eindruckes des jeweiligen Untersuchers und ungenau formulierter Auswertungskriterien. Die Firma Dako (Glostrup, Dänemark) stellt den monoklonalen Antikörper der Maus Clone Ki-S1 her, mit dem die IHC-Untersuchung von Topoisomerase IIα durchgeführt werden kann. Dako empfiehlt jedoch ausdrücklich diesen nur für Forschungszwecke und nicht für die Tumordiagnostik zu verwenden (DakoCytomation 2005). Diese Empfehlung spiegelt wieder, dass dieser Test, wie in vorherigen Studien und in dieser Dissertation gezeigt, noch der Optimierung und einheitlichen Auswertungskriterien bedarf.

Tsiambas et al. (2006) untersuchten endometrioide Adenokarzinome des Endometriums mittels CISH und IHC. Obwohl 45% der Karzinome (18/40) eine Überexpression von Topoisomerase IIα aufwiesen, zeigten nur 10% der Karzinome (4/40) eine Amplifikation oder Deletion. Genau wie in der vorliegenden Arbeit trat bei Tsiambas et al. bei Tumoren mit einer Topoisomerase IIα-Amplifikation keine signifikant höhere Proteinexpression auf, als bei andere Tumoren. Zu demselben Ergebnis kamen auch Mueller et al. (2004), die 81 Brustkrebs Gewebeproben mittels FISH und IHC untersuchten. Sie kamen zu dem Resultat, dass eine Topoisomerase IIα-Amplifikation keinesfalls auf eine hohe Proteinexpression schließen lässt. In Zusammenhang stand aber die Topoisomerase IIα-Überexpression mit dem fortgeschrittenen Tumorstadium. Diese Beobachtung wurde bereits an fortgeschrittenen Tumoren unterschiedlichster Art gemacht. Die hohe

Proteinexpression korreliert mit dem erhöhten DNS-Gehalt der schnell proliferierenden Tumorzellen und ermöglicht die häufige Zellteilung (Costa et al. 2000, Miettinen et al. 2000, Brustmann et Naude 2002). Es sind Faktoren auf transkriptionaler, translationaler und post-translationaler Ebene, die für eine Überexpression der Topoisomerase IIα verantwortlich zu machen sind (Isaacs et al. 1996, 1998). Die oben genannten Studien und unsere Ergebnisse zeigen damit, dass die IHC- und FISH-Resultate bei der Untersuchung der Topoisomerase IIα meist nicht übereinstimmen. Die IHC stellt also mit größter Wahrscheinlichkeit kein suffizientes Verfahren dar, um auf den Genstatus zu schließen.

### *4.5.3 EGFR und ErbB1*

Mit EGFR-Antikörpern und Tyrosinkinase-Inhibitoren wird versucht die Erfolge, die man bei Lungenkrebs erlangt hat auch auf Ovarialtumoren zu übertragen. In den bisher vorliegenden Studien wurde deshalb v.a. der Rezeptor untersucht, kaum aber das ErbB1-Gen. Stadlmann et al. (2006), Vermeij et al. (2008) und Lassus et al. (2006) sind eine der wenigen Gruppen, die sich auch mit ErbB1 beschäftigten.

Stadlmann et al. (2006) untersuchten 80 fortgeschrittene seröse Ovarialtumoren. Diese Gruppe konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der EGFR-Überexpression und der Genamplifikation bei fortgeschrittenen Primärtumoren feststellen ($p = 0{,}003$), jedoch nicht zwischen Überexpressionen und Polysomien, genau wie in der vorliegenden Arbeit. Vermeij et al. (2008) konnten in ihren FISH-Untersuchungen an 31 Ovarialkarzinomen keine Genamplifikation feststellen. In 4 Fällen (13%) lag eine hohe Polysomie vor. Die Auswertung der IHC erfolgte nach dem DAKO EGFR pharmDX interpretation guide und Goldstein et Armin (2001). Danach galten Tumoren als EGFR-positiv, wenn in mehr als 1% der Tumorzellen die Intensität der Membranfärbung 1+ oder mehr betrug. Die EGFR-positiven Tumoren wurden unterteilt in schwach (1+), moderat (2+) und stark (3+) positiv. Die 4 Fälle der hohen Polysomie trafen auf die IHC-Resultate 0, 1+ und 2+. Somit konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen der hohen Polysomie und der Rezeptorexpression festgestellt werden. Trotz der ähnlichen Auswertungssysteme in der vorliegenden Arbeit und in der Studie von Vermeij et al. liegt eine hohe Diskrepanz zwischen den Häufigkeiten der positiven IHC-Ergebnisse vor. In unserer Untersuchung waren 12,3% der Fälle EGFR-positiv, bei Vermeij et al. dagegen 64,5%. Hinsichtlich der FISH traten

weder bei Vermeij et al. noch in unserer Untersuchung Genamplifikationen auf. Das IHC-Ergebnis von Stadlmann et al. (2006), die ebenfalls nach den DAKO Empfehlungen auswerteten, lag mit der Häufigkeit der EGFR-positiven Fälle von 30% zwar näher an unserem Resultat, war aber trotzdem mehr als doppelt so hoch. Sich von unserer Methodik unterscheidende Auswertungskriterien verwendeten Lassus et al. (2006). Sie untersuchten ein sehr großes Kollektiv von 398 serösen Ovarialkarzinomen mittels IHC und CISH. In der IHC wurden die Fälle in zwei Gruppen eingeteilt: Fälle mit negativer bis schwacher Membranfärbung und Fälle mit stark positiver Membranfärbung. In der CISH galten mehr als 5 Genkopien pro Zelle als Amplifikation. Sie konnten, keinen Zusammenhang zwischen Genkopien und Proteinexpression feststellen (p=0,19).

Die einander widersprechenden Resultate in der Literatur können evtl. auf die Probleme zurück zu führen sein, die mit der immunhistochemischen Untersuchung des EGF-Rezeptors und der FISH-Untersuchung auf Genebene einher gehen. In der Immunhistochemie werden unterschiedlichste Auswertungskriterien angewandt bzw. trotz gleicher Auswertungsmethoden unterschiedlichste Ergebnissen erzielt. Die FISH von ErbB1 ist aufgrund der kleinen Signalgrößen schwierig auszuwerten und deshalb anfällig für Fehler bzw. den subjektive Eindruck seitens des Auswerters. Oben aufgeführte Studien und unsere Ergebnisse zeigen, dass durch die Untersuchung des EGF-Rezeptors mittels IHC wahrscheinlich keine Rückschlüsse auf einen aberranten Chromosomenstatus gezogen werden können. Ob eine erhöhte Proteinexpression mit einer Genamplifikation in Zusammenhang steht müssten weitere Studien zeigen.

### 4.6 Korrelation zwischen Proteinexpression bzw. Genaberrationen und dem Überleben

In der vorliegenden Arbeit zeigten weder die Überexpressionen, noch die Aberrationen der drei jeweils untersuchten Proteine bzw. Gene einen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben der Patientinnen. In der Kaplan-Meier Überlebensanalyse der Proteine lag der Log Rank Test für Her-2 bei p = 0,71, für Topoisomerase IIα bei p = 0,406 und für EGFR bei p = 0,814. Für die Gene ergab der Log Rank Test für Her-2/neu p = 0,143, für Topoisomerase IIα p = 0,773 und für ErbB1 p = 0,702. Damit zeigen die drei untersuchten Gene und ihre exprimierten Proteine laut unserer

Ergebnisse keine prognostische Relevanz bzgl. der Überlebensdauer der Patientinnen mit Ovarialkarzinomen im FIGO-Stadium III.

Es liegen vor allem Daten zur Korrelation des Her-2-Rezeptorstatus mit dem Überleben vor. Da sich IHC- und FISH-Ergebnisse jedoch hervorragend decken, können die folgenden Studien, die sich nur mit der Proteinexpression beschäftigen auch auf den Genstatus übertragen werden. Mayr et al. (2005) untersuchten sowohl den Her-2-Rezeptorstatus, als auch den Her-2/neu-Genstatus. Sie kamen zu demselben Ergebnis wie in der vorliegenden Arbeit, mit dem Unterschied, dass in ihrer Studie Ovarialtumoren verschiedenen histologischen Typs aus allen FIGO Stadien sowie gutartige Tumoren und Borderlinetumoren mit einbezogen waren. 1999 schlussfolgerten Rubin et al. aus ihren Untersuchungen, dass die Her-2-Expression kein wichtiger prognostischer Faktor für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom zu sein scheint. Bookman et al. (2003) fanden ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Her-2-Expression und der Wirksamkeit von Herceptin, dem progressionsfreien Überleben oder dem Gesamtüberleben. Andere Ergebnisse als Mayr, Bookman und Rubin lieferten Hengstler et al. (1999), die die Her-2/neu-spezifische mRNA mittels reverser semiquantitativer (rs-) PCR an Ovarialkarzinomen untersuchten. Es zeigte sich ein Zusammenhang mit dem Überleben, jedoch interessanterweise nur bei Patientinnen, die eine Chemotherapie mit Cis- bzw. Carboplatin und Cyclophosphamiden erhielten. In dieser Patientengruppe war eine hohe Zahl an Her-2/neu-Genkopien mit einer deutlich verkürzten Überlebenszeit assoziiert. Auch Berchuck et al. (1990) konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Her-2-Expression und einer schlechten Überlebensprognose der Patientinnen feststellen. Damit liegen mehrere Studien mit einander zum Teil widersprechenden Resultaten vor. Wahrscheinlich spielt Her-2/neu und sein Protein beim Ovarialkarzinom keine so große Rolle wie beim Mammakarzinom.

Wie bereits mehrfach erwähnt liegen zum Topoisomerase IIα-Genstatus bei Ovarialkarzinomen kaum Daten vor. Deswegen konnten in der Literatur auch keine Aussagen über den Zusammenhang von Topoisomerase IIα-Genamplifikationen/-deletionen und dem Überleben der Patientinnen mit Ovarialkarzinom gefunden werden. Bei Mammakarzinomen gilt die Amplifikation und die Deletion von Topoisomerase IIα als Indikator für eine schlechte Prognose und einem veränderten Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Therapieformen (Knoop et al. 2005). Doch selbst bei Mammakarzinomen besteht noch Nachholbedarf bei der Klärung der exakten

Auswirkungen einer Topoisomerase IIα-Deletion. Offensichtlich zu sein scheint, dass die Deletion eine niederschmetternd schlechte Prognose mit sich bringt (Nielsen et al. 2008). Leider besteht im Gegensatz zu Her-2/neu bei der Topoisomerase IIα eine schlechte Korrelation zwischen dem Genstatus und der Proteinexpression in der FISH und der IHC. Folgende Untersuchungen die sich mit der Genexpression und dem Überleben der Patientinnen auseinandersetzen sind deswegen nicht auf die FISH-Ergebnisse übertragbar. Diese Arbeiten zeigen aber, dass eine Topoisomerase IIα-Überexpression mit einer schlechten Prognose, einer verkürzten Überlebensdauer und wahrscheinlich auch mit der Entwicklung von Chemoresistenzen in Verbindung steht. Brustmann et al. (2003) untersuchten 51 seröse Ovarialkarzinome, indem sie die Gewebeproben mit dem monoklonalen Mäuseantikörper clone Ki-S1 (Dako, Glostrup, Dänemark) anfärbten. Die Auswertung erfolgte mit dem labeling index (LI), der dem prozentualen Anteil angefärbter Kerne in 1000 ausgezählten Zellen entspricht. Eine signifikant schlechtere Prognose ($p = 0{,}0182$) konnte für Patientinnen festgestellt werden, deren Tumor einen $LI > 50$ hatte, also eine erhöhte Topoisomerase IIα-Expression. In dieser Gruppe lag in 92% der Fälle die mediane Überlebenszeit bei 22 Monaten. Im Gegensatz dazu starben nur 43% der Patientinnen, deren $LI < 50$ war. Costa et al. (2000) fanden an 108 epithelialen Neoplasien des Ovars nicht nur einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem erhöhten Topoisomerase IIα-Enzymstatus und einer verkürzten Überlebenszeit ($p < 10^{-9}$), sondern zeigten auch, dass Patientinnen mit einer Überexpression schlechter auf die platinhaltige Standardchemotherapie ansprachen. Diese Gruppe arbeitete bei der Auswertung mit dem Topoisomerase IIα-Index, dessen Schwelle zwischen normaler und erhöhter Expression bei 30% lag. Für die Färbung wurde ein monoklonaler Antikörper der Maus verwendet (Dr. Holden's Laboratory, University of Utah) und erfolgte automatisch (Ventana 320). Hengstler et al. (1999) untersuchten Ovarialkarzinome von 77 Patientinnen und stellten fest, dass die Chemotherapie mit Carboplatin bei gleichzeitiger Inhibition der Topoisomerase IIα mit Etoposide und Novobiocin signifikant besser anschlug, als ohne die Inhibition des Enzyms und damit die Überlebenszeit verlängert werden konnte. Unsere Ergebnisse wiesen weder in der IHC-, noch in der FISH-Untersuchung signifikant darauf hin, dass ein erhöhter Gen-/Proteinstatus der Topoisomerase IIα mit einer verkürzten Überlebenszeit in Verbindung steht. Damit widersprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den oben genannten Studien. Dies mag daran liegen, dass für die Topoisomerase IIα

weder in der IHC, noch in der FISH einheitliche Auswertungskriterien definiert sind. In allen oben genannten Studien und in der vorliegenden Arbeit wurden für jede IHC-Untersuchung unterschiedliche Auswertungskriterien verwendet.

Genau wie bei der Topoisomerase IIα sind auch über den ErbB1-Genstatus bei Ovarialkarzinomen kaum Daten verfügbar. Wie oben bereits beschrieben fokussieren die meisten Studien den Rezeptor selbst und nicht das Gen, obwohl bei Lungenkrebs gerade Patienten mit einer hohen Polysomie von einer Therapie mit Tyrosinkinase Inhibitoren profitieren (Vermeij et al. 2008). Psyrri et al. (2005) untersuchten an 150 fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen die EGFR-Expression. Für die Evaluation des EGF-Rezeptors verwendete die Gruppe die auf Immunfluoreszenz basierende Methode AQUA (automated in situ quanitative measurement of protein analysis). High-resolution Bilder (1,024 x 1,024) wurden von den Präparaten aufgenommen und danach die EGFR-Signale auf einer Skala von 1 bis 255 für die Pixelintensität bewertet. Eine hohe EGFR-Expression stand in dieser Studie signifikant in Zusammenhang mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit ($p = 0,0001$). Auch Lassus et al. (2006) kamen zu diesem Ergebnis ($p = 0,027$). Sie untersuchten an 398 Ovarialkarzinomen sowohl den Genstatus, als auch die Proteinexpression von ErbB1 bzw. EGFR. Eine erhöhte Zahl von Genkopien hatte in dieser Untersuchung ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang ($p<0,0001$) mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit, obwohl keine Korrelation zwischen Genstatus und Proteinexpression bestand. In der vorliegenden Arbeit konnte im Gegensatz dazu kein Zusammenhang zwischen einem erhöhten ErbB1-Genstatus und dem Überleben festgestellt werden. Evtl. ist jedoch ein Trend in diese Richtung interpretierbar, da die prozentual häufigsten Sterbefälle sich mit je 64% bei den Fällen mit niedriger Trisomie und niedriger Polysomie (51/80 und 37/58) ereigneten. Es handelt sich hierbei also um Fälle, bei denen die Genkopiezahl zumindest leicht erhöht war. Mit 62% folgte in der Häufigkeit der Todesfälle die hohe Polysomie (13/21).

Konform hinsichtlich unseres Ergebnisses in der immunhistochemischen Untersuchung gehen Elie et al. (2004). Sie färbten 93 fortgeschrittene Ovarialkarzinome (FIGO III/IV) mit dem monoklonalen Antikörper NCL-EGFR, clone EGFR. 113; Tebu (Verdünnung 1/10). Die EGFR-Überexpression hatte signifikant keinen prognostischen Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Wie oben bereits beschrieben sind die Möglichkeiten eine EGFR-Überexpression bzw. eine Aberration auf genetischer Ebene zu ermitteln unzufriedenstellend.

Unterschiedliche Methoden und Auswertungskriterien lassen die Daten einander widersprechen. Insbesondere die Auswertung der Rezeptorexpression in der IHC bedarf genaueren und einheitlicheren Regeln. Ob ein veränderter Gen-, Chromosomen- oder Rezeptorstatus Einfluss auf die Überlebensdauer der Patientinnen mit (fortgeschrittenem) Ovarialkarzinom hat, lässt sich mit den derzeit zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden nicht sicher klären.

### 4.7 Schlussfolgerung

Fortgeschrittene Ovarialkarzinome (FIGO III) wiesen in der vorliegenden Arbeit innerhalb ihrer Gruppe Unterschiede in der Häufigkeit der Amplifikationen auf. Her-2/neu-Amplifikationen traten am häufigsten auf, gefolgt von der Topoisomerase IIα-Amplifikation. Eine Amplifikation des ErbB1-Genes konnte in keinem der Fälle festgestellt werden. Bei Betrachtung der Polysomien drehte sich die Reihenfolge der Häufigkeiten um: an erster Stelle stand ErbB1, an zweiter Topoisomerase IIα zusammen mit Her-2/neu. Generell mag ein aberranter Gen- oder Chromosomenstatus von Her-2/neu, Topoisomerase IIα und ErbB1 eine Rolle als prognostischer Faktor bei Ovarialkarzinomen spielen. Doch innerhalb der Gruppe der FIGO III-Patientinnen scheinen diese Genaberrationen und/oder Proteinüberexpressionen unseren Ergebnissen zu Folge nicht in Zusammenhang mit der Überlebensdauer (kurz, mittel, lang) zu stehen.

Eine sehr gute Korrelation mit hoher Signifikanz ($p < 0,0005$) ergab sich beim Vergleich der FISH-Untersuchung von Her-2/neu mit der von Topoisomerase IIα hinsichtlich der Koamplifikationen und Kopolysomien. Durch eine Vereinheitlichung und genauere Definitionen beider Auswertungssysteme könnte der Zusammenhang jedoch noch deutlicher gezeigt werden. Bei der Korrelation von Her-2/neu mit ErbB1 lag ein Trend zur Signifikanz vor. Während eine Her-2/neu-Amplifikation und die Polysomie des Chromosoms 7 zwei voneinander unabhängige Ereignisse zu sein scheinen, könnte ein Zusammenhang zwischen den Polysomien der Chromosomen 7 und 17 bestehen. Diese Annahme wurde beim Vergleich der Topoisomerase IIα- und ErbB1-Untersuchung bestätigt. Da im Auswertungssystem von Topoisomerase IIα die Polysomien klarer herausgestellt werden konnten, als bei der Untersuchung von Her-2/neu, ergab sich ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p < 0,0005$) zwischen den

Polysomien der Chromosomen 7 und 17. Welche Rolle eine Topoisomerase IIα-Deletion beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom spielt kann mit der vorliegenden Arbeit nicht zufriedenstellend beantwortet werden, da innerhalb der 243 untersuchten Fälle nur eine Deletion ermittelt werden konnte. Diese Patientin erreichte eine mittlere Überlebensdauer.

FISH- und IHC-Ergebnisse korrelierten nur bei der Untersuchung von Her-2/neu und seinem exprimierten Rezeptor signifikant ($p < 0,0005$). In wenigen Fällen lag jedoch ein falsch negatives Ergebnis in der IHC vor. Dennoch scheint die IHC eine geeignete Methode zu sein, eindeutig positive Fälle (3+) sicher zu identifizieren und damit die Zahl der Fälle, die auch mittels FISH untersucht werden sollten einzuschränken. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die immunhistochemische Untersuchung von Topoisomerase IIα und EGFR alleine nicht als diagnostisches Verfahren ausreicht. Wie auch in der Literatur beschrieben konnte keine Korrelation zwischen Proteinstatus und zugehörigem Genstatus in der FISH festgestellt werden.

Mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen lassen sich demnach die unterschiedlichen Krankheitsverläufe und Überlebensdauern der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (FIGO III) leider nicht erklären. Weitere Untersuchungen sind nötig, um dieser Patientengruppe eine individuelle Therapie anbieten zu können.

## 5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist die am häufigsten tödlich verlaufende Tumorerkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane und mit anderen Krebserkrankungen des Ovars die fünft-häufigste Tumorerkrankung der Frau in Deutschland. Im Jahr 2006 starben 5.636 Patientinnen alleine in der Bundesrepublik durch diese bösartigen Neubildungen. Da diese Erkrankung zunächst symptomlos bzw. symptomarm verläuft und keine ausreichenden Screeningverfahren zur Verfügung stehen, wird bei ca. 75 % der Patientinnen ein Ovarialkarzinom erst im FIGO-Stadium III diagnostiziert. Meist ist es dann nur noch palliativ behandelbar; die Heilungschancen liegen nur noch bei 10%. Betrachtet man die Gruppe von Patientinnen im FIGO-Stadium III isoliert, so fällt auf, dass trotz gleichen Tumorstadiums und gleicher Therapie Unterschiede (kurz, mittel, lang) bezüglich der Überlebensdauer zu beobachten sind.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die Bedeutung der Gene Her-2/neu, Topoisomerase IIα sowie ErbB1 und ihrer exprimierten Proteine für die Überlebensdauer dieser Patientengruppe zu untersuchen, um somit möglicherweise das variable Verhalten bezüglich des Überlebens dieser rein histomorphologisch gleichartigen Tumoren erklären zu können. Dies wiederum könnte als Grundlage für weiterführende Untersuchungen, insbesondere in Hinblick auf das therapeutische Vorgehen dienen.

O.g. Gene und ihre Proteine spielen bei der Entstehung, aber auch bei der Behandlung anderer Tumorerkrankungen eine große Rolle. Bei den exprimierten Proteinen handelt es sich um zwei Rezeptoren und ein Enzym der Translation, die in Tumorgeweben u.a. an verändertem Zellwachstum, Apoptose-Hemmung, Zellmigration, Metastasierung und Angiogenese beteiligt sind. Eine Her-2/neu-Genamplifikation findet sich in 20-30% aller Mammakarzinome. Der dadurch häufig überexprimierte Rezeptor Her-2 ist Ziel des humanisierten monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Überexprimierende Tumorzellen können damit sehr erfolgreich bekämpft und das Tumorwachstum gehemmt werden. Die Topoisomerase IIα-Amplifikation wird ebenfalls gehäuft bei Brustkrebs beobachtet. Das überexprimierte Enzym ist Angriffspunkt mehrerer Chemotherapeutika, z. B. von Anthrazyklinen. Ein aberranter Gen- und Chromosomenstatus von ErbB1 wurde zuerst bei Lungenkrebs festgestellt, tritt aber auch gehäuft bei Colon- und Mammakarzinomen auf. In diesen Fällen konnten sich Antikörper (z. B. Cetuximab) oder Tyrosinkinase-Inhibitoren (z. B. Gefitinib), die gegen

den exprimierten Rezeptor gerichtet sind als wirksame Chemotherapeutika etablieren. Zur Untersuchung der Rolle o.g. Gene und Proteine bei Ovarialkarzinomen kamen in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung und die Immunhistochemie zur Anwendung.

Her-2/neu war in 4,4% der Fälle (10/229) amplifiziert und in 1,7% der Fälle (4/241) überexprimiert (3+). Die Amplifikation von Topoisomerase IIα lag bei 2,2% (5/227), ihre Deletion bei 0,4% (1/227) und die starke Überexpression bei 1,8% (4/227) Bei ErbB1 konnten keine Amplifikationen festgestellt werden, der Anteil hoher Polysomien lag bei 10,8% (24/222) und die Überexpressionen bei 13,1% (30/229). Damit trat in dieser Arbeit die Amplifikation des Her-2/neu Genes bei FIGO III Ovarialkarzinomen am häufigsten ein, gefolgt von der Topoisomerase IIα-Amplifikation. Sämtliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liegen unter den in der Literatur angegebenen Zahlen. Für diese Diskrepanz sind v.a. uneinheitliche Untersuchungsmethoden und unterschiedliche Auswertungskriterien verantwortlich zu machen. Aufgrund der geringen Anzahl von nur einer Deletion, die mit einem normalen Her-2/neu Genstatus und einer mittleren Topoisomerase IIα-Proteinexpression einher ging, konnte daraus kein relevanter Schluss gezogen werden. Zwischen Her-2/neu und Topoisomerase IIα lagen 1,8% Koamplifikationen vor, wobei 50% der Her-2/neu amplifizierten Fälle auch Topoisomerase IIα-amplifiziert waren. Dies entspricht den Daten bei Mammakarzinomen. Eine Koamplifikation zwischen Her-2/neu und ErbB1 lag nicht vor. Die Amplifikation von Her-2/neu und eine hohe Polysomie in der ErbB1 Untersuchung scheinen zwei voneinander unabhängige Ereignisse zu sein. Überraschend in der vorliegenden Arbeit war, dass 50% der Polysomien des Chromosoms 17 mit den hohen Polysomien des Chromosoms 7 korrelierten und die anderen 50% mit den niedrigen Polysomien des Chromosoms 7.

Beim Vergleich der Gen-, Chromosomen- und Proteinstati mit den Überlebensdaten war kein Zusammenhang erkennbar, der die heterogene Überlebensdauer innerhalb der Gruppe der FIGO III-Patientinnen erklären konnte.

Die Korrelation zwischen der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung und der Immunhistochemie bei der Untersuchung von Her-2/neu und dem Her-2 Rezeptor war exzellent ($p<0,0005$). Bisher veröffentlichte Ergebnisse zu diesem Thema werden damit bekräftigt. Eine Her-2/neu Genveränderung in Ovarialkarzinomen wirkt sich also genauso auf den Rezeptorstatus aus, wie es bereits bei Mammakarzinomen beobachtet wurde. Obwohl Her-2/neu wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle

bei Ovarialkarzinomen spielt, konnte zumindest für Mammakarzinome noch einmal bestätigt werden, dass die Immunhistochemie eine suffiziente Untersuchungsmethode ist. Die gute Korrelation zwischen Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie traf für die Topoisomerase IIα und ErbB1/EGFR Untersuchungen nicht ein. Auch dieses Ergebnis stimmt mit den bisherigen Literaturdaten überein.

Ein aberranter Gen- oder Chromosomenstatus von Her-2/neu, Topoisomerase IIα und ErbB1 sowie ihre Proteinüberexpression mögen generell Prognosefaktoren bei Ovarialkarzinomen sein. Innerhalb der Gruppe der FIGO III-Patientinnen scheinen diese Genaberrationen und/oder Proteinüberexpressionen keine Rolle für die unterschiedliche Überlebensdauer (kurz, mittel, lang) zu spielen. Somit konnte leider auch keine therapeutische Relevanz dieser Gene und ihrer Proteine für das fortgeschrittene Krankheitsstadium festgestellt werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um dieser Patientengruppe eine individuelle Therapie anbieten zu können.

## 6 Literaturverzeichnis


1. **Aydin C., Ulnap H. R., Baloglu A., Inci A. G., Yigit S., Yavuzcan A. (2008)**
*Axillary lymph node metastasis from serous ovarian cancer: a case report and review of the literature*
Arch Gynecol Obstet. 2008 May 10. (Epub ahead of print)

2. **Baekelandt M., Kristensen G. B., Trope C. G., Nesland J. M., Holm R. (1999)**
*Epidermal growth factor receptor expression has no independent prognostic significance in advanced ovarian cancer.*
Anticancer Res. 19: 4469– 4474

3. **Bartlett J.M., Langdon S. P., Simpson B. J., Stewart M., Katsaros D., Sismondi P., Love S., Scott W. N., Williams A. R., Lessells A. M., Macleod K. G., Smyth J. F., Miller W. R. (1996)**
*The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer*
Br J Cancer. 73: 301–306

4. **Baselga J., Albanell J., Molina M. A., Arribas J. (2001)**
*Mechanism of action of trastuzumab and scientific update*
Semin Oncol. 28 (Suppl. 16): 4-11

5. **Berchuck A., Kamel A., Whitaker R., Kerns B., Olt G., Kinney R., Soper J. T., Dodge R., Clarke-Pearson D. L., Marks P., McKenzie S., Yin S., Bast R. C., Jr. (1990)**
*Overexpression of HER-2/neu Is Associated with Poor Survival in Advanced Epithelial Ovarian Cancer*
Canc Res. 50: 4087-4091

6. **Bookman M. A., Darcy K. M., Clarke-Pearson D., Boothby R. A., Horowitz I. R. (2003)**
*Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent of refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group*
J Clin Oncol. 21: 283-290

7. **Brustmann H. (2004)**
*Vascular endothelial growth factor expression in serous ovarian carcinoma: relationship with topoisomerase IIα and prognosis*
Gynecol Oncol. 95: 16-22

8. **Brustmann H. et Naude S. (2002)**
*Expression of topoisomerase IIalpha, Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, p53, and argyrophilic nucleolar organizer regions in vulvar squamous lesions*
Gynecol Oncol. 86: 192-199

9. **Bull Phelps S. L., Schorge J. O., Peyton M. J., Shigematsu H., Xiang L.-L., Miller D. S., Lea J. S. (2008)**
*Implications of EGFR inhibition in ovarian cancer cell proliferation*
Gynecol Oncol. 109 (3): 411-417

10. **Cappuzzo F., Hirsch F. R., Rossi E., Bartolini S., Ceresoli G. L., Bemis L., Haney J., Witta S., Danenberg K., Domenichini I., Ludovini V., Magrini E., Gregorc V., Doglioni C., Sidoni A., Tonato M., Franklin W. A., Crino L., Bunn P. A. Jr., Varella-Garcia M. (2005)**
*Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer*
J Natl Cancer Inst. 97 (9): 643-655

11. **Cerciello F., Riesterer O., Sherweif M., Odermatt B., Ciernik F. I. (2007)**
*Is EGFR a moving target during radiotherapy of carcinoma of the uterine cervix?*
Gynecol Oncol. 106: 394-399

12. **Chekerov R., Klaman I., Zafrakas M., Könsgen D., Mustea A., Petschke B., Lichtenegger W., Sehouli J., Dahl E. (2006)**
*Altered Expression Pattern of Topoisomerase IIα in Ovarian Tumor Epithelial and Stromal Cells after Platinum-Based Chemotherapy*
Neoplasia. 8 (1): 38-45

13. **Chen Y., Wu P.-C., Lang J.-H., Ge W.-J., Hartge P., Brinton L. A. (1992)**
*Risk Factors for Epithelial Ovarian Cancer in Beijing, China*
Int J Epidemiol. 21: 23-29

14. **Costa M. J., Hansen Ch. L., Holden J. A., Guinee Jr. D. (2000)**
*Topoisomerase IIα: Prognostic Predictor and Cell Cycle Marker in Surface Epithelial Neoplasms of the Ovary and Peritoneum*
Int J Gynecol Pathol. 19: 248-257

15. **Dako, Denmark (2006)**
*Pathology. EGFR pharmDx™. Interpretation Manual*

16. **Dako, Denmark (2007)**
*TOP2A FISH pharmDx™ Kit. Code K5333*
3. Ausgabe

17. **DakoCytomation, USA (2002)**
*HercepTest®. A Manual for Interpretation. Targeted Therapies Require Targeted Diagnostics*

18. **DakoCytomation, Denmark (2005)**
*Monoclonal Mouse Anti-Human Topoisomerase IIα Clone Ki-S1*

19. **De Potter C. R., Quatacker J., Maertens G., Van Daele S., Pauwels C., Verhofstede C., Eechaute W., Roels H. (1989)**
*The subcellular localization of the neu protein in human normal and neoplastic cells*
Int J Cancer. 44 (6): 969-974

20. **Depowski P. L., Rosenthal S. I., Brien T. P., Stylos S., Johnson R. L., Ross J. S. (2000)**
*Topoisomerase IIα Expression in Breast Cancer: Correlation with Outcome Variables*
Mod Pathol. 13 (5): 542-547

21. **Deutsche Krebsgesellschaft e. V.(2007)**
*Krebsentstehung – was ist Krebs?*

22. **Deutsche Krebsgesellschaft e. V. (2007)**
*Krebshäufigkeit – die aktuellen Zahlen*

23. **Di Leo A., Gancberg D., Larismont D., Tanner M., Jarvinen T., Rouas G., Dolci S., Leroy J.-Y., Paesmans M., Isola J., Piccart M. J. (2002)**
*HER-2 Amplification and Topoisomerase IIα Gene Aberrations as Predictive Markers in Node-positive Breast Cancer Patients Randomly Treated Either with an Anthracycline-based Therapy or with Cyclophosphamide, Methotrexate and 5-Fluorouracil*
Clin Canc Res. 8: 1107-1116

24. **Di Leo A., Larismont D., Gancberg D., Jarvinen T., Beauduin M., Vindevoghel A., Michel J., Focan C. H., Ries F., Gobert P. H., Closon-Dejardin M. T., Dolci S., Rouas G., Paesmans M., Lobelle J. P., Isola J., Piccart M. J. (2001)**
*HER-2 and topoisomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide*
Ann Oncol. 12 (8): 1081-1089

25. **Dinh P., Harnett P., Piccart-Gebhart M. J., Awada A. (2008)**
*New therapies for ovarian cancer: Cytotoxics and molecularly targeted agents*
Crit Rev Oncol Hematol. 67 (2): 103-112

26. **Downs-Kelly E., Yoder B. J., Stoler M., Tubbs R. R., Skacel M., Grogan T., Roche P., Hicks D. G. (2005)**
*The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: a flourescent in situ hybridization, immunohistochemical and isotopic mRNA in situ hybridization study*
Am J Surg Pathol. 29 (9): 1221-1227

27. **Fajac A., Bernard J., Lhomme C., Rey A., Duvillard P., Rochard F., Bernaudin J. F., Riou F. (1995)**
*C-erbB 2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis*
Int J Cancer. 64 (2): 146-151

28. **Faratian D. and Bartlett J. (2008)**
*Predictive markers in breast cancer – the future*
Histopathology 52: 91-98

29. **Fritz P., Cabrera C. M., Dippon J., Gerteis A., Simon W., Aulitzky W. E., van der Kuip H. (2005)**
*C-erbB2 and topoisomerase IIα protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study*
Breast Cancer Res. 7 (3): R374-R384

30. **Future Oncology: Mechanisms in Malignancy. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Pathway in Cancer. Part I – Ligands, Receptors and Downstream Effectors**
**A New Medicine Publication (2007)**
*Siafaca K., Tankosic T., Pestonjamasp V. (Eds.)*
New Medicine Inc., Vol. 8, Number 11/12: 1922-1956

31. **Giaccone G., Gazdar A. F., Beck H., Zunino F., Capranico G. (1992)**
*Multidrug sensitivity phenotype of human lung cancer cells associated with topoisomerase II expression*
Cancer Res. 52 (7): 1666-1674

32. **Goff B. A., Muntz H. G., Greer B. E., Tamimi H. K., Gown A. M. (1998)**
*Oncogene expression: long-term compared with short-term survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer.*
Obstet Gynecol. 92 (1): 88-93

33. **Goldstein N. S. and Armin M. (2001)**
*Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Commmittee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system*
Cancer. 92: 1331

34. **Hannemann J., Kristel P., van Tinteren H., Bontenbal M., van Hoesel Q. G. C. M., Smit W. M., Nooij M. A., Voest E. E., van der Wall E., Hupperets P., de Vries E. G. E., Rodenhuis S., van de Vijver M. J. (2006)**
*Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase IIa: predictive role in dose intensive adjuvant chemotherapy*
Br J Cancer. 95: 1334-1341

35. **Hellström I., Goodman G., Pullman J., Yang Y., Hellström K. E. (2001)**
*Overexpression of HER-2 in Ovarian Carcinomas*
Canc Res. 61: 2420-2423

36. **Hengstler J. G., Lange J., Kett A., Dornhöfer N., Meinert R., Arand M., Knapstein P. G., Becker R., Oesch F., Tanner B. (1999)**
*Contribution of c-erbB-2 and Topoisomerase IIα to Chemoresistance in Ovarian Cancer*
Canc Res. 59: 3206-3214

37. **Hicks D. G., Yoder B. J., Pettay J., Swain E., Tarr S., Hartke M., Skacel M., Crowe J. P., Budd G. T., Tubbs R. R. (2005)**
*The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study*
Hum Pathol. 36 (4): 348-356

38. **Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren (2006, überarbeitet 2007)**
*Herausgegeben von der Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e.V.*
1. Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag München Wien New York

39. **Isaacs R. J., Davies S. J., Sandri M. I., Redwood C., Wells N. J., Hickson I. D. (1998)**
*Physiologic regulation of eukaryotic topoisomerase II*
Biochem Biophys Acta. 1400: 121-137

40. **Isaacs R. J., Harris A. L., Hickson I. D. (1996)**
*Regulation of the human topoisomerase IIalpha gene promoter in confluence-arrested cells*
J Biol Chem. 271: 16741-16747

41. **Isola J. J., Tanner M., Holli K., Joensuu H. (2000)**
*Amplification of topoisomerase IIα is a strong predictor of response to epirubicin-based chemotherapy in HER-2/neu positive matastatic breast cancer*
Breast Cancer Res Treat. 68: 31

42. **Jacobs T., Gown A., Yaziji H., Barnes M., Schnitt S. (1999)**
*Her-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunhistochemistry. A study of interlaboratory agreement*
Am J Clin Pathol 113 (2): 251-258

43. **Järvinen T. A. H., Tanner M., Rantanen V., Bärlund M., Borg Å., Grénman S., Isola J. (2000)**
*Amplification and Deletion of Topoisomerase IIa Associate with ErbB-2 Amplification and Affect Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin in Breast Cancer*
Am J Pathol. 156: 839-847

44. **Kaern J., Aghmesheh M., Nesland J. M., Danielsen H. E., Sandstad B., Friedlander M., Tropé C. (2005)**
*Prognostic factors in ovarian carcinomas stage III patients. Can biomarkers improve the prediction of short- and long-term survivors?*
Int J Gynecol Cancer. 15 (6): 1014-1022

45. **Kamura T., Jeon J. D. (2002)**
*Lymph node metastasis in a gynecologic malignancy*
Yonsei Med J. 43 : 783-791

46. **Knoop A. S., Knudsen H., Balslev E., Rasmussen B. B., Overgaard J., Nielsen K. V., Schonau A., Gunnarsdóttir K., Olsen K. E., Mouridsen H., Ejlertsen B. (2005)**
*Retrospective Analysis of Topoisomerse IIa Amplifications and Deletions As Predictive Markers in Primary Breast Cancer Patients Randomly Assigned to Cyclophosphamide, Methotrexate, and Fluorouracil or Cyclophosphamide, Epirubicin, and Fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group*
J Clin Oncol. 23: 7483-7490

47. **Kury F. D., Schneeberger C., Sliutz G., Kubista E., Salzer H., Medl M., Leodolter S., Swoboda H., Zeillinger R., Spona J. (1990)**
*Determination of HER2/neu amplification end expression in tumour tissue and cultured cells using a simple phenol free method for nucleic acid isolation*
Oncogene. 5 (9): 1403-1408

48. **Lafky J. M., Wilken J. A., Baron A. T., Maihle N. J. (2008)**
*Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer*
Biochem Biophys Acta. 1785: 232-265

49. **Landis S. H., Murray T., Bolden S., Wingo P. A. (1999)**
*Cancer Statistics, 1999*
CA Cancer J Clin. 49: 8-33

50. **Lassus H., Sihto H., Leminen A., Joensuu H., Isola J., Nupponen N. N., Butzow R. (2006)**
*Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma*
J Mol Med. 84: 671-681

51. **Ma Y., Lespagnard L., Durbecq V., Paesmans M., Desmedt C., Gomez-Galdon M., Veys I., Cardoso F., Sotiriou C., Di Leo A., Piccart M. J., Larismont D. (2005)**
*Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice*
Clin Cancer Res. 11 (12): 4393-4399

52. **Mano M. S., Awada A., Di Leo A., Durbeq V., Paesmans M., Cardoso F., Larsimont D., Piccart M. (2004)**
*Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma*
Gynecol Oncol. 92: 887-895

53. **Mayr D., Kanitz V., Amann G., Engel J., Burges A., Löhrs U., Diebold J. (2005)**
*HER-2/neu gene amplification in ovarian tumours: a comprehensive immunohistochemical and FISH analysis on tissue microarrays*
Histopathology. 48: 149-156

54. **McKeage K. and Perry C. M. (2002)**
*Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2*
Drugs. 62: 209-243

55. **Meden H., Marx D., Raab T., Kron M., Schauer A., Kuhn W. (1995)**
*EGF-R and overexpression of the oncogene c-erbB-2 in ovarian cancer: immunohistochemical findings and prognostic value*
J Obstet Gynaecol. 21: 167–178

56. **Meden H., Marx D., Roegglen T., Schauer A., Kuhn W. (1998)**
*Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) and response to chemotherapy in patients with ovarian cancer*
Int J Gynecol Pathol. 17 (1): 61-65

57. **Miettinen H. E., Jarvinen T. A., Kellner U., Kauraniemi P., Parwaresch R. Rantala I., Kalimo H., Paljarvi L., Isola J., Haapasalo H. (2000)**
*High topoisomerase IIalpha expression associates with high proliferation rate and poor prognosis in oligodendrogliomas*
Neuropathol Appl Neurobiol. 26: 504-512

58. **Mueller R. E., Parkes R. K., Andrulis I., O'Malley F. P. (2004)**
*Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples*
Genes Chromosomes Cancer. 39 (4): 288-297

59. **Nielsen K. V., Ejlertsen B., Møller S., Jørgensen J. T. Knoop A., Knudsen H., Mouridsen H. T. (2008)**
*The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D*
Acta Oncol. 47 (4): 725-734

60. **Olsen C. M., Cnossen J., Green A. C., Webb P. M. (2007)**
*Comparison of symptoms and presentation of women with benign, low malignant potential and invasive ovarian tumors*
Eur J Gynaecol Oncol. 28 (5): 376-380

61. **Olsen K. E., Knudsen H., Rasmussen B. B., Balsley E., Knoop A., Ejlertsen B., Nielsen K. V., Schönau A., Overgaard J.; Danish Breast Cancer Co-operative Group (2004)**
Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cacer investigated by new FISH probes
Acta Oncol 43(1): 35-42

62. **Pauletti G., Dandekar S., Rong H., Ramos L., Peng H., Sheshadri R., Slamon D. (2000)**
*Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunhistochemistry*
J Clin Onco. 18 (21): 3651-3664

63. **Pike M. C., Pearce C. L., Peters R., Cozen W., Wan P., Wu A. H. (2004)**
*Hormonal factors and the risk of invasive ovarian cancer: a population-based case-control study*
Fertil Steril. 82 (1): 186-195

64. **Press M. F., Slamon D. J., Flom K. J., Park J., Zhou J.-Y., Bernstein L. (2002)**
*Evaluation of HER-2/neu Gene Amplifikation and Overexpression: Comparison of Frequently Used Assay Methods in a Molecularly Characterized Cohort of Breast Cancer Specimens*
J Clin Oncol. 20: 3095-3105

65. **Protopapas A., Diakomanolis E., Bamias A., Milingos S., Markaki S., Papadimitriou C., Dimopoulos A. M., Michalas S. (2004)**
*The prognostic significance of the immunohistochemical expression of p53, bcl-2, c-erbB2 and cathepsin-D in ovarian cancer patients receiving platinum with cyclo-phosphamide of paclitaxel chemotherapy*
Eur J Gynaecol Oncol. 25 (2): 225-229

66. **Psyrri A., Kassar M., Yu Z., Bamias A., Weinberger P. M., Markakis S., Kowalski D., Camp R. L., Rimm D. L., Dimopoulos M. A. (2005)**
*Effect of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level on Survival in Patients with Epithelial Ovarian Cancer*
Clin Cancer Res. 11: 8637-8643

67. **Raspollini M. R., Amunni G., Villanucci A., Castiglione F., Rossi Degl'Innocenti D., Baroni G., Paglierani M., Taddei G. L. (2006)**
*HER-2/neu and bcl-2 in Ovarian Carcinoma: Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Study in Patients With Shorter and Longer Survival*
Appl Immunohistochem Mol Morphol. 14: 181-186

68. **Reddy J. C., Reimann J. D., Anderson S. M., Klein P. M. (2006)**
*Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study*
Clin Breast Cancer. 7 (2): 153-157

69. **Reese D. and Slamon D. (1997)**
*HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer*
Stem. 15 (1):1-8

70. **Remmele W. (Hrsg.), Bässler R., Böcker W., Dallenbach-Hellweg G., Dietel M., Harms D. Klöppel G., Müntefering H., Poldleck J., Saeger W., Schmid K. W., Schmidt D., Vogel M. (1997)**
*Pathologie Bd. 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe (S. 90-123)*
2., neubearbeitete Auflage 1997
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

71. **Remmele W. and Stegner H., E. (1987)**
*Recommendation for uniform definition of a immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*
Pathologe. 8 (3): 138-140

72. **Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.), Berlin (2008)**
*Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeit und Trends*
6. überarbeitete Auflage

73. **Ross J. S., Yang F., Kallakury B. V., Sheehan C. E., Ambros R. A., Muraca P. J. (1999)**
*HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary*
Am J Clin Pathol. 111 (3): 311-316

74. **Rubin S. C., Finstad C. L., Wong G. Y., Almadrones L., Plante M., Lloyd K. O. (1993)**
*Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis*
Am J Obstet Gynecol. 168 (1 Pt. 1): 162-169

75. **Sassen A., Rochon J., Wild P., Hartmann A., Hofstaedter F., Schwarz S., Brockhoff G. (2008)**
*Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cacer patients*
Breast Cacer Res. 10 (1): R2

76. **Schilder F. J., Sill M. W., Chen X., Darcy K. M., Decesare S. L., Lewandowski G., Lee R. B., Arciero C. A., Wu H., Godwin A. K. (2005)**
*Phase II study of gefitinib in patients with relapsed or persistent ovarian or primary peritoneal carcinoma and evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group Study*
Clin Cancer Res. 11: 5539-5548

77. **Schoenberg Fejzo M., Slamon D. J. (2001)**
*Technical Advance. Frozen Tumor Tissue Microarray Technology for Analysis of Tumor RNA, DNA, and Proteins*
Am J Pathol. 159 (5): 1645-1650

78. **Scully R. E. (1999)**
*Histological typing of ovarian tumors. WHO International Histological Classification of Tumours*
2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York.

79. **Scully R. E., Henson D. E., Nielsen M. L., Ruby S. G. (1996)**
*Practice protocol for the examination of specimens removed from patients with ovarian tumors. A basis for checklists*
Cancer. 78:927-940

80. **Silva E. G., Gershenson D. M. (1998)**
*Standardized histologic grading of epithelial ovarian cancer: elusive after all these years*
Gynecol Oncol. 70:1

81. **Silverberg S. G. (2000)**
Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal
Int J Gynecol Pathol. 19:7-15

82. **Slamon D., Godolphin W., Jones L., Holt J., Wong S., Keith D., Levin W., Stuart S., Udove J., Ullrich A., Press M. (1989)**
*Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*
Science. 244: 707-712

83. **Sng J. H., Heaton V. J., Bell M., Maini P., Austin C. A., Fisher L. M. (1999)**
*Molecular cloning and characterization of the human topoisomerase IIalpha and IIbeta genes: evidence for isoform evolution through gene duplication*
Biochem Biophys Acta. 1444: 395-406

84. **Stadlmann S., Gueth U., Reiser U., Diener P.-A., Zeimet A. G., Wight E., Mirlacher M., Sauter G., Mihatsch M. J., Singer G. (2006)**
*Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer*
Modern Pathology. 9: 607-610

85. **Statistisches Bundesamt (2008)**
*Todesursachenstatistik in Deutschland*
Fachserie 12, Reihe 4, 1-114

86. **Surowiak P., Materna V., Kaplenko I., Spaczynski M., Dietel M., Lage H., Zabel M. (2006)**
*Topoisomerase 1A, Her/2neu and Ki67 expression in paired primary and relapse ovarian cancer tissue samples*
Histol Histopathol. 21: 713-720

87. **Tammela J. et Odunsi K. (2004)**
*Gene expression and prognostic significance in ovarian cancer*
Minerva Ginecol. 56 (6): 495-502 Review

88. **Tanner M., Järvinen P., Isola J. (2001)**
*Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIα in primary and metastatic breast cancer*
Canc Res. 61: 5345-5348

89. **Tavassoli F. A., Devilee P. (Eds.) (2003)**
*World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs*
S. 114-116
IARC Press: Lyon 2003

90. **Trastour C., Rahili A., Schumacker Ch., Effi A. B., Bernard J.-L. (2004)**
*Hematogenous rectal metastasis 20 years after removal of epithelial ovarian cancer*
Gynecol Oncol. 94: 584-588

91. **Troxell M. L., Bangs Ch., Lawce H. J., Galperin I. B., Baiyee D., West R. B., Olson S. B., Cherry A. M. (2006)**
*Evaluation of Her-2/neu Status in Carcinomas With Amplified Chromosome 17 Centromere Locus*
Am J Clin Pathol. 126: 709-716

92. **Tsai-Pflugfelder M., Liu A. A., Tewey K. M., Whang-Peng J., Knutsen T. (1988)**
*Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22*
Proc Natl Acad Sci USA. 85: 7177-7181

93. **Tsiambas E., Alexopoulou D., Lambropoulou S., Gerontopoulos K., Karakitsos P., Karameris A. (2006)**
*Targeting topoisomerase IIα in endometrial adenocarcinoma: a combined chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry study based on tissue microarrays*
Int J Gynecol Cancer. 16: 1424-1431

94. **Tumorzentrum Südost-Niedersachsen (2006)**
*Leitlinie: Ovarialkarzinom*
Liebrich 02/2006

95. **Tung K.-H., Wilkens L. R., Wu A. H., McDuffie K., Nomura A. M. Y., Kolonel L. N., Terada K. Y., Goodman M. T. (2005)**
*Effect of anovulation factors on pre- and postmenopausal ovarian cancer risk: revisiting the incessant ovulation hypothesis*
Am J Epidemiol. 161 (4): 321-329

96. **Ullrich A., Schlessinger J. (1990)**
*Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*
Cell. 61: 203-212

97. **Van der Burg M. E., Henzen-Logmans S. C., Foekens J. A., Berns E. M., Rodenburg C. J., van Putten W. L., Klijn J. G. (1993)**
*The prognostic value of epidermal growth factor receptors, determined by both immunohistochemistry and ligand binding assays, in primary epithelial ovarian cancer: a pilot study*
Eur J Cancer. 29A: 1951–1957

98. **Van der Zee A. G., De Vries E. G., Hollema H., Kaye S. B., Brown R., Keith W. N. (1994)**
*Molecular analysis of the topoisomerase II alpha gene and its expression in human ovarian cancer*
Ann Oncol. 5 (1): 75-81

99. **Vermeij J., Teugels E., Bourgain C., Xiangming J., in't Veld P., Ghislain V., Neyns B., De Grève J. (2008)**
*Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers*
BMC Cancer. 8: 3

100. **Wallasch Ch., Weiß F. U., Niederfellner G., Jallal B., Issing W., Ullrich A. (1995)**
*Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling, by heterodimerization with HER3*
EMBO J. 14 (17):4267-4275

101. **Wolff A. C., Hammond M. E., Schwartz J. N., Hagerty K. L., Allred D. C., Cote R. J., Dowsett M., Fitzgibbons P. L., Hanna W. M., Langer A., McShane L. M., Paik S., Pegram M. D., Perez E. A., Press M. F., Rhodes A., Sturgeion C., Taube S. E., Tubbs R., Vance G. H., van der Vijver M., Wheeler T. M., Hayes D. F. (2007)**
*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer.*
Arch Pathol Lab Med. 131 (1): 18-43

102. **Yarden Y. (2001)**
*Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer*
Oncol. 61 (suppl. 2): 1-13

103. **Zhang X., Silva E., Gershenson D., Hung M. C. (1989)**
*Amplification and rearrangement of c-erbB proto-oncogenes in cancer of human female genital tract*
Oncogene. 4 (8): 985-989

104. **Zheng J. P., Robinson W. R., Ehlen T., Yu M. C., Dubeau L. (1991)**
*Distinction of low grade from high grade human ovarian carcinomas on the basis of losses of heterozygosity on chromosomes 3, 6, and 11 and HER-2/neu gene amplification*
Canc Res. 51 (15): 4045-4051

## 7 Danksagung

Danksagung

An dieser Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. T. Kirchner für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Institutsleitung durchzuführen.

Bei Frau PD Dr. med. D. Mayr bedanke ich mich für die zuverlässige Planung und Betreuung dieser Doktorarbeit, für ihre Anregungen und ihre aufmunternde Unterstützung sowie ihre permanente Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen.

Ich danke Frau Dr. med. V. Kanitz für ihre stetige Hilfsbereitschaft und guten Ratschläge.

Ich danke Frau cand. med. Christine Völklein für die erfolgreiche Zusammenarbeit sowie ihre Unterstützung und Freundschaft.

Ein herzliches Dankeschön geht an Beate Luthardt, Andrea Sendelhofert und Anja Heier für die Unterstützung im praktischen Teil der Arbeit.

Mein Dank gilt schließlich meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums sowie die Begleitung und Hilfe vom Beginn bis zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

| | |
|---|---|
| Name: | Judith Boda |
| Geburtsdatum: | 07. Juni 1982 |
| Geburtsort: | Regensburg |
| Familienstand: | ledig |

### Schulausbildung

| | |
|---|---|
| 1988-1992 | Grund- und Teilhauptschule Oberding |
| 1992-1993 | Camerloher Gymnasium Freising |
| 1993-2002 | Anne Frank Gymnasium Erding |
| | |
| Schulabschluss | Allgemeine Hochschulreife |

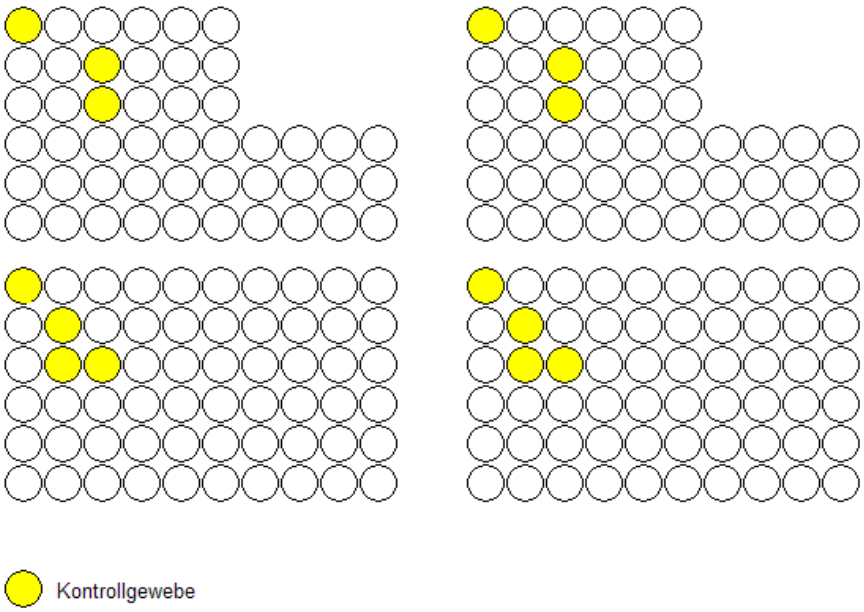
### Hochschulausbildung

| | |
|---|---|
| Oktober 2002 | Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 25.09.2003 | Naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung |
| 08.04.2005 | Zahnärztliche Vorprüfung |
| 29.01.2008 | Zahnärztliche Prüfung |

## 9 Anhang

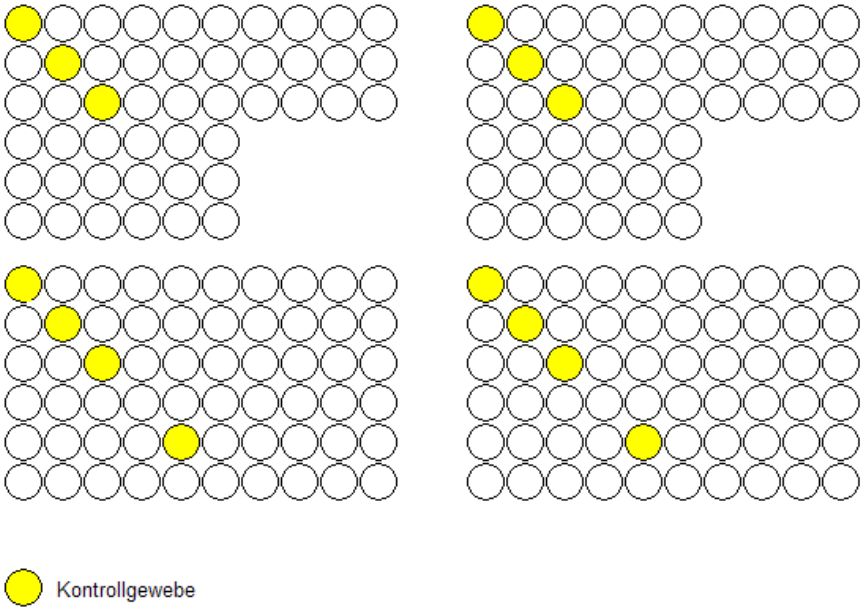
*Anhang 1*

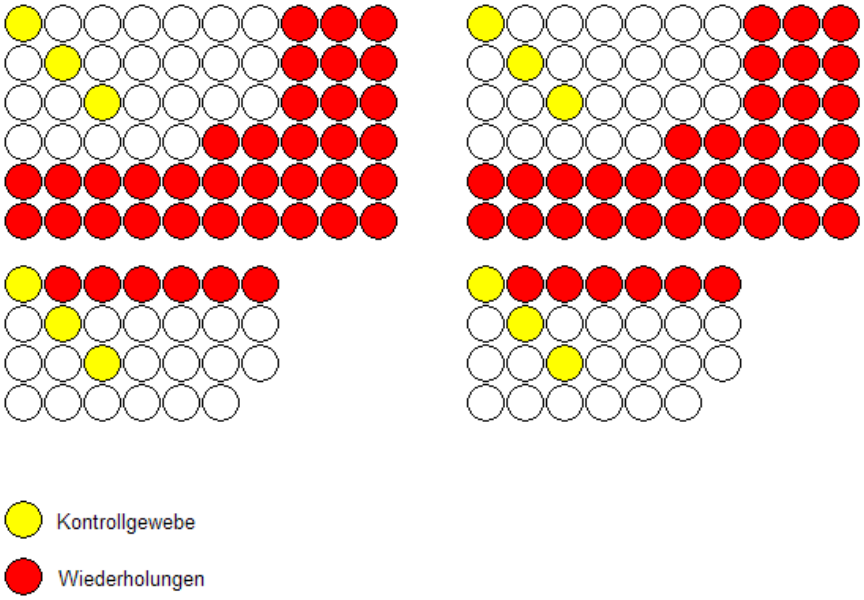
Lageplan Block 1



*Anhang 2*

Lageplan Block 2



*Anhang 3*

Lageplan Block 3