

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner)

**Genexpressionsanalyse von HOX-Genen
und Genen der Tumor-Stroma Interaktion in
humanen, serösen Ovarialkarzinomen**

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

vorgelegt von
Christian Pfeifer
aus Rosenheim

2008

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Diebold

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Janni
Priv. Doz. Dr. R. Kammerer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2008

Gliederung:

1. Einleitung.....	7-23
1.1.Epidemiologie der Ovarialkarzinome und Risikofaktoren.....	7
1.2.Klassifikation der Ovarialkarzinome.....	10
1.2.1. Einteilung der Ovarialtumoren nach der Histogenese	10
1.2.2. Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome nach FIGO-Kriterien und der TNM-Klassifikation.....	11
1.2.3. Grading von Ovarialkarzinomen.....	13
1.3.Diagnostik und Therapie der Ovarialkarzinome.....	13
1.3.1. Diagnostik von Ovarialkarzinomen.....	13
1.3.2. Therapie von Ovarialkarzinomen.....	15
1.4.Hox-Gene.....	16
1.4.1. Physiologische Bedeutung der Hox-Gene.....	17
1.4.2. Hox-Gene in malignem Gewebe.....	18
1.5.Gene der Tumor-Stroma-Interaktion.....	20
1.6.Ziele der vorgelegten Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	23-58
2.1.Material.....	24
2.1.1. Probenmaterial.....	24
2.1.2. Untersuchte Gene.....	28
2.2.Methode: Genaktivitätsbestimmung mittels spezifisch hergestelltem cDNA-Microarray.....	32
2.2.1. Bereitstellung der Target-DNA über Klonierungsverfahren....	32
2.2.2. Beschichtung der Objektträger.....	33
2.2.3. Drucken der Microarray-Slides.....	34
2.2.4. Nachbearbeitung der Microarray-Slides.....	36
2.2.4.1. UV-Crosslinking.....	37

2.2.4.2. Rehydratation.....	37
2.2.4.3. Blocking der Microarrays.....	37
2.2.5. RNA-Konservierung.....	38
2.2.6. RNA-Extraktion.....	39
2.2.7. Labelling der RNA.....	40
2.2.8. Komparative Hybridisierung der Microarray-Slides.....	41
2.2.9. Waschen der Microarray-Slides.....	43
2.2.10. Auswertung der Microarrays.....	44
2.3. Validierung der Ergebnisse.....	49
2.3.1. qRT-PCR.....	49
2.3.1.1. Generierung der Standardreihe.....	50
2.3.1.2. Transskription der RNA in cDNA.....	50
2.3.1.3. Quantitative Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR.....	51
2.3.2. Immunhistologie.....	54
3. Ergebnisse.....	59-85
3.1. Expression der untersuchten Hox-Gene.....	60
3.1.1. Hox-Gen-Expression in der Microarray-Analyse.....	61
3.1.2. Expression der untersuchten Hox-Gene in der qRT-PCR.....	67
3.2. Expressionsanalyse von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion.....	68
3.2.1. Expression der untersuchten Gene der Tumor-Stroma-Interaktion in der Microarrayanalyse.....	69
3.2.2. Expressionsanalyse der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion in der qRT-PCR.....	77
3.2.3. Ergebnis der Immunhistologie von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion.....	78
3.3. Vergleich der Ergebnisse der Microarrayuntersuchung mit den Ergebnissen der Validierungsmethoden.....	81

3.3.1. Vergleich der Untersuchungsergebnisse der Hox-Gen-Expression zwischen Microarray-Analyse und qRT-PCR.....	82
3.3.2. Vergleich der Untersuchungsergebnisse der Expression von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion zwischen Microarrayuntersuchung, qRT-PCR und Immunhistologie.....	82
3.4.Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	83
4. Diskussion.....	86-107
4.1.Die Genexpressionsanalyse von Ovarialkarzinomen.....	86
4.1.1. Kritische Betrachtung der Genexpressionsanalyse der Hox-Gene.....	86
4.1.1.1. Unterexpression von Hox B 5 in serösen Ovarialkarzinomen.....	87
4.1.1.2. Überexpression von Hox A 4 in serösen Ovarialkarzinomen.....	88
4.1.1.3. Kritische Evaluation weiterer Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Hox-Gene.....	90
4.1.2. Kritische Betrachtung der Genexpressionsanalyse der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion.....	92
4.1.2.1. Überexpression von CD 24 in serösen Ovarialkarzinomen.....	92
4.1.2.2. Überexpression von VEGF in serösen Ovarialkarzinomen.....	93
4.1.2.3. Überexpression von IL 18 in serösen Ovarialkarzinomen	94
4.1.2.4. Expressionen weiterer Gene der Tumor-Stroma-Interaktion in serösen Ovarialkarzinomen.....	95
4.2.Diskussion der Methodik.....	96
4.2.1. Diskussion der Auswahl des Untersuchungsmaterials.....	97

4.2.1.1. Gewebeproben der Tumorgruppe und der Vergleichsgruppe.....	97
4.2.1.2. Kommerzielle RNA als Kontrolle für die Hybridisierung.....	99
4.2.2. Kritische Erwägungen zur Bearbeitung der Proben m-RNA bis hin zur Proben-cDNA.....	100
4.2.3. Herstellung der Microarrays unter Berücksichtigung der Validität der target-cDNA.....	101
4.2.4. Design des Microarrays.....	103
4.2.5. Auswertung der Microarrayanalyse.....	104
4.2.6. Kritische Betrachtung der Validierungsuntersuchungen und deren Vergleichbarkeit mit der Microarrayanalyse.....	105
4.2.6.1. Die Validierung mittels qRT-PCR.....	105
4.2.6.2. Die Validierung mittels Immunhistologie.....	106
4.3.Betrachtung des Designs der vorliegenden Untersuchung.....	106
5. Zusammenfassung.....	108-110
6. Literaturverzeichnis.....	111-124
6.1.Zeitschriften, Buchbeiträge.....	111
6.2.Internet.....	124
Anhang:	
7. Reagenzien und Geräte.....	125-134
7.1.Verwendete Reagenzien.....	125
7.2.Verwendete Geräte.....	129
7.3.Firmenanschriften.....	129
8. Danksagung.....	135

9. Curriculum vitae.....136-137

1. Einleitung

Die rechtzeitige und differenzierte Diagnose von Krebserkrankungen und ihre adäquate Therapie stellen eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin dar. Das Ovarialkarzinom ist die fünfhäufigste Todesursache unter den krebsbedingten Todesfällen der weiblichen Bevölkerung, wofür unter anderem das meist fortgeschrittene Erkrankungsstadium bei Diagnosestellung verantwortlich ist.

Die Analyse der Expression verschiedener Gene und Genfamilien in malignen Tumoren verspricht zum einen Einblicke in die Ätiologie und Pathogenese der Karzinome und zum anderen Erkenntnisse, die zu einer früheren und individuelleren Diagnose beitragen können. Schlussendlich besteht die Hoffnung, dass sich hieraus Optionen für eine gezieltere Therapie der Karzinome ableiten lassen.

1.1 Epidemiologie der Ovarialkarzinome und Risikofaktoren

Rund 200000 Patientinnen erkranken weltweit jährlich neu an Ovarialkarzinomen. Bei 12-17 Neuerkrankungen pro 100000 Frauen in der weißen Bevölkerung Nordeuropas, den USA und Israels und einer Inzidenz von 8,4 Neuerkrankungen/Jahr pro 100000 Frauen in der schwarzen Bevölkerung (Tab.1), liegt der Altersgipfel für das Auftreten von sporadischen Ovarialkarzinomen zwischen 60 und 70 Jahren (Abb.1). In etwa 10% der Fälle sind die erkrankten Frauen jünger als 40 Jahre (Stauber et al., 2005). Wegen der vergleichsweise späten Diagnosestellung auf Grund gar keiner bzw. unspezifischer Symptome, liegt die 5 Jahres-Überlebensrate bei 41% (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (www.gekid.de); 2006).

In Deutschland steht das Ovarialkarzinom mit etwa 7300 Neuerkrankungen an siebter Stelle der Inzidenzen maligner Tumorerkrankungen der Frau und mit 6006 Sterbefällen im Jahre 1999 an fünfter Stelle der tumorbedingten Todesfälle, was einem Anteil von 4,2% entspricht (Robert-Koch-Institut; www.rki.de). Somit stellt das Ovarialkarzinom die häufigste Todesursache aller Tumorerkrankungen des weiblichen Genitaltraktes dar.

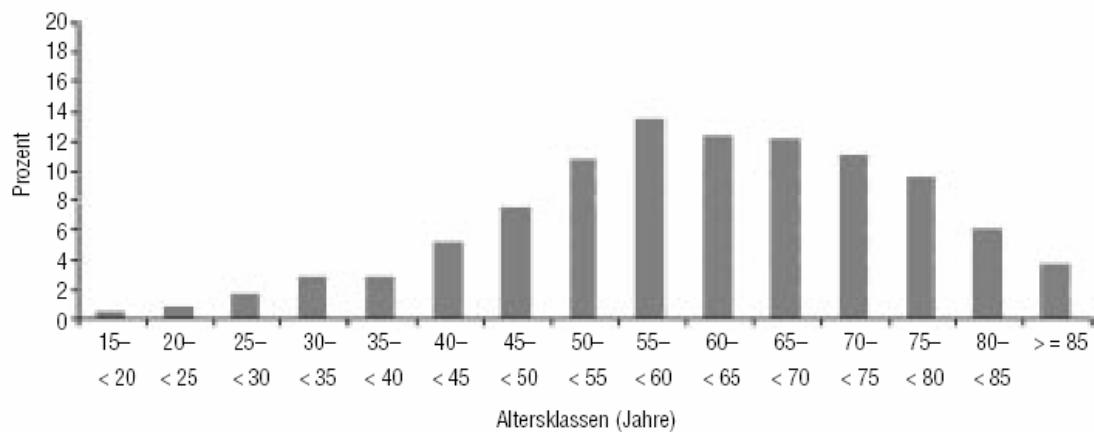


Abb. 1-1: Altersverteilung bei Diagnosestellung der Ovarialkarzinome in der Region München (1988-2002; n=2308) (aus: Schmalfeldt et al., Tumorzentrum München, 2004)

Land / Kontinent	Inzidenz (absolut)	Inzidenz (ASR ^{a,b})	Mortalität (absolut)	Mortalität (ASR ^{a,b})
Welt	192 379	6,50	114 240	3,82
„more developed countries“	91 307	9,88	59 113	5,54
„less developed countries“	101 060	4,91	55 121	2,76
Zentralafrika	937	2,86	507	1,63
Ostafrika	6 336	9,04	3 708	5,57
Südafrika	686	3,88	412	2,40
Westafrika	2 324	3,08	1 283	1,81
Zentralamerika	3 526	6,95	2 363	4,80
Südamerika	11 603	7,31	5 783	3,77
Nordamerika	23 803	10,72	15 613	6,20
Süd-/Zentralasien	30 395	5,21	17 555	3,10
Südeuropa	10 190	8,68	6 190	4,54
Osteuropa	23 595	10,34	12 901	5,00
Nordeuropa	9 949	12,58	7 214	8,19
Westeuropa	17 182	11,06	12 840	6,87
Deutschland	8 994	12,15	6 462	7,37
Australien / Neuseeland	1 522	9,64	972	5,54

^a ASR steht für »Age Standardised Rate« ^b Weltstandard

Tab. 1-1: Weltweite Inzidenz und Mortalität der Ovarialkarzinome (aus: Schmalfeldt et al., Tumorzentrum München, 2004)

Sporadische Ovarialkarzinome stellen dabei 90% der Fälle dar. 5 - 10% der Ovarialkarzinome sind hereditär bedingt und beruhen unter anderem auf Mutationen im BRCA-1/-2 Gen. Sie zeichnen sich durch familiäre Häufung und frühes Manifestationsalter aus.

Bei der sporadischen Entstehung von Ovarialkarzinomen sind verschiedene Risiko- und Protektionsfaktoren mehrfach in Studien belegt worden (Bray et al., 2005; Stauber et al., 2005 u.v.m.). An erster Stelle der Risikofaktoren steht die Anzahl der Ovulationen im Laufe des Lebens. Aber auch hohes Lebensalter, Ernährungs- und Umweltfaktoren (u.a. Nikotinkonsum (Purdie et al., 2003), Asbest, aszendierende Infektionen), Infertilität, Kinderlosigkeit, medikamentöse Ovulationsauslösung und dauerhafte ovulatorische Zyklen sind mit einer erhöhten Inzidenz von Ovarialkarzinomen verbunden. Insbesondere ist mit einem gehäuften Auftreten von Ovarialkarzinomen bei positiver Familien- und/oder Eigenanamnese für Mamma- und/oder Ovarialkarzinome oder im Falle eines hereditären Neoplasiesyndroms zu rechnen.

Es existieren aber auch protektive Faktoren wie eine große Anzahl von Schwangerschaften und die Einnahme von Ovulationshemmern (Bray et al., 2005).

Die sogenannte „Ovulationshypothese“ postuliert einen Zusammenhang zwischen den oben genannten Risikofaktoren und Protektionsfaktoren und der Entstehung von Ovarialkarzinomen, der darin liegt, dass mit jeder Zerreißung des ovariellen Deckepithels und der damit verbundenen Reparatur und Proliferation des ovariellen Deckepithels bei gleichzeitig erhöhtem Gonadotropinspiegel das Risiko der malignen Entartung geringfügig zunimmt. Hierbei ist anzumerken, dass 60 bis 90% (Schmalfeldt et al., 2004) der malignen Ovarialtumoren sich vom Oberflächenepithel ableiten.

1.2 Klassifikation der Ovarialkarzinome

Ovarialkarzinome lassen sich nach verschiedenen Kriterien einteilen. Die wichtigsten Klassifikationssysteme sind im folgenden Abschnitt aufgeführt.

1.2.1 Einteilung der Ovarialtumoren nach der Histogenese

Es lassen sich epitheliale Tumoren (ca. 60% aller Ovarialtumoren) von Keimzelltumoren (ca. 20% aller Ovarialtumoren), Fibromen (ca. 5% aller Ovarialtumoren), metastasierten Tumoren (ca. 15% aller Ovarialtumoren) und Keimstrang-/Keimdrüsentumoren (ca. 8% aller Ovarialtumoren) unterscheiden (Stauber et al., 2005).

Die epithelialen Tumoren bzw. Oberflächen-Strumatumoren lassen sich in sieben Hauptgruppen – seröse, muzinöse, endometrioide, klarzellige, transitionalzellige, Plattenepithel- und undifferenzierte Karzinome – einteilen.

Sie leiten sich vom Oberflächenepithel des Ovars, auch Keim- oder Zölomepithel genannt, ab und sind histomorphologisch großteils zu den Grundtypen des Müllerschen Gangepithels homolog. Von weiterer Bedeutung für die Einteilung sind der Aufbau der neoplastischen Zellverbände (oberflächlich, papillär oder zystisch), die Lokalisation und der Anteil an fibrösem Stroma. Am häufigsten treten seröse und muzinöse Ovarialkarzinome auf.

Die Subtypisierung dieser wird folgendermaßen vorgenommen:

1. seröse Tumoren:

- Borderline-Tumoren (=low malignant potential (LMP) Tumoren):
 - zystischer Tumor und papillär-zystischer Tumor
 - oberflächlich-papillärer Tumor
 - Adenofibrom und Zystadenofibrom
- Maligne Tumoren:
 - Adenokarzinom; papilläres Adeno- und Zystadenokarzinom
 - oberflächlich-papilläres Adenokarzinom
 - Adenokarzinofibrom und Zystadenokarzinofibrom

2. muzinöse Tumoren:

- Borderline-Tumoren (=LMP-Tumoren):
 - zystischer Tumor
 - Adenofibrom und Zystadenofibrom
- Maligne Tumoren:
 - Adenokarzinom und Zystadenokarzinom
 - Adenokarzinofibrom und Zystadenokarzinofibrom

(nach Schmalfeldt et al., 2004)

Die in dieser Arbeit untersuchten Entitäten werden unter Punkt „2.1 Material“ aufgeführt.

1.2.2 Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome nach FIGO-Kriterien und TNM-Klassifikation

Um stadiengerechte Therapieentscheidungen und Prognoseabschätzungen treffen zu können wurden 1988 von der Fédération Internationale de Gynécologie et d’Obstétrique (FIGO) die Ovarialkarzinome entsprechend ihrer Größe, ihrer Organüberschreitung und ihrer Metastasierung in Stadien eingeteilt (Tab.2). Zum direkten Vergleich ist die entsprechende TNM-Klassifikation mitaufgeführt.

FIGO-Stadium	TNM-Klassifikation	Beschreibung
I	T1	Karzinom auf die Ovarien begrenzt: nur ein Ovar befallen; kein Ascites; kein oberflächlicher Tumor; Kapsel intakt
	IA	beide Ovarien befallen; kein Ascites kein oberflächlicher Tumor; Kapsel intakt
	IB	wie IA/IB; zus. Kapselruptur, maligne Zellen in Ascites oder Peritonealspülung oder oberflächlicher Tumor
II	T2	Karzinom mit Ausdehnung im kleinen Becken: Ausdehnung/Metastasen auf Uterus oder Tuben
	IIA	Ausdehnung auf anderes Gewebe im kleinen Becken wie IIA/IIB; zus. maligne Zellen in Ascites oder Peritonealspülung
	IIB	Karzinom mit intraperitonealer Metastasierung ausserhalb des kleinen Beckens und/oder positiven retroperitonealen/inguinalen Lymphknoten, Leberkapselmetastasen:
III	T3 und/oder N1	Tumor makroskopisch auf das kleine Becken begrenzt; histologisch gesicherte Metastasierung in viszeralem oder parietalem Peritoneum
	IIIA	Karzinom mit histologisch gesicherten intra- abdominellen Metastasen (<2cm)
	IIIB	abdominelle Metastase >2cm und/oder
IV	IIIC und/oder N1	positive retroperitoneale/inguinale Lymphknoten Karzinom mit Fernmetastasen;
	M1	Leberparenchymmetastasen

Tab. 1-2: Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome nach FIGO und Klassifizierung nach TNM (nach Mayr et al., 2000)

1.2.3. Grading von Ovarialkarzinomen

Das Grading der Ovarialkarzinome kann z.B. nach dem Gratingsystem von Silverberg durchgeführt werden.

Punktwert	1	2	3
Architektur	Glandulär	Papillär	Solide
Kernpleomorphie	Relativ uniforme, vesikuläre Kerne; Kerngrößenvariationen zwischen 2:1 und 4:1; $\leq 2:1$; keine prominenten Nukleolen	Kerngrößenvariationen kleine Nukleolen; keine bizarre Kerne	Kerngrößenvariationen 4:1; große eosinophile Nukleolen, evtl. bizarre Kerne
Mitosezahl			
-Sehfeld 20	0-7	8-18	≥ 19
-Sehfeld 26	0-9	10-24	≥ 25

Tab. 1-3: Gratingsystem nach Silverberg (aus Schmalfeldt et al., 2004)

1.3 Diagnostik und Therapie von Ovarialkarzinomen

Die Diagnostik und Therapie von Ovarialkarzinomen stellt ein weites klinisches Feld dar. Im Folgenden soll ein kurzer oberflächlicher Überblick über die wichtigsten diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen gegeben werden.

1.3.1 Diagnostik von Ovarialkarzinomen

Da Ovarialkarzinome besonders in den Frühstadien sehr symptomarm verlaufen, erfolgt die Diagnosestellung in über 70% der Fälle (Le Page et al., 2006) erst in fortgeschrittenen Stadien (FIGO III und FIGO IV). Dies ist der wichtigste Grund für die schlechte Prognose des Ovarialkarzinoms. Effektive Screeningverfahren mit ausreichend hoher Spezifität und Signifikanz stehen zurzeit im klinischen Alltag routinemäßig nicht zur Verfügung.

Als mögliche Screeningmethoden kommen Tumormarker und die Transvaginalsonographie in Betracht. Bei den Tumormarkern wird klinisch besonders das CA 125 verwendet, aber auch das CA 19-9 und das CA 72-4. In Verbindung mit der Transvaginalsonographie und der klinischen Untersuchung ist das CA 125 zur Diagnose eines Ovarialkarzinoms gut geeignet (bei positiven Befunden: >80% Malignitätsrisiko)(Bell et al., 1998).

Ergänzend zu diesen beiden Verfahren kann eine farbkodierte und gepulste Dopplersonographie eingesetzt werden (Schelling et al., 2004).

In Studien werden derzeit neuere Tumormarker wie hK5 (humanes Kallikrein 5) und HE 4 (humanes Epididymis Gen 4) auf ihre diagnostische Spezifität und Sensitivität überprüft.

Bei Verdacht auf ein Ovarialkarzinom ist eine gründliche Anamnese und eine ausführliche gynäkologische Untersuchung die Basis. Ergänzend hierzu wird CA 125 (in bestimmten Fällen auch CA 19-9 und CA 72-4) als Tumormarker und Verlaufsparameter bestimmt und eine Abdominalsonographie zur Beurteilung des Abdomens hinsichtlich Aszites, Lebermetastasen, Beurteilung des ableitenden Harnsystems, etc. durchgeführt. Entsprechend dem klinischen Befund und der Anamnese werden weiterführende Untersuchungen durchgeführt:

- Rekto-, Colo-, Zysto- und Gastroskopie bei Verdacht auf Befall des entsprechenden Organsystems
- Ausscheidungsurogramm bei pathologischem Sonographiebefund
- Gendiagnostik bei entsprechender Familien- und/oder Eigenanamnese hinsichtlich BRCA1-/BRCA2-Mutationen
- CT bzw. MRT bei besonderen Fragestellungen
- Zytologische Untersuchung des Pleurapunktates bei vorhandenem Pleuraerguss

Kontrovers diskutiert wird der Einsatz der diagnostischen Laparoskopie. Hierbei besteht die Gefahr, dass Tumorzellen verschleppt werden und es somit zu einer iatrogenen Aussaat des Ovarialkarzinoms kommt (Canis et al., 2001).

1.3.2 Therapie von Ovarialkarzinomen

Die primäre Therapie von Ovarialkarzinomen besteht in der operativen Entfernung des Tumors. Je nach Ausdehnung des Tumorbefalls abdomineller Organe wird (eventuell auch in interdisziplinärem Ansatz) versucht, den Tumor möglichst komplett zu entfernen („Debulking“). Die Größe des postoperativ verbliebenen Tumorrestes ist – neben der Einteilung nach FIGO und dem Alter – der bedeutendste Prognosefaktor für das mediane und absolute Überleben (Tingulstad et al., 2003; Bristow et al., 2002).

In der Chemotherapie des Ovarialkarzinoms sind grundsätzlich die adjuvante, die neoadjuvante, die kurative und die palliative Chemotherapie zu unterscheiden. Derzeit gilt nach den Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft und der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe für die FIGO-Stadien II-IV eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel als Standardchemotherapie. Patientinnen mit Ovarialkarzinomen im Stadium FIGO I und gute histologischer Differenzierung (Grad I) profitieren nicht gesichert von einer zusätzlich zur Operation durchgeführten Chemotherapie. Für die Chemotherapie bei Progression oder Rezidiv stehen neben platinhaltigen Therapien für platin sensible Tumore auch Monotherapien mit Etoposid; Paclitaxel, Topotecan etc. für platinresistente Tumoren zur Verfügung (Dritt- und Viertlinientherapien). Ob eine intraperitoneale Gabe der Chemotherapie Vorteile gegenüber der intravenösen Gabe hat, wird derzeit in Studien überprüft. Eine endokrine Therapie betrachtet man für Patientinnen, die eine Chemotherapie ablehnen oder denen eine Chemotherapie auf Grund der hohen Toxizität nicht mehr zumutbar ist, als weitere Möglichkeit. Die hier eingesetzten

Stoffklassen sind Gestagene, GnRH Analoga, Androgene und Antiandrogene sowie Tamoxifen.

Nach den Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft und der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe ist die ganzabdominelle Strahlentherapie auf Grund ihrer geringeren Wirksamkeit und gravierenderen Nebenwirkungen im Vergleich zur Chemotherapie bei Ovarialkarzinomen nicht mehr indiziert.

Neue Therapieansätze, darunter die Gentherapie und die Immuntherapie, sind derzeit noch Gegenstand der Forschung. Es liegen hierzu noch keine größeren Studienergebnisse vor.

1.4 Hox-Gene

Bei den Hox-Genen handelt es sich um eine Subklasse von Homeoboxgenen. Bislang sind über 170 Homeoboxsequenzen identifiziert worden (Stein et al, 1996), darunter PAX (paired), EMX (empty spiracles), OTX (orthodenticle) oder MSX (muscle segment). Mit der Entdeckung weiterer Homeoboxsequenzen und -subklassen wird gerechnet. Die Nomenklatur richtet sich hierbei nach den homologen Genclustern der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, in deren Genom als erstes Homeoboxsequenzen identifiziert werden konnten (Gehring et al., 1986).

Die Homeobox der 39 Hox-Gene besteht aus 183 Basenpaaren, die eine 61 Aminosäuren lange Proteinsequenz innerhalb jedes Homeoproteins kodiert. Diese so genannte Homeodomain stellt auf Ebene der Tertiärstruktur ein Helix-Turn-Helix-Motiv dar, welches für die sequenzspezifische Bindung an anderen Stellen der DNA und somit für die Funktion als Transkriptionsfaktor essentiell ist.

Das Hox-Gen-Cluster ist über lange Strecken der Evolution auf Grund seiner Bedeutung für die phylogenetische Entwicklung konserviert geblieben.

Unterschiede zwischen einzelnen Spezies werden auf Duplikationen zurückgeführt. So ist das HOM-C-Cluster (Homeotic Complex) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* in ähnlicher Anordnung als Hox-Gen-Cluster im menschlichen Genom zu finden. Hier sind die 39 menschlichen Hox-Gene in wiederum vier Clustern (A-D) angeordnet. Die Position des einzelnen Hox-Genes innerhalb des Chromosoms entscheidet wesentlich über seine örtliche und zeitliche Expression (Krumlauf et al., 1994). So werden Hox-Gene, die nahe dem 3'-Ende des DNA-Doppelstranges liegen, früher und in ventraleren Regionen exprimiert als Hox-Gene, die näher am 5'-Ende des DNA-Doppelstranges liegen.

Auf Grund ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren sowohl in der Phylogenetese wie auch in differenziertem adulten Gewebe z.B. im weiblichen Reproduktionstrakt, wurde schon früh die Hypothese aufgestellt, dass Hox-Gene eine Rolle in der Entstehung von Neoplasien spielen könnten (Cillo et al., 1992).

1.4.1 Physiologische Bedeutung der Hox-Gene

Da die physiologische Expression und Funktion der Hox-Gene vor allem während der Embryogenese stattfindet, sind wesentliche Charakteristika dieser Gengruppe z.B. durch Knock-out-Versuche in Modelorganismen wie *Drosophila* oder Mäusen aufgeklärt worden.

Mutationen oder das Fehlen einzelner Hox-Gene führen zu einer veränderten Ausbildung oder einem kompletten Fehlen des entsprechenden Körpersegmentes in *Drosophila* (Gehring et al., 1986). In Mäusen konnte ähnliches beobachtet werden, wobei die Defekte hier wesentlich subtiler ausfielen. Weibliche Mäuse, deren Hox A10 - bzw. Hox A11 – Gene gezielt ausgeschaltet worden waren, zeigten erst im Erwachsenenalter Infertilität, da die Einnistung des Embryos im Uterus gestört war (Satokata et al., 1995; Hsieh-Li et al., 1995). Für zahlreiche weitere Hox-Gene wurden entsprechende Knock-out-

Versuche am Modelorganismus Maus durchgeführt (Krumlauf et al., 1994, u.a.), in denen unter anderem auch gewebe- und stadienspezifische Methylierungen z.B. von Hox A5 und Hox B5 (Hershko et al., 2003) festgestellt werden konnten.

Die Rolle der Hox-Gene in der menschlichen Phylogenese ist bislang weniger eindeutig charakterisiert, da unklar ist, inwieweit die Erkenntnisse aus den Tiermodellen übertragen werden können. Auf Grund der genetischen Analyse von Patientinnen, die an erblichen, das Müller'sche Gangsystem betreffenden Syndromen leiden, konnte gezeigt werden, dass Deletionen eines oder mehrerer Hox-Gene vorlagen. Für Patientinnen mit Hand-foot-genital- (HFG-) Syndrom, die neben verkürzten Daumen und Großzehen einen zweigeteilten Uterus besitzen, konnte dargelegt werden, dass eine 50 Basenpaare lange Deletion im ersten Exon des Hox A13-Genes vorlag (Goodman et al., 2000).

Weiterhin zeigen Hox-Gene auch im Erwachsenenalter noch organspezifische Expressionsmuster. Im Vergleich zur Embryonalphase sind Hox-Gene im adulten (Maus-) Organismus jedoch auf wesentlich niedrigerem Niveau exprimiert.

Des Weiteren sind Hox-Gene in jeweils spezifischer Konstellation an der Hämatopoese beteiligt, in der Lunge exprimiert und wiederum entlang des Müller'schen Gangsystems an der Aufrechterhaltung der Funktion beteiligt. In letzterem werden Hox-Gene dafür mitverantwortlich gemacht, die physiologische Plastizität des weiblichen Reproduktionstraktes während den Zyklusphasen aufrecht zu erhalten sowie die Einnistung der Embryonen in den Uterus zu beeinflussen (Taylor, 2000).

1.4.2 Hox-Gene in malignem Gewebe

Auf Grund der Funktion der Hox-Gene als Transkriptionsfaktoren wurde in der Vergangenheit wiederholt der Frage nachgegangen, ob diese Gene an der

Entstehung oder Progression von Tumoren beteiligt sind. Als erstes konnte bei hämatopoetischen Neoplasien, insbesondere der akuten myeloischen Leukämie, eine vermehrte Expression bestimmter Hox-Gene detektiert werden (Kamps et al., 1990; Hatano et al., 1991). Aber auch für solide Tumoren wurde erstmals 1992 in Nierenzellkarzinomen eine Über- bzw. Unterexpression verschiedener Hox-Gene im Vergleich zu nicht neoplastischem Nierenparenchym beschrieben (Cillo et al. 1992).

Bezüglich der Expressionsmuster von Hox-Genen in Neoplasien existieren derzeit folgende Vorstellungen:

1. Hox-Gene, die während der Embryonalphase stark exprimiert sind und im adulten ausdifferenzierten Gewebe nicht exprimiert sind, werden in neoplastischem Gewebe reexprimiert und wirken als Transkriptionsfaktoren auf die jeweiligen Downstream-Gene.
2. Hox-Gene, die in der Embryonalphase nicht exprimiert werden, jedoch in ausdifferenzierten Geweben wie z.B. im weiblichen Reproduktionstrakt (s.o.) nachweisbar sind, werden in neoplastischem Gewebe herabgeregelt und könnten somit wie Tumorsuppressor-Gene zur malignen Transformation beitragen.

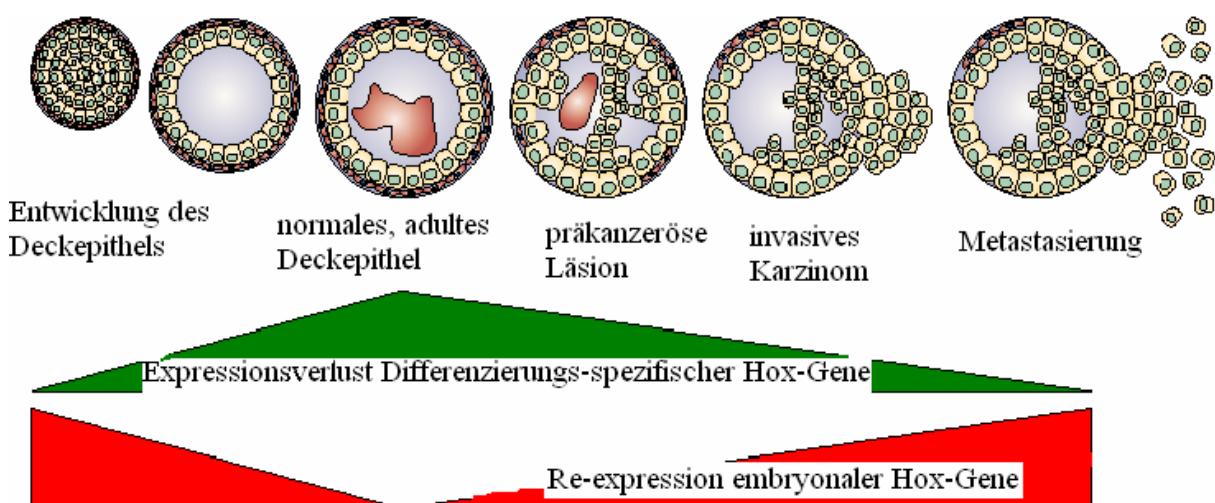


Abb. 1-2: Expressionsverhalten von Hox-Genen in normalem und neoplastischem Gewebe (nach Abate-Shen et al., 2002)

Sowohl für eine Überexpression als auch für eine Unterexpression ist somit ein wesentlicher Einfluss auf Mechanismen wie die Regulation des Zellzyklus, Apoptose und Zelldifferenzierung möglich.

1.5 Gene der Tumor-Stroma-Interaktion

In zahlreichen Studien wurde die Expression verschiedenster Gene der Tumor-Stroma-Interaktion bei Ovarialkarzinomen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bestimmte Gene bei diesen Tumoren besonders stark exprimiert werden.

Beispielhaft sei auf die Bedeutung von CD 24, VEGF und IL 18 beim serösen Ovarialkarzinom eingegangen.

Das Gen für CD 24 (cluster of differentiation) ist auf dem Chromosom 6q21 lokalisiert. CD 24 ist ein Zelloberflächenprotein, das über eine Glycosylphosphatidylinositol Bindung an die Zellmembran gebunden ist (Kay et al., 1991). Dabei fungiert es als Kofaktor der T-Zellproliferation und nimmt Einfluss auf die B-Zellmaturation. Das vor allem in Granulozyten und differenzierenden B-Lymphozyten exprimierte CD 24 wurde in zahlreichen Neoplasien, so auch in Ovarialkarzinomen (Kristiansen et al., 2002), als überexprimiert beschrieben. Hierbei ist von Interesse, dass CD 24 in Arbeiten von Sammar et al.(1994) und Aigner et al. (1997) als ein Ligand von P-Selectin, welches ein Adhäsionsmolekül aktiverter Endothelien und Thrombozyten ist, identifiziert wurde und somit eine Rolle in der Metastasierungskapazität insbesondere von Ovarialkarzinomen spielen könnte.

Das Gen für VEGF (vascular endothelial growth factor) ist auf dem Chromosom 6p12-p21 lokalisiert. VEGF-A, welches das eigentliche VEGF ist (VEGF-B, VEGF-C, etc. bezeichnet VEGF-verwandte Faktoren), existiert als Protein in neun verschiedenen Splicing-Varianten (121, 145, 148, 162, 165 a, 165b, 183, 189 und 206 Aminosäuren), welche verschiedene biologische Eigenschaften z.B. auf Grund unterschiedlicher Affinitäten zu Rezeptoren aufweisen. VEGF

wirkt im Besonderen als Mitogen auf Endothelzellen (Senger et al., 1995), ist ein Induktor der Angiogenese und erhöht die Gefäßpermeabilität (Connolly, 1991). Es regt die Bildung verschiedener Enzyme (z.B. Kollagenasen) an und fördert die Produktion verschiedener Faktoren der Hämostase (z.B. v.Willebrand-Faktor). VEGF wurde in zahlreichen soliden Tumoren als überexprimiert beschrieben. Dabei könnte die durch VEGF hervorgerufene Permeabilitätserhöhung der Gefäße wesentlich zur Extravasion von Tumorzellen und somit zur Metastasenbildung beitragen. Die Neoangiogenese ist essentiell für eine ausreichende Blutversorgung der Tumorzellen. Hieraus ergaben sich bereits erste therapeutische Ansätze (Borgstrom et al., 1996)

Das Gen für IL-18 (Interleukin 18) liegt auf Chromosom 11q22.2-q22.3. IL-18 wird zur Gruppe der Zytokine gerechnet und wird hauptsächlich von Makrophagen aber auch von Epithelen, darunter auch dem ovariellen Deckepithel, produziert. Es induziert die Interferon γ -Produktion von T-Lymphozyten (Okamura et al., 1995), aktivierte B-Lymphozyten (Yoshimoto et al., 1997) und natürlichen Killerzellen (Tsutsui et al., 1996). Des Weiteren stimuliert es die Produktion von GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor), IL-8 und weiteren proinflammatorischen Faktoren. Im Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen konnte ein signifikant erhöhter Serumspiegel von IL-18 im Vergleich zu Normalkontrollen festgestellt werden (Akahira et al., 2004). Die Wertigkeit des IL-18-Serumspiegels als prognostischer Marker ist indes noch nicht endgültig geklärt.

1.6 Ziele der vorgelegten Arbeit

Zum Themenkomplex Genexpressionsanalysen von Ovarialkarzinomen liegen bereits einige Untersuchungen vor. Yamashita et al. (2006) beschäftigten sich im Rahmen ihrer Analysen mit der Unterdrückung der Invasivität von Ovarialkarzinomen im Zusammenhang mit Hox-Genexpression. Cheng et al.

(2005) untersuchten die Auswirkung von Hox-Genexpressionen auf die Morphologie von Ovarialkarzinomen an Zelllinien. In keiner Studie wurde jedoch speziell auf die Expression der Hox-Gene in serösen Ovarialkarzinomen *in vivo* fokussiert. Eine detaillierte Analyse der Genexpression dieser Transkriptionsfaktoren stand daher im Mittelpunkt dieser Untersuchung. Hierbei wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Sind einzelne Hox-Gene in serösen Ovarialkarzinomen bzw. in deren Metastasen über- oder unterexprimiert?
- Lassen sich in serösen Ovarialkarzinomen Hox-Cluster (z.B. das Hox A Cluster) oder paraloge Hox-Gruppen (z.B. Hox A2, Hox B2, Hox C2, Hox D2) als über- oder unterexprimiert identifizieren?

Ebenfalls sollten aus anderen Untersuchungen gewonnene Ergebnisse im Rahmen der Untersuchung überprüft und allgemeinere Fragen zur Tumobiologie der Ovarialkarzinome bearbeitet werden:

- Können bereits beschriebene Expressionsmuster von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion bestätigt werden oder können andere Expressionsmuster nachgewiesen werden?
- Lassen die Ergebnisse Rückschlüsse auf die Mechanismen der Entstehung und Progression von serösen Ovarialkarzinomen zu?
- Eignen sich die beobachteten Genexpressionsmuster möglicherweise als hilfreiche Parameter bei der Diagnose und/oder zur Abschätzung der Prognose dieser Tumoren?

Des Weiteren wurde im Rahmen der erstmals im Pathologischen Institut der LMU angewendeten cDNA-Microarray-Analyse zahlreiche Aspekte der Etablierung und Optimierung der Methode beleuchtet. Im Einzelnen stellten sich Fragen bezüglich des genauen Versuchsablaufs und der Versuchsorganisation sowie Fragen zur Eignung der einzelnen Reagenzien.

2. Material und Methoden

Die Untersuchung von Genexpressionen mittels Microarray erlaubt es, in einer einzigen Analyse die Expression von mehreren Tausend Genen gleichzeitig zu untersuchen. Da die Ergebnisse von Microarrayanalysen von zahlreichen Einflussfaktoren abhängen, ist es essentiell die Ergebnisse durch andere Methoden unabhängig zu validieren. Hierzu wurden in der vorliegenden Untersuchung im Anschluss an die Microarrayexperimente für ausgewählte Gene eine qRT-PCR und eine Immunhistologie durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial für die Microarray-Untersuchung und die qRT-PCR wurde intakte RNA benötigt. Für die immunhistologische Untersuchung wurden Gewebeschnitte von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorproben herangezogen.

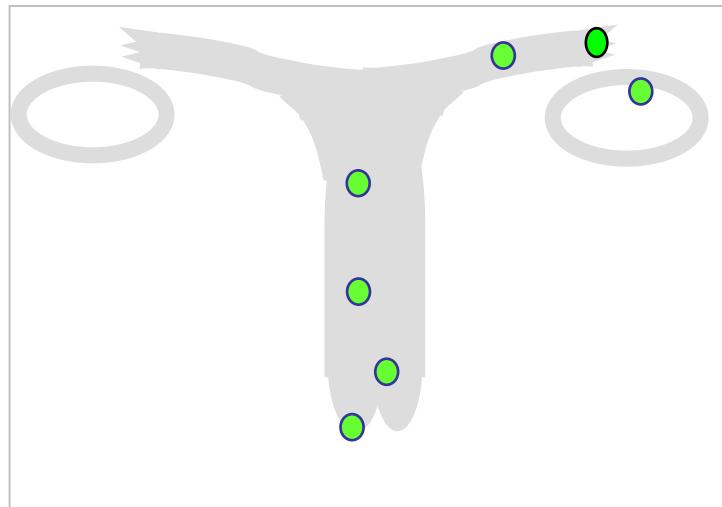
2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

Das untersuchte Gewebe wurde in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Großhadern im Zeitraum zwischen August 2004 und August 2005 im Rahmen von Hysterektomieoperationen parallel zu den histologischen Präparaten asserviert. Das gewonnene Gewebe wurde im Operationssaal in ein RNA-Stabilisierungsreagenz (RNA-Later (Fa. Qiagen); siehe auch 2.2.1) eingebracht. Die Auswahl des Gewebes erfolgte hierbei nach makroskopischen Gesichtspunkten. Da für die Expressionsanalyse lediglich geringe Mengen (100-400mg) Gewebe benötigt wurden, wurde die histopathologische Diagnostik des Operationspräparates nicht beeinträchtigt. Um eine vollständige Durchdringung des Gewebes mit RNA-Later zu erreichen, muss jedes Gewebsstück in mindestens einer Dimension dünner als 0,5cm sein.

Die Gewebeproben der Tumorgruppe wurden aus Metastasen serös-papillärer Ovarialkarzinome entnommen, die Proben der Vergleichsgruppe aus unterschiedlichen, nicht neoplastisch veränderten Abschnitten des Müller'schen Gangsystems (siehe Abbildung).

Abb. 2-1: Entnahmestellen der Gewebeproben des Kontrollkollektivs entlang des Müller'schen Gangsystems (v.u.n.o.: Ektozervix, Endozervix, Endometrium (distal und proximal), Tuba uterina, Fimbrienkranz, Ovar)



Alle Tumorproben entstammten ausschließlich Fällen, die in der abschliessenden histopathologischen Beurteilung als serös-papilläre Ovarialkarzinome klassifiziert wurden.

Bei den Proben der Vergleichsgruppe wurde darauf geachtet möglichst nur Gewebe aus dem Niveau der Schleimhaut des Genitaltrakts für die Gewebeprobe zu entnehmen. Die Gewebeentnahmen für die Vergleichsgruppe wurden im Rahmen von Hysterektomien durchgeführt, deren Anlass in einem Uterus myomatosus oder einem Zervixkarzinom bestand. Bei letzteren Fällen wurden nur karzinomferne Gewebsabschnitte z.B. aus dem Bereich des Fimbrienkranzes und des Ovars entnommen.

Aus den so gewonnenen Proben ergaben sich folgende Kollektive:

Tumorgruppe:

- 18 Tumorproben aus Metastasen serös-papillärer Ovarialkarzinome;
- Zwei FIGO IIIa, eines FIGO IIIb, 13 FIGO IIIc, eines FIGO IV sowie ein Rezidiv.
- Sieben Karzinome wurden als G2 (mäßig differenziert) und elf als G3 (gering differenziert) klassifiziert.
- Das Durchschnittsalter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation betrug 63,3 Jahre (44-75 Jahre).

Kontrollgruppe:

- 16 Vergleichsproben von 9 verschiedenen Patientinnen;
- Davon :
 - eine Probe aus dem Bereich der Ektozervix
 - eine Probe aus dem Bereich der Endozervix
 - drei Proben aus dem Bereich des kaudalen Endometrium
 - vier Proben aus dem Bereich des kranialen Endometrium
 - vier Proben aus dem Bereich des Fimbrienkranzes
 - drei Proben aus Ovargewebe.
- Das Durchschnittsalter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation (über die Probenanzahl gemittelt) betrug 57,5 Jahre (41-80 Jahre).

Sowohl die Proben der Tumorgruppe als auch die Proben der Kontrollgruppe wurden komparativ gemeinsam mit kommerziell erworbener Normal-RNA als Kontrolle hybridisiert. Bei der kommerziellen RNA handelte es sich um „Total human ovary“-RNA (Spenderin: 44 jährig, weiblich, kaukasisch, serologisch HIV I, HIV II, HBV und HCV negativ; Fa. Ambion).

Somit ergeben sich bei den Untersuchungen zwei Kontrollen. Zum einen gibt es eine Kontrollgruppe von Gewebeproben, deren Genexpressionsergebnisse dem Vergleich mit den Ergebnissen der Tumorgruppe dienen. Zum anderen lag als Kontrolle bei allen Gewebeproben die für die komparative Hybridisierung verwendete kommerzielle „Total human ovary“-RNA vor.

Für die Immunhistologie wurde je Fall ein Paraffinblock, der repräsentatives Tumorgewebe enthielt, untersucht. Hierbei handelte es sich um Metastasen der Ovarialkarzinome oder um Ovarialgewebe mit dem entsprechenden Primärtumor.

2.1.2 Untersuchte Gene

Es wurden die Expressionen der folgenden 25 Hox-Gene untersucht:

<u>Symbol</u>	<u>Genname</u>	<u>Genbank ID</u>	<u>Funktion</u>
HOX-A1	Homeobox A 1	NM005522	Transkriptionsfaktor
HOX-A2	Homeobox A 2	NM006735	Transkriptionsfaktor
HOX-A4*	Homeobox A 4	NM002141 NM002141	Transkriptionsfaktor
HOX-A5*	Homeobox A 5	NM019102 NM019102	Transkriptionsfaktor
HOX-A7	Homeobox A 7	NM198076	Transkriptionsfaktor
HOX-A9	Homeobox A9		Transkriptionsfaktor
HOX-A10	Homeobox A 10	NM018951	Transkriptionsfaktor
HOX-A11	Homeobox A 11	NM005523	Transkriptionsfaktor
HOX-A13	Homeobox A 13	NM000522	Transkriptionsfaktor
HOX-B2	Homeobox B 2		Transkriptionsfaktor
HOX-B3*	Homeobox B 3	NM002146 NM002146	Transkriptionsfaktor
HOX-B5*	Homeobox B 5	NM002147 NM002147	Transkriptionsfaktor
HOX-B6*	Homeobox B 6	NM018952 NM018952	Transkriptionsfaktor
HOX-B7	Homeobox B 7	NM004502	Transkriptionsfaktor
HOX-B13*	Homeobox B 13	NM006361 NM006361	Transkriptionsfaktor
HOX-C4*	Homeobox C 4	XM498545 XM498545	Transkriptionsfaktor
HOX-C5	Homeobox C 5	NM018953	Transkriptionsfaktor
HOX-C6	Homeobox C 6		Transkriptionsfaktor
HOX-C10	Homeobox C 10	NM003473	Transkriptionsfaktor
HOX-C13*	Homeobox C 13	NM017410 NM017410	Transkriptionsfaktor
HOX-D3	Homeobox D 3	NM006898	Transkriptionsfaktor
HOX-D4*	Homeobox D 4	NM014621 NM014621	Transkriptionsfaktor
HOX-D8*	Homeobox D 8	NM019558 NM019558	Transkriptionsfaktor
HOX-D10	Homeobox D 10	NM002148	Transkriptionsfaktor
HOX-D11	Homeobox D 11	NM021192	Transkriptionsfaktor

Tab. 2-1: Für alle mit * gekennzeichneten Gene wurden jeweils zwei unterschiedliche Nukleotidsequenzen aus unterschiedlichen Abschnitten des entsprechenden Gens untersucht. Diese verschiedenen Sequenzen wurden während der gesamten Untersuchung wie zwei unterschiedliche Gene behandelt und insbesondere auch in dieser Form ausgewertet (siehe auch Ergebnis und Diskussion).

Für die genauere Untersuchung der Tumorbiologie wurden folgende Gene der Tumor-Stroma-Interaktion untersucht. Die Auswahl berücksichtigte auch Gene, die in einer kooperierenden Untersuchung zur allogenen Lungenschädigung nach Lungentransplantationen analysiert wurden:

<u>Symbol</u>	<u>Genname</u>	<u>Genbank ID</u>	<u>Funktion</u>
4-1-BB	TNF receptor superfamily, member 9 (TNFRS 9)	NM001561	Rezeptor für 4-1 BBL
4-1-BBL*	TNF ligand superfamily, member 9 (TNFLS 9)	NM003811	induziert die Proliferation aktiverter T-Zellen
B-7-1*	Cluster of differentiation 80 (CD 80)	NM005191	co-stimuliert die T-Lymphozytenaktivierung; Rezeptor für CD28 und CTLA 4
B-7-2*	Cluster of differentiation 86 (CD 86)	NM006889	co-stimuliert die T-Lymphozytenaktivierung; Rezeptor für CD28 und CTLA 4
BPI*	Bactericidal permeability increasing protein	NM001725	Rezeptor für CD28 und CTLA 4
		NM001725	zytotoxisch gg. gramnegative Bakterien
CD-11a	Cluster of differentiation 11a	NM002209	Rezeptor für ICAM 1-4
CD-11b*	Cluster of differentiation 11b	NM000632	Makrophagen, Monozyten und Granulozyten Adhäsion
		NM000632	
CD-18*	Cluster of differentiation 18	NM000211	Rezeptor für ICAM 1-4, Rezeptor für Komplementfragment iC3b und Fibrinogen
		NM000211	
CD-24*	Cluster of differentiation 24	NM013230	B-Zell Aktivierung
		NM013230	
CD-40*	Cluster of differentiation 40	NM001250	Rezeptor für CD 40 L
		NM001250	
CD 40L	Cluster of differentiation 40L	NM000074	stimuliert die B-Zell-Proliferation
ELA-2*	Elastase 2	NM001972	interagiert mit Elastin
		NM001972	
eNOS*	Nitric oxide synthase	NM000603	Produktion von NO (extrazellulär)
		NM000603	
ESM-1*	Endothelial cell-specific molecule 1	NM007036	vermittelt Interaktion zw. Lungenendothelzellen und Leukozyten
		NM007036	
FAS*	TNF receptor superfamily, member 6 (TNFRS 6)	NM000043	Rezeptor für TNFSF6; aktiviert Caspasekaskade; Zelltod
		NM000043	
FN1*	Fibronectin	NM002026	Zelladhäsion, Zellmotilität, Opsonisierung
		NM002026	
GM-CSF*	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor	NM000758	Wachstumsstimulation hämatopoetischer Vorläuferzellen
		NM000758	
Granzym-B*	Granzym B	NM004131	Zellyse im Rahmen der zellulär vermittelten Immunantwort
		NM004131	
hBD*	hemoglobin delta locus	NM005218	Sauerstofftransport
		NM005218	
hsp-40*	heat shock protein 40	NM006145	Interagiert mit Hsp 70; stimuliert die ATPase-Aktivität
		NM006145	
hsp-70	heat shock protein 70	NM005345	Proteinstabilisierung und Proteinfaltung
ICAM-1*	Intercellular adhesion molecule 1	NM000201	Ligand des LFA-1 Proteins
		NM000201	
IFN-γ*	Interferon gamma	NM000619	Immunregulation; aktiviert Makrophagen; hemmt Proliferation transformierter Zellen
		NM000619	
IGF-1*	Insulin like growth factor 1	NM000618	stimuliert das Zellwachstum
		NM000618	
IL 1-β*	Interleukin 1-beta	NM000576	Thymozyten Proliferation, B-Zell Maturation
		NM000576	
IL 1-RA*	Interleukin 1 receptor antagonist	NM000577	verhindert die Wirkung von IL 1 durch Bindung an dessen Rezeptor
		NM000577	
IL 6*	Interleukin 6	NM000600	B-Zell-Differenzierung
		NM000600	
IL-7*	Interleukin 7	NM000880	Wachstumsfaktor der Hämatopoiese; B-Zell-Maturation
		NM000880	

<u>Symbol</u>	<u>Genname</u>	<u>Genbank ID</u>	<u>Funktion</u>
IL-8*	Interleukin 8	NM000584 NM000584	Chemotaxis; aktiviert neutrophile Granulozyten
IL 12A*	Interleukin 12 A	NM000882 NM000882	Wachstumsfaktor für aktivierte T-Zellen und NK; stimuliert IFN-γ Produktion
IL-15*	Interleukin 15	NM000585 NM000585	stimuliert Proliferation von T-Lymphozyten,
IL 18*	Interleukin 18	NM001562 NM001562	stimuliert NK und die INF-γ Produktion in T1-Helferzellen
iNOS	Nitric oxide synthase	NM000625	Produktion von NO (intrazellulär)
LL-37*	Cathelicidin antimicrobics peptide	NM004345 NM004345	antibakterielle Aktivität durch Bindung an bakt. Lipopolysaccharide
LTB*	Lymphotoxin B	NM009588 NM009588	Regulation der Immunantwort
MMP-1*	Matrix metalloproteinase 1	NM002421 NM002421	spaltet Kollagen I, II, III, VII und X
MMP-9*	Matrix metalloproteinase 9	NM004994 NM004994	lokale Proteolyse der extrazellulären Matrix; Leukozytenmigration
OX-40-L*	TNF ligand superfamily member 4	NM003326 NM003326	bindet an TNFRSF4; co-stimuliert T-zellproliferation und Zytokinproduktion
PD-GFA*	Platelet derived growth factor A	XM499092 XM499092	Mitogen für mesenchymale Zellen; Wundheilung
PD -GFB*	Platelet derived growth factor B	NM002608 NM002608	Mitogen für mesenchymale Zellen; Wundheilung
Perforin*	Perforin	NM005041 NM005041	unter Ca 2+ Einfluss transformiert Perforin in transmembrane Tubuli; Zellyse
RANTES*	Rantes	NM002985 NM002985	Chemoattractant für Monozyten, Gedächtnis-T-Zellen, etc.; induziert Histaminausschüttung
Scy-A2*	Small inducible cytokine A 2	NM002982 NM002982	Chemotaxis (Monozyten, Basophile); verstärkt die monozytäre Antitumor-Aktivität
Scy-A3*	Small inducible cytokine A 3	NM002983 NM001437	Monokin, proinflammatorisch
SDF	Stromal cell derived factor	NM000609	Chemoattractant für T-Lympho- / Monozyten
SELE*	Selectin E	NM000450 NM000450	vermittelt Bindung von durch Zytokine aktivierten Zellen an Leukozyten
SELP*	Selectin P	NM003005 NM003005	vermittelt die Interaktion von aktivierten Epithelien oder Thrombozyten mit Leukozyten
Serpina-1*	α1-proteinase-inhibitor (α1-Antitrypsin)	NM000295 NM000295	inhibiert Serin-Proteasen (bes. Elastase)
Surfact-A*	Surfactant A	NM005411 NM005411	bindet Ca2+ abhängig an Phospholipide; setzt die Oberflächenspannung der Alveolar-membran herab
Surfact-B*	Surfactant B	NM000542 NM000542	- " -
Surfact-C*	Surfactant C	NM003018 NM003018	- " -
TGF β	Transforming growth factor beta	NM000660	kontrolliert Proliferation, Differenzierung, etc. in verschiedenen Zellen
TIMP-1*	Tissue inhibitor of metallo-proteinase 1	NM003254 NM003254	inaktiviert irreversibel Metalloproteinasen durch Komplexbildung
TNF α*	Tumor necrosis factor alpha	NM000594 NM000594	pyrogenes Zytokin, stimuliert IL-1 Sekretion
VEGF*	Vascular endothelial growth factor	NM001025366 NM001025366	Wachstumsfaktor im besonderen der Angiogenese

Tab. 2-2: Für alle mit * gekennzeichneten Gene wurden jeweils zwei unterschiedliche Nukleotidsequenzen aus unterschiedlichen Abschnitten des entsprechenden Gens untersucht. Diese verschiedenen Sequenzen wurden während der gesamten Untersuchung wie zwei unterschiedliche Gene behandelt und insbesondere auch in dieser Form ausgewertet (siehe auch Ergebnis und Diskussion).

2.2 Methode: Genaktivitätsbestimmung mittels spezifisch hergestelltem cDNA-Microarray

Die Microarrayuntersuchung umfasst mehrere Teilschritte, die in den folgenden Abschnitten einzeln aufgeführt und detailliert beschrieben werden.

Das Kernstück der Microarrayuntersuchung stellt die komparative Hybridisierung der Proben und der kommerziellen RNA gegen die Target-cDNA dar. Vor- und Nachteile der verwendeten methodischen Vorgehensweise werden im Diskussionsteil gesondert behandelt.

Alle Reagenzien sowie die entsprechenden Firmenanschriften sind im Anhang „Verwendete Reagenzien“ aufgeführt.

2.2.1 Bereitstellung der Target-cDNA über Klonierungsverfahren

Vom deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH wurden plasmidgebundene, Target-Gene erworben (Tabelle siehe oben). Die auf Stab-Agar bzw. Agar-Platten gelieferten Bakterienkolonien wurden zunächst auf Luria-Betani-Ampicillin-Agar(LBamp) ausplattiert und die Einzelkolonien in einer Übernacht-Kultur hochgezogen. Anschliessend wurden diese mittels einer Mini-Preparation (auf Luria-Betani-Agar) angezüchtet und anschließend sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis wurde mit der

Internetgenomdatenbank NCBI BLAST 2 (unter www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) verglichen und dabei die Richtigkeit der Sequenzen der cDNA-Inserts kontrolliert.

Hierauf wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt, die Menge der Plasmid-DNA gemessen, die Plasmide aufgereinigt und die Konzentration mit 1,5 M Betain auf 500ng/µl eingestellt.

Ein Teil dieser Plasmidlösungen wurde für Probendrucke verwendet, ein Teil der Übernacht-Kultur wurde mit Glycerol versetzt als Vorrat tiefgekühlt aufbewahrt (Glycerolstock).

Die Bereitstellung der zum Drucken verwendeten Inserts erfolgte aus dem dritten Teil, der in der Maxi-Präparation gewonnenen Plasmiden. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

(1) über Nacht	anzüchten der Bakterienkulturen in Luria-Betani-Medium (1,2 ml Ampicillin enthalten) in Square-Well-Platten
(2) -	10µl der Bakterienkultur in 190µl Aqua bidest aufnehmen
(3) 10min	bei 95°C inaktivieren
(4) -	Zentrifugation (Plasmide im Überstand)
(5) -	PCR-Amplifikation des jeweiligen Inserts mit Vektor-spezifischen Primern
(6) -	Amplifikat durch Ethanolfällung (2,5 Vol des Amplifikats 95% Ethanol; 0,1 Vol des Amplifikats 3M Na-Acetat, pH 5,2) aufreinigen
(7) -	in 3x SSC/1,5M Betain aufnehmen
(8) -	Konzentration auf 500ng/µl einstellen

Die Zugabe von Betain dient dazu eine verbesserte Spotmorphologie zu erhalten, da Betain auf Grund seiner chemischen Eigenschaften speziell für den Druck auf Poly-L-Lysin beschichtete Glas-Slides geeignet ist.

Für den Druckvorgang wurden je Gen 10µl cDNA-Lösung in einer Spottingplatte vorgelegt.

2.2.2 Beschichtung der Objektträger

Die gereinigten Objektträger wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet, um beim Drucken der Microarray-Slides eine bessere Haftung (durch Vernetzung) der

aufgebrachten cDNA zu erreichen, was zunächst durch elektrostatische Kräfte und später durch eine Behandlung mit UV-Licht geschieht (siehe hierzu auch 2.2.7.1 UV-Crosslinking). Es wurde besonders viel Wert auf eine makellose Oberfläche der beschichteten Objektträger gelegt, um Artefakte z.B. durch Staubpartikel oder Kratzer für die Auswertung ausschließen zu können.

(1) -	makroskopische Kontrolle der Objektträger
(2) 60min	Objektträger mit Detergenz bei ca. 140 U/min auf dem Schüttler inkubieren (Reinigung 1)
(3) 30min	Objektträger mit 0,5 M Natronlauge bei ca. 140 U/min auf dem Schüttler inkubieren (Reinigung 2)
(4) 120min	Objektträger mit Cleaning solution (70g NaOH, 280ml Aqua bidest, 420ml 95% Ethanol) überschichten und bei ca. 140 U/min auf den Schüttler geben (Reinigung 3)
(5) 4x10min	Objektträger mit Aqua bidest spülen (Schüttler; 140 U/min)
(6) 20min	Objektträger mit Aqua bidest spülen (Schüttler, 140 U/min)
(7) 30min	Objektträger mit Poly-L-Lysin-Lösung (70ml Poly-L-Lysin, 70ml PBS in 560ml Aqua bidest) überschichten und bei ca. 100 U/min auf dem Schüttler inkubieren (Beschichtung)
(8) 5x15min	Objektträger mit Aqua bidest spülen (Schüttler; 140 U/min)
(9) -	Objektträger über Nacht staubfrei trocknen

Bei allen verwendeten Reagenzien wurde darauf geachtet, dass die Eigenfluoreszenz der verwendeten Stoffe möglichst gering ist, oder es wurde von vornherein auf fluoreszenzfreie Reagenzien (z.B. A. bidest für Fluoreszenzanwendungen) zurückgegriffen.

2.2.3 Drucken der Microarray-Slides

Zum Bedrucken der Microarray-Slides mit der Target-cDNA wurde in Kooperation mit dem Genzentrum der LMU in Großhadern der Microarrayer „OmniGrid Accent“ (Fa. Gene Machines) verwendet. Folgende Einstellungen wurden gewählt:

Parameter	Wert
Dip Time	100
Print Time	100
Dip Velocity	20cm/s
Dip Acceleration	30cm/s ²
Print Velocity	15cm/s
Print Acceleration	50cm/s ²
Motion X	30
Motion Y	30
Motion Z	30
Acceleration X	512cm/s ²
Acceleration Y	512cm/s ²
Acceleration Z	256cm/s ²
Printhead	48 Pins
Pin configuration	4 x 12
Dot spacing horizontal	740 μm
Dot spacing vertical	740 μm
Number of dots per subarray horizontal	6
Number of dots per subarray vertical	6
Array spacing horizontal	200 μm
Array spacing vertical	200 μm
Number of arrays horizontal	1
Number of arrays vertical	1
Maximum number of samples	1728
Humidity	40%

Pro Druckvorgang können 50 Microarray-Slides bei einer Druckdauer von 64 min je Durchgang gedruckt werden.

Wie unter 2.2.1 bereits beschrieben, wurde die Target-cDNA in 3xSSC/1,5M Betain mit einer Konzentration von 500 ng/ μl aufgespottet. Hierbei wurden 10 μl für 200 Microarray-Slides (entspricht 800 Spots) benötigt, wobei eine nicht bestimmte, kleine Restmenge als Restvolumen übrig blieb.

In der folgenden Abbildung sind drei hybridisierte Microarray-Slides dargestellt. Auf jedem Microarray sind Bereiche zusammengehöriger Spots/Spotgruppen farblich markiert.

Von links nach rechts sind dies:

1. Bereich der Target-cDNA der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion
2. Bereich der Target-cDNA der Hox-Gene
3. Bereich der Target-cDNA der Housekeeping-Gene sowie der Bereich der Negativkontrollen (3xSSC/Betain) und der Cot-1-DNA-Spots (Positivkontrollen)

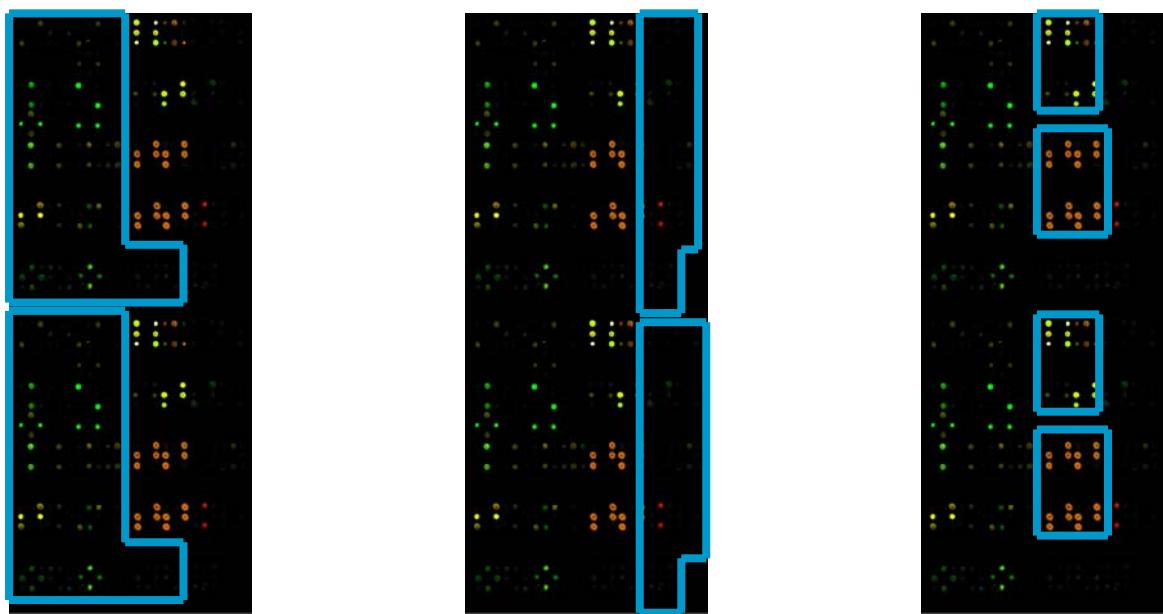


Abb. 2-2(von links): Gene der Tumor-Stroma-Interaktion, Hox-Gene, HKG- und Kontrollspots

2.2.4 Nachbearbeitung der Microarray-Slides

Nachdem die Microarray-Slides gedruckt worden waren, wurden sie in drei Teilschritten, die nachfolgend näher beschrieben sind, für die Hybridisierung und die Auswertung optimiert, sowie die aufgedruckte Target-cDNA zusätzlich auf dem Objektträger fixiert.

2.2.4.1 UV-Crosslinking

Nach 20 stündiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur, wurden die Arrays mit einer UV-Dosis von 60mJ bei einer Wellenlänge von 254nm bestrahlt (Spectrolinker, Spectronics). Dieser Schritt führt zu einer wesentlichen Verbesserung der Haftung der Target-cDNA auf dem Objektträger.

2.2.4.2 Rehydratation

Die Rehydratation der Microarray-Slides dient dazu ungleichmäßige Spotmorphologien und damit eine ungleichmäßige Hybridisierung innerhalb eines Spots zu verhindern. Diese würde sich im ausgewerteten Microarray-Slide als verstärktes Signal am Rand des Spots im Vergleich zum Signal in der Spotmitte (sog. Doughnut-Effekt) bemerkbar machen.

- (1) - 100ml 0,5x SSC in einer Hydratationskammer (Humid Chamber; Sigma) auf einer Heizplatte auf 42°C erwärmen
- (2)ca. 1-2 min Microarray-Slide mit der bespotteten Seite nach unten über die Hydratationskammer halten. Wenn die Spots rehydriert sind....
- (3)ca. 1-2 sec ...auf einer auf 140°C erhitzten Heizplatte trocknen lassen.

Der Rehydratationsschritt erfolgte in möglichst geringem zeitlichem Abstand zur Hybridisierung und wurde unmittelbar vor dem Blocking der Microarray-Slides durchgeführt, so dass zum Hybridisierungszeitpunkt die Microarray-Slides optimal vorbereitet waren.

2.2.4.3 Blocking der Microarray-Slides

Um ungebundenes Material, das sich noch auf dem Microarray-Slide befindet abbinden zu können, wird nochmals eine kurze chemische Behandlung

durchgeführt. Des Weiteren konnte der Kontrast zwischen Signal und Hintergrund (Signal to noise ratio; SNR) durch diesen Schritt verbessert werden.

(1)	30 sec	Microarray-Slides mit Bernsteinsäureanhydrid-Lösung (335ml 1-Methyl-2-pyrrolidone; 5,5g Bernsteinsäureanhydrid; 15ml 1M Na-Borat (pH=8,0)) bedecken und gut spülen
(2)	15 min	Microarray-Slides weiterhin in Bernsteinsäureanhydrid auf dem Schüttler spülen
(3)	-	Microarray-Slides in 95% Ethanol spülen
(4)	-	Microarray-Slides trockenzentrifugieren

2.2.5 RNA-Konservierung

Um die im Probenmaterial enthaltene RNA vor Abbau und Degradierung durch RNasen bis zur Aufarbeitung zu schützen, wurde das Material nach Entnahme schnellstmöglich in RNA-Later (Fa. Qiagen) eingebracht. Hierbei hat sich gezeigt, dass Zeiträume von mehr als 30 Minuten zwischen Unterbrechung der Blutzufuhr und Einbringung in das RNA-Later-Reagenz nicht akzeptabel sind, da sie mit Degradierung der mRNA einhergehen und keine auswertbaren RNA-Fragmente mehr vorliegen.

Der Zeitraum zwischen intraoperativer Unterbrechung der Durchblutung und Einbringung in RNA-Later konnte durch direkte Konservierung im Operationssaal auf zehn bis maximal zwanzig Minuten reduziert werden (siehe 4.2.2).

Um eine vollständige Durchdringung des Gewebes mit RNA-Later zu erreichen, muss das Gewebsstück in mindestens einer Dimension dünner als 0,5 cm sein. Die in RNA-Later konservierte Gewebeprobe wurde dann bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.6 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA, die in der tiefgekühlten Gewebeprobe konserviert war, wurde mit Hilfe des SV Total RNA Isolation System (Fa. Promega) durchgeführt. Alle Reagenzien wurden entsprechend den Herstellerangaben aufbewahrt und verwendet. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden dargestellt:

- (1) - Gewebeprobe in 1ml (Probe < 35mg: 175µl) SV RNA Lysis Puffer homogenisieren
- (2) 3 min mit 350µl SV RNA Dilution Puffer bei 70°C inkubieren
- (3) 10 min bei 13000 U/min (25°C) zentrifugieren
- (4) - Überstand in frisches Tube überführt mit 200µl 95% EtOH mischen und die Lösung auf die Säule (Spin column assembly) geben
- (5) 1 min bei 13000 U/min zentrifugieren
- (6) - Zentrifugat (flow through) verwerfen und 600µl SV RNA Wash Solution auf die Säule geben
- (7) 1 min bei 13000 U/min zentrifugieren und Eluat wiederum verwerfen
- (8) - 50µl DNase-Mix (40µl Yellow Core Puffer; 5µl 0,09M MnCl₂; 5µl DNase I) auf die Säule geben
- (9) 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
- (10) - 200µl SV DNase Stop Solution auf die Säule geben
- (11) 1 min bei 13000 U/min zentrifugieren
- (12) - 600µl SV RNA Wash Solution auf die Säule geben
- (13) 1 min bei 13000 U/min zentrifugieren; flow through verwerfen
- (14) - 250µl SV RNA Wash Solution auf die Säule geben
- (15) 2 min bei 14000 U/min zentrifugieren; Säule auf ein frisches Collection Tube setzen
- (16) - mit 100µl nuklease-freiem Wasser eluieren
- (17) 1 min bei 13000 U/min zentrifugieren
- (18) - Probenlagerung bei -20°C

Die OD-Messung der RNA wurde am Photometer (GeneQuant pro; Fa. Pharmacia) über die Wellenlängenbereiche 230nm, 260nm, 280nm und 320nm durchgeführt. Aussagen über die Quantität und die Qualität der enthaltenen RNA lassen im besonderen die Werte bei 260nm und 280nm (Quotient (Ratio) aus der Extinktion bei 260nm und 280nm) zu. Hierzu wurde eine Mikroküvette

mit mindestens 7 μ l Füllungsvolumen (Verdünnungsfaktor 1:6) und einer Strahlenganglänge (Schichtdicke) von 5mm benutzt.

Zur zusätzlichen Qualitätskontrolle der extrahierten RNA wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu verwendeten wir 1% Agarosegel mit 1xMOPS als Laupuffer, einen RNA-Größenmarker (RNA Molecular Weight Marker II (1,5-6,9kb); Fa. Roche) und als Gleichstromquelle das E 835 der Fa. Consort, das auf 100V Spannung (Laufzeit etwa 40-60min) eingestellt wurde. Zur Auswertung wurde das Gel in 1xTBE-Puffer mit SYBR-Gold-Farbstoff gefärbt und unter UV-Licht photographiert. Rückschlüsse auf die Qualität der RNA konnten wir vor allem auf Grund der Bandenmorphologie und des charakteristischen Auftrennungsmusters der RNA ziehen.

2.2.7 Labelling der RNA

Das so genannte „Labelling“ (= Markieren) der RNA dient dazu, die RNA mittels reverser Transkriptase in Copy-DNA (cDNA) umzuschreiben und mit Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Bei diesem Vorgang werden der Reversen Transkriptase einerseits unmarkierte Nukleotide (d-(ACG)TP) und andererseits mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotide (d-UTP) zur Synthese angeboten. Wir verwendeten mit dem Fluorochrom Cy-3 markiertes d-UTP (fluoresziert bei Anregung grün) für die Markierung der Patientenproben und mit dem Fluorochrom Cy-5 markiertes d-UTP (fluoresziert bei Anregung rot) für die Markierung der kommerziellen Kontrolle. Diese Nukleotide werden durch die Reverse Transkriptase in die zur Proben- bzw. Kontroll-RNA komplementäre c-DNA eingebaut. Als Ergebnis erhält man mit Cy-3 markierte c-DNA aus dem Reaktionsansatz der Patientenproben und mit Cy-5 markierte cDNA aus dem Reaktionsansatz der Kontroll-RNA.

Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen, das in großen Teilen von Hedge et al. (2000) beschrieben wurde:

(1) - 15 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 22 µl einsetzen

(2) - 2 µl random hexamers (Konzentration 5 µg/µl) pro 22 µl Probe hinzugeben

(3) 10 min bei 70°C inkubieren

(4) 2 min auf Eis geben

(5) - Mastermixansatz bestehend aus:

10 µl	first strand buffer
5 µl	1,4-dithio-DL-threitol
1 µl	d-(ACG)TP (25 mM)
2 µl	d-TTP (1 mM)
2 µl	RNasin
4 µl	Reverse Transkriptase

für den Probenansatz: 2 µl d-UTP-Cy3 (1 mM; rot)
 für den Kontrollansatz: 2 µl d-UTP-Cy5 (1 mM; grün)

hinzugeben.

(6) 10 min bei 27°C inkubieren

(7) 120 min bei 37°C inkubieren

(8) - 1 µl RNase H hinzugeben

(9) 20 min bei 37°C inkubieren

zur Aufreinigung:

(10) 2 min bei Raumtemperatur und 3000 U/min über eine Microspinsäule (Sephadex G50; Fa. Corning) durch Zentrifugieren aufreinigen

(11) - Probenlagerung bei -20°C (nur für wenige Stunden bis Tage)

Bei diesem Teilschritt ist zu beachten, dass die Fluoreszenzfarbstoffe sehr lichtempfindlich sind und deswegen in abgedunkelter Umgebung gearbeitet werden muss. Pro Probe wird analog eine Kontrolle aus kommerzieller RNA („Total human ovary“, Fa. Ambion) vorbereitet.

2.2.8 Komparative Hybridisierung der Microarray-Slides

Das eigentliche Kernstück der Methodik stellt die komparative Hybridisierung dar. Hierbei wird zu je einer Patienten-RNA analoge cDNA und zur Kontroll-RNA analoge cDNA mit der auf den Microarray-Slides befindlichen Target-cDNA zeitgleich und unter den Bedingungen einer feuchten Kammer

hybridisiert. Dabei lagern sich komplementäre cDNA-Stränge nach dem Prinzip der von Watson und Crick beschriebenen Basenpaarung zusammen und bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus. Ist also ein cDNA-Stück, das komplementär zu einem auf dem Microarray-Slide befindlichen Target-cDNA-Stück ist, vorhanden, so bildet es mit diesem einen cDNA-Doppelstrang aus und wird somit auf dem Microarray-Slide fixiert.

Durch die farbliche Markierung der cDNA (siehe 2.2.7) kann anschließend der Ursprung und die Quantität der gebundenen cDNA auf Grund der jedem Spot spezifischen Fluoreszenz (siehe 2.2.10) bestimmt werden. Sind z.B. in der Patientenprobe vergleichsweise wenige Kopien eines bestimmten Gens vorhanden, so wird der Spot in der Auswertung durch die vermehrte Bindung von Cy5-markierter Kontroll-cDNA rot imponieren. Der Ansatz für die Hybridisierung wurde wie folgt durchgeführt:

- (1) 45-60 min Aufgetaute Proben in der Speedvac Concentrater(Fa.Eppendorf) trocknen (Wasserentzug durch Vakuum)
- (2) - Probenpellet in 18,4µl 1x Hybridisationspuffer (für 100µl: 50µl Formamid; 25µl 20xSSC; 1µl 10%SDS; 24µl Aqua bidest) bei 42°C lösen
Je Probe wird entsprechend ein Kontrollansatz vorbereitet
- (3) - 18,4µl des Probenansatzes, 18,4µl des Kontrollansatzes, 1,6µl Cot 1-DNA sowie 1,6µl Poly-A-DNA in ein Tube pipettieren
- (4) 3 min bei 95°C inkubieren
- (5) 1 min bei 14000 U/min zentrifugieren
- (6) - Lifter Slips (Fa. Erie Scientific) auf den Microarray-Slide passgenau auflegen und den Probe-Kontrolle-Mix am Ende auftragen (gleichmäßige Verteilung auf Grund des Kapillareffektes)
- (7) 16-20 h Microarray-Slide in der Hybridisationskammer (Q-Instruments) bei 42°C inkubieren und minimal kreisen

Durch das Zugeben von Poly-A-DNA wird der Anteil unspezifischer Hybridisierungen repetitiver Sequenzen abgedeckt (geblockt).

Die Hybridisierungskammer (Fa. Q-Instruments) wird mit ca. 300µl 3xSSC gefüllt, um die Bedingungen einer feuchten Kammer über die Dauer der Hybridisierung aufrechtzuerhalten.

Auch bei diesem Teilschritt wurde darauf geachtet die fluoreszenzmarkierten Proben und Kontrollen möglichst wenig dem Einfluss von Licht auszusetzen. Während der 16-20 stündigen Hybridisierung wurden die Microarrays in der Hybridisierungskammer ständig kreisend bewegt, was einen sehr positiven Effekt auf die gleichmäßige Verteilung des Hybridisierungsansatzes über den Microarray hatte.

2.2.9 Waschen der Microarray-Slides

Nach der über Nacht erfolgten Hybridisierung (16-20h) erfolgte die Waschung. Hierbei sollen möglichst alle Rückstände von Puffern, Salzen oder ähnlichem entfernt werden, um bei der finalen Auswertung nur noch die hybridisierten Spots mit minimalem Hintergrund und möglichst wenig Störfaktoren vorliegen zu haben. Folgendes Protokoll stellte sich dabei für diesen Zweck am besten geeignet heraus:

- (1) - Deckglas entfernen
- (2) 5 min bei 42°C den Microarray-Slide in Waschlösung 1(1x SSC; 0,1%SDS) waschen
- (3) - Microarray-Slide kurz in Waschlösung 2 (0,1 SSC; 0,2%SDS) spülen
- (4) 5 min bei Raumtemperatur den Microarray-Slide in Waschlösung 2 waschen
- (5) 5 min bei Raumtemperatur den Microarray-Slide in Waschlösung 2 waschen
- (6) - Microarray-Slide kurz in Waschlösung 3 (0,1x SSC) spülen
- (7) 5 min bei Raumtemperatur den Microarray-Slide in Waschlösung 3 waschen
- (8) 5 min bei Raumtemperatur den Microarray-Slide in Waschlösung 3 waschen
- (9) 5 min bei Raumtemperatur den Microarray-Slide in Waschlösung 4 (0,01x SSC) waschen
- (10) 3 min Microarray-Slide bei Raumtemperatur und 500 U/min trockenzentrifugieren (Heraeus Megafuge 1.0 R)

Dabei wurde bei jedem Waschschritt ein neues Gefäß mit frischer Waschlösung (auch bei äquimolarer Konzentration zum vorherigen Schritt) benutzt, um Verschmutzungen durch Waschrückstände zu vermeiden. Ebenfalls wurde bei diesem Schritt die Lichtempfindlichkeit der Microarrays berücksichtigt und die Waschschritte in lichtundurchlässigen Gefäßen durchgeführt.

2.2.10 Auswertung der Microarrays

Die Microarrays wurden nach der Waschung eingescannt (Scanner: Axon 4000B, Fa. Axon Instruments; Software: GenePix Pro 6.0). Es hat sich bewährt hierfür eine automatische Programmeinstellung innerhalb der GenePix Pro Software zu wählen, die die Energieniveaus des Lasers bei 635nm (für Cy5) und 532nm (für Cy3) automatisch den Spotintensitäten anpasst und somit für ein optimales Scanergebnis sorgt. Der Scanner muss vor Erstanwendung sowie im Anschluss regelmäßig mittels entsprechender Kalibrierungsslides (Fa. Axon) für jede der beiden Wellenlängen kalibriert werden.

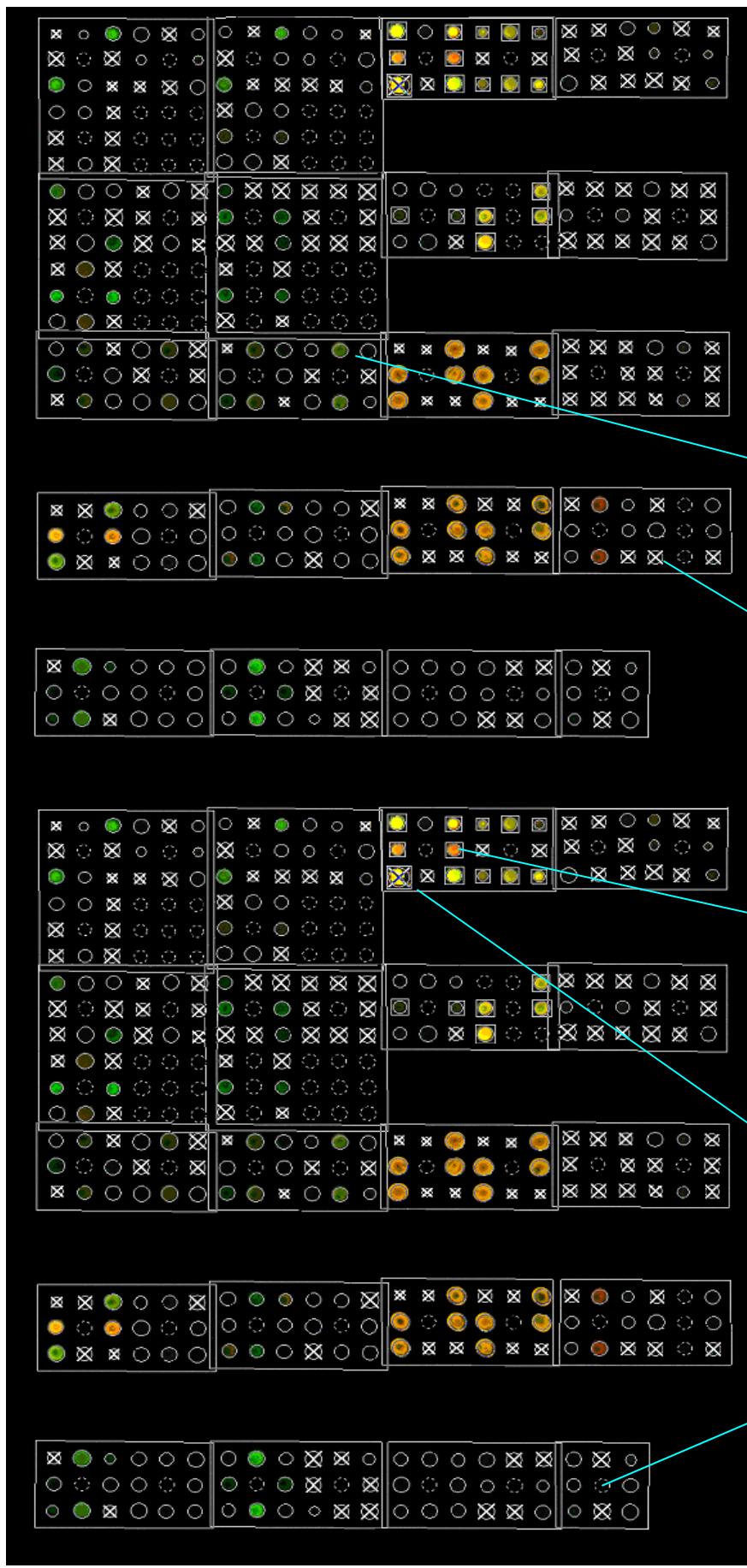


Abb. 2-3: kompletter, hybridisierter und eingescannter Microarray-Slide; mittels GenePix Pro 6.0 Software mit virtuellem Gitternetz belegt

ausgewerteter Spot

nicht auswertbarer Spot; Spot der die Kriterien (s.u.) nicht erfüllt

ausgewerteter Housekeeping-Gen-Spot

nicht auswertbarer Housekeeping-Gen-Spot; Spot erfüllt die Kriterien (s.u.) nicht

Spot ohne Target-DNA (dient zur Aufrechterhaltung des Gitternetzmusters)

Durch den Scavorgang werden die beiden verschiedenen Farbmarkierungen entsprechend angeregt. Somit wird ein Fluoreszenzbild des gesamten Microarrays in beiden Längenwellen erzeugt und sofort digital gespeichert. Erste Aussagen, ob ein Target-cDNA-Spot vermehrt mit Proben- oder Kontroll-cDNA, beiden etwa gleich oder gar nicht hybridisiert wurde, sind jetzt möglich. Für diesen Analyseschritt wird der Microarray in beiden Längenwellen gleichzeitig abgebildet. Dazu werden beide in den jeweiligen Längenwellen erzeugten Fluoreszenzbilder digital kombiniert. Im Wesentlichen gibt es vier verschiedene Möglichkeiten bezüglich der Fluoreszenz eines Target-Spots:

1. Spot fluoresziert grün: Vermehrte Bindung von Proben-cDNA; Überexpression des Gens in der Probe im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle
2. Spot fluoresziert rot: Vermehrte Bindung von Kontroll-cDNA; Unterexpression des Gens in der Probe im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle
3. Spot fluoresziert gelb-orange: Sowohl Proben-cDNA als auch Kontroll-cDNA sind in etwa gleichhäufig hybridisiert; keine unterschiedliche Expression des Gens in Probe und Kontrolle
4. Spot zeigt keine Fluoreszenz: Weder Proben-cDNA noch Kontroll-cDNA haben gebunden; entweder ist das entsprechende Gen weder in der Probe noch in der Kontrolle exprimiert, das Target-cDNA-Oligonukleotid entspricht nicht dem gesuchten Gen, die RNA war degradiert oder andere Ursachen haben die Hybridisierung verhindert.

Weiterhin wurden nun den einzelnen Spots die Gennamen zugeordnet. Dies geschah über einen GAL-File der in Abhängigkeit des Spotmusters erstellt wurde und auch schon dem Spotter als Vorlage für das Spottingmuster diente.

Legt man das so erzeugte virtuelle Gitternetz über das Abbild des Microarrays, kann man jedem Spot das entsprechende Gen zuordnen.

Nur in Verknüpfung mit dem GAL-File kann der Microarray und somit die Expression der einzelnen Gene weiter ausgewertet werden. Die einzelnen Spotfelder des virtuellen Gitternetzes haben eine bestimmte Größe, die mit der wahren Größe des Spots auf dem Microarray nicht immer übereinstimmt. Um zu vermeiden, dass Zwischenräume, Artefakte oder ähnliches in die Auswertung übernommen werden, wurde das Spotfeld jedem Spot individuell angepasst.

Des Weiteren wurden für jeden Spot Kriterien erstellt, die zum Ausschluss von solchen Spots führen, die artifizielle Expressionsmuster zeigen bzw. deren Expressionsmuster sich nicht deutlich genug vom Hintergrundrauschen abheben, um eindeutig als Genexpression gedeutet werden zu können.

Die *Ausschlusskriterien* für alle Spots, die Gene der Hox-Gruppe oder Gene der Gruppe der Tumor-Stroma-Interaktion enthalten (= GOI, Genes of interest), wurden wie folgt festgelegt:

SNR (635) < 2	AND
SNR (532) < 2	OR
(F635 % Sat) > 10	OR
(F532 % Sat) > 10	

Hierbei ist die SNR die „signal to noise ratio“ in der jeweiligen Längenwelle und F % Sat die Prozentzahl der gesättigten Pixel im Auswertebereich eines bestimmten Spots in der jeweiligen Längenwelle.

Weiterhin mussten alle Spots, die Housekeeping-Gene (HKG) enthielten, bestimmt werden und mittels entsprechender Kriterien ein- bzw. ausgeschlossen werden.

Die *Einschlusskriterien* für Spots mit HKG wurden folgendermaßen festgelegt:

[Rgn²(635/532)] > 0,4 AND
SNR (635) > 2 AND
SNR (532) > 2 AND
(F635 % Sat) < 10 AND
(F532 % Sat) < 10 AND
(InStr ((ID) „House“))

Hierbei ist die Rgn²(635/532) die „regression square ratio“ der Längenwellen 635nm und 532 nm und die (InStr ((ID) „House“)) ist das Instrument, das nur Spots zulässt, die im ursprünglichen GAL-File in der Bezeichnung das Wort „House“ enthalten haben.

Als nächster Schritt wurde jeder Microarray in den beiden Farbkanälen bezüglich der HKG normalisiert. Hierbei sollte das Verhältnis der Mediane der beiden Längenwellen der HKG-Spots gleich eins gesetzt werden. („ratio of medians of the normalization features is equal to 1“). Dabei ergaben sich in den beiden Längenwellen jeweils Normalisierungsfaktoren zwischen 0,7 und 1,3. Im Durchschnitt aller Arrays lag der Normalisierungsfaktor für die Wellenlänge 635nm bei 1,1 und für die Wellenlänge 532nm bei 1,0.

Die so gewonnenen Daten wurden gespeichert und anschließend in das statistische Auswerteprogramm Acuity 4.0 importiert, mit dem die statistische und graphische Auswertung erfolgte.

Für die statistische Auswertung verwendeten wir den Student's t-Test um zwischen Kontrollgruppe und Tumorgruppe signifikant unterschiedlich exprimierte Gene zu detektieren. Um semiquantitative Über- bzw. Unterexpression von Genen in der Tumorgruppe zu bestimmen benutzten wir die Fold-Change Analyse des Auswerteprogramms. Diese Analysemethode

diskriminiert die untersuchten Gene an Hand ihrer absoluten Expression im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle. Abschließend wurden weitere statistische Parameter wie die Standardabweichung, Mittelwert etc. für jedes Gen im Programm Acuity 4.0 errechnet.

2.3 Validierung der Ergebnisse

Da jede Microarrayuntersuchung zahlreichen methodischen Einflussfaktoren unterliegt (Churchill et al., 2002), ist es unerlässlich die Ergebnisse mittels parallel durchgeföhrter unabhängiger Methoden zu validieren. Hierfür wurden für ausgewählte Gene eine qRT-PCR für die Validierung der Ergebnisse auf RNA-Ebene sowie eine Immunhistologie für die Validierung der Ergebnisse auf Proteinebene durchgeführt.

Zur Validierung wurde in der Immunhistologie ausschließlich das Tumorprobenkollektiv, in der qRT-PCR Tumor- und Kontrollkollektiv herangezogen.

2.3.1 qRT-PCR

Für die Validierung mittels qRT-PCR wurden folgende Gene ausgewählt:

- Hox A2 und A4, Hox B3, B5, B6 und B13 sowie Hox C4 und C10
- CD 24 (Cluster of differentiation 24)
- IL 12 A und IL 18 (Interleukin 12 A, Interleukin 18)
- SELE (Selectin)
- LTB (Lymphotoxin B)
- Actin β und β 2-Mikroglobulin als Vertreter der Housekeeping Gene

2.3.1.1 Generierung der Standardreihe

Als erster Schritt wurde für jedes Gen eine Standardreihe (von 10^{10} - 10^1 Kopien) aus den entsprechenden Inserts der schon für die Target-cDNA verwendeten Klone generiert, um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen.

Die in der qRT-PCR eingesetzten Standardreihen für die Generierung der Standardkurve:

- 3 x Standard 5 $\approx 2,54 \times 10^6$ Kopien
- 3 x Standard 6 $\approx 2,54 \times 10^5$ Kopien
- 3 x Standard 7 $\approx 2,54 \times 10^4$ Kopien
- 3 x Standard 8 $\approx 2,54 \times 10^3$ Kopien

Auf Grund der bekannten Kopienanzahl der Standardreihe vor Beginn der qRT-PCR konnte nach durchgeföhrter qRT-PCR die Kopienanzahl der Probenreihe rückschließend über die spezifische Extinktion errechnet werden.

2.3.1.2. Transskription der RNA in cDNA

Die zu untersuchenden RNA-Patientenproben, Tumorkollektiv und Kontrollkollektiv, mussten in cDNA transskribiert werden (iScript-Kit, Fa. BioRad):

Ansatz für die RNA-cDNA Transkription:

5 fach iScript Reaction Mix	4µl
iScript Reverse Transcriptase	1µl
Nuclease freies Wasser	14µl
Proben RNA (~500 ng)	1µl

Anschliessend Inkubation im PGM Cycler (Fa. Eppendorf):

5 min	bei 25°C
30min	bei 42°C
5min	bei 85°C
Reaktionsstop	bei 4°C

Anschliessend Aufbewahrung bei -20°C.

Die Zahlen im dargestellten Ansatz sind für je eine Probe gültig.

2.3.1.3. Quantitative Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR

Im Folgenden wurden Primer mittels Internetdatenbanken (Genebank) bzw. Primersoftware (Primer3) ausgesucht, kommerziell erworben (Synthese durch Fa. Metabion, Martinsried) und mittels herkömmlicher PCR und Gelelektrophorese überprüft, in wie fern die ausgesuchten Primer auch zu Amplifikationsprodukten führen. Es wurden je ein Primer für das 3'-Ende (reverse Primer, Primer 1) und ein Primer für das 5'-Ende (forward Primer, Primer 2) eines zu detektierenden Genabschnittes ausgewählt. Bei drei der untersuchten Gene (Hox B3, Hox B13, IL 18) wurden die Kopienanzahlen mittels Sondenprimer detektiert (siehe Tabelle).

Ansatz für die qRT-PCR je Probe und je Standard:

Super Mix (enthält Standard oder Sonde)	12,5µl
Aqua dest.	9,5µl
Primer 1 (100µM) forward	1,0µl
Primer 2 (100µM) reverse	1,0µl
cDNA oder Standard	1,0µl

Hierbei wurde jede Tumorprobe in Doppelbestimmung analysiert sowie zwei Negativkontrollen und zwölf Standards zur Berechnung der Standardkurve amplifiziert. Insgesamt ergab sich somit eine Anzahl von 84 Proben auf der Mikrotiterplatte in dem qRT-PCR-Cycler (iCycler, Fa. Bio-Rad).

Je nach Primer wurde die Kopienzahl an Hand der Floureszenz von in die Amplifikate eingebautem SYBR® Green oder durch die Fluoreszenzabnahme von in die Amplifikate eingebauten Sonden (sogenannter Assay on demand) quantifiziert. Hierfür wurde das im iCycler (Fa. BioRad) programmierte Auswerteprogramm verwendet, welches einen Hintergrund bereinigten „PCR Standard Curve Report“, eine Schmelzkurve sowie Kurven der Standardreihe und der Proben berechnete. An Hand der Schmelzkurve konnte abgelesen werden, ob spezifische Produkte generiert wurden, Verunreinigungen vorhanden waren und die Primer optimal gewählt wurden. Auf Grund der Standardkurve konnte eine absolute Quantifizierung erfolgen. Die Berechnung der relativen Genexpression mittels z.B. der Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2004), erschien auf Grund der heterogenen Genexpression der HKG in der Microarrayuntersuchung als auch in der qRT-PCR, nicht verlässlich zu sein.

<u>Gen</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Amplifikatlänge</u>	<u>Detektion</u>
Hox A2 forw.	5' GTA-AAA-GCC-TTG-AGG-ACT-CCG 3'	164 bp	SYBR® green
Hox A2 rev.	5' TGA-AAA-GTG-TAG-CCT-TCC-CTC-T 3'		
Hox A4 forw.	5' GGA-GAG-GGG-AGT-GCA-TTT-AG 3'	221 bp	SYBR® green
Hox A4 rev.	5' TCC-AAG-TGA-ATC-CAG-CTC-AA 3'		
Hox B3	Sonde: Hs 00231127_m1, Applied Biosystems 37 bp ← 616 → 37bp	74bp	Assay on demand
Hox B5 forw.	5' CTG-CCT-CGC-CTT-GTG-TTA-C 3'	191 bp	SYBR® green
Hox B5 rev.	5' CCC-CAC-AGA-CAC-AAA-ACA-TTC 3'		
Hox B6 forw.	5' ACG-GCC-TGG-ATT-TAT-CAT-TG 3'	189 bp	SYBR® green
Hox B6 rev.	5' CAG-CGT-CGT-GTA-ACG-TGT-GT 3'		
Hox B13	Sonde: Hs 00197189_m1; Applied Biosystems 41 bp ← 734 → 41bp	82bp	Assay on demand
Hox C4 forw.	5' CGC-TAC-CTG-ACC-CGA-AGG-A 3'	138 bp	SYBR® green
Hox C4 rev.	5' TGA-CCT-GAC-TTT-GGT-GTT-GGG 3'		
Hox C10 forw.	5' TGT-GTC-AAG-CCC-TCA-CTC-AC 3'	151 bp	SYBR® green
Hox C10 rev.	5' AAC-GAT-TCT-GCC-TGT-GCT-CT 3'		
CD 24 forw.	5' GCC-AGT-CTC-TTC-GTG-GTC-TC 3'	142 bp	SYBR® green
CD 24 rev.	5' CCT-GTT-TTT-CCT-TGC-CAC-AT 3'		
IL 12A forw.	5' GAG-GCC-TGT-TTA-CCA-TTG-GA 3'	130 bp	SYBR® green
IL 12A rev.	5' TAC-TAA-GGC-ACA-GGG-CCA-TC 3'		
IL 18	Sonde: Hs 00155517_m1; Applied Biosystems 72 bp ← 581 → 72 bp	144bp	Assay on demand
LTB (2) forw.	5' TCC-TAC-ATT-TTT-CCC-ACT-C 3'	157 bp	SYBR® green
LTB (2) rev.	5' CAA-CAT-CAG-TCA-CCC-CGA-TA 3'		
SELE forw.	5' GGT-TTG-GTG-AGG-TGT-GCT-C 3'	193 bp	SYBR® green
SELE rev.	5' TGA-TCT-TTC-CCG-GAA-CTG-C 3'		
Actin β forw.	5' TTG-TTA-CAG-GAA-GTC-CCT-TGC-C 3'	101 bp	SYBR® green
Actin β rev.	5' ATG-CTA-TCA-CCT-CCC-CTG-TGT-G 3'		
β2 Mikroglobulin forw.	5' TGC-TGT-CTC-CAT-GTT-TGA-TGT-ATC	86 bp	SYBR® green
β2 Mikroglobulin rev.	5' TCT-CTG-CTC-CCC-ACC-TCT-AAG-T 3'		

Tab. 2-3: In der qRT-PCR untersuchte Gene mit dem jeweiligen Primer-Paar bzw. der jeweiligen Sonde.

Programmierung des iCyclers

Cycle	Repeats	Step	Ramp	Dwell	Setpoint
-------	---------	------	------	-------	----------

für einen Ansatz mit SYBR® Green Supermix:

1	1	1	Max	10:00	95°C
2	40	1	Max	00:10	95°C
		2	Max	00:15	60°C
		3	Max	00:25	72°C
3	1	1	Max	01:00	95°C
4	1	1	Max	01:00	58°C
5	80	1	Max	00:10	58°C

für einen Ansatz mit Sonde:

1	1	1	Max	10:00	95°C
2	40	1	Max	00:15	95°C
		2	Max	01:00	60°C

Die Auswertung erfolgte über das Cycler-eigene Programm i-Cycler (Fa. BioRad).

2.3.2 Immunhistologie

Die Immunhistologie wurde an den im Rahmen der Operation gewonnenen und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (nur Tumorgruppe) durchgeführt. Folgende Gene wurden für die immunhistologische Untersuchung ausgewählt:

- CD 24 (Cluster of differentiation 24)
- hsp 70 (heat shock protein 70)
- VEGF (vascular endothelial growth factor)
- IL 8 (Interleukin 8)
- MMP-1, MMP-9 (Matrix-Metalloproteinasen 1 und 9)
- RANTES
- TNF- α (tumor necrosis factor alpha)
- TIMP 1 (tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases)

Für jeden Fall der Tumorgruppe wurde eine repräsentative Gewebsprobe herangezogen. Nach dem Schneiden von 1-2µm dicken Schnitten, dem Aufziehen auf Glasobjektträger (Fa. Menzel) und einer 16 stündigen Trocknung bei 55°C, erfolgte zunächst die Entparaffinierung der Gewebsschnitte:

(1)	30 min	Inkubation in Xylol
(2)	5 min	Inkubation in 99%igem EtOH
(3)	5 min	Inkubation in 96%igem EtOH
(4)	5 min	Inkubation in 70%igem EtOH
(5)	5 min	Spülung in Aqua bidest

Anschließend wurden die Blöcke vorbehandelt und immunhistochemisch bearbeitet.

Dabei wurde folgendes Protokoll angewendet:

Vorbehandlung:

(1) 2x15 min	Gewebsschnitte mit Antikörper-spezifischem Puffer z.B. TRS 6 (Fa. Dako) bei 750 Watt in der Mikrowelle inkubieren
(2) 20 min	bei RT abkühlen und "nach"inkubieren
(3) 2x5 min	mit TRIS-Puffer spülen

Blockierung der endogenen Proxidasen

(1) 10 min	Gewebsschnitte mit 7,5 % wässrigem Wasserstoffperoxid bei RT inkubieren
(2) 10 min	fließend wässern
(3) 2x5 min	in TRIS-Puffer spülen

Blocking und Antikörperbehandlung

(1) 20 min	mit blocking serum/ Vectastatin (Fa. Vector) inkubieren Überstand abkippen
(2) -	mit Primär-Antikörper inkubieren (siehe Liste der einzelnen Antikörper)
(3) 2x5 min	in TRIS-Brij-Puffer spülen
(4) -	bei hsp 70: Inkubation mit Sekundär-Antikörper und erneutes Spülen
(5) 30 min	Inkubation mit AB-Komplex (Fa. Vector)
(6) 2x5 min	in TRIS-Brij-Puffer spülen
(7) 10 min	Inkubation mit AEC (=Chromogen)
(8) 10 min	fließend wässern
(9) 10 sek	Gegenfärbung mit Hematoxylin, Gill's Formula (Fa. Vector)
(10) 10 min	fließend wässern
(11) -	eindecken mit Kaiser's Glyceringelatine (Fa. Merck)

Bei allen Antikörpern -mit einer Ausnahme (hsp 70)- handelt es sich um biotinylierte Antikörper, die im weiteren Versuchsablauf über eine Biotinbindestelle den Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) binden, der wiederum das Chromogen Amino-Ethyl-Carbazol (AEC) bindet. Im Falle des hsp 70 wurde an den Primärantikörper ein biotinylierter Sekundärantikörper gebunden, der aus derselben Spezies wie der Primärantikörper stammt und deshalb keine Kreuzbindungskapazität zu diesem besitzt. Der weitere

Versuchsablauf ist zu den übrigen Antikörpern kongruent. Insgesamt wurden folgende Antikörper im Einzelnen verwendet:

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Inkubationszeit</u>	<u>Detektionssystem</u>	<u>Vorbehandlung</u>
CD 24 (Fa. Zytomed Systems)	01:20	60 min bei RT	ABC-Universal (Fa. Vector)	30 min Citrat Puffer (pH 6)
VEGF (Fa. Dako)	01:30	60 min bei RT	LSAB* (Fa. Dako)	30 min TRS 9 Fa. (Dako)
MMP 1 (Fa. Calbiochem)	1:150	60 min bei RT	ABC-Universal	30 min TRS 6 Fa. (Dako)
MMP 9 (Fa. Linaris)	1:200	60 min bei RT	ABC-Universal	30 min TRS 6
TIMP 1 (Fa. Acris)	1:100	60 min bei RT	ABC-Universal	30 min Protaqs IV (Fa. Quartett)
RANTES (Fa. Nanutec-Labgen)	01:10	60 min bei RT	ABC-Universal	30 min TRS 6
IL-8	1:120	60 min bei RT	ABC-Universal	30 min Enhancer (Fa. Linaris)
hsp 70 (Fa. Novocastra)	01:20	60 min bei RT	Ig M / SS ** (Fa. Dako)	30 min Citrat Puffer (pH 6)

Tab. 2-4: Auflistung der in der Immunhistologie verwendeten Antikörper

*Proteinblock (Fa. Dako); 10 min bei RT vor Inkubation mit Detektionssystem durchgeführt

**supersensitiver Strept-Avidin-Complex (Fa. Dako; Strept-ABC/ hrp) inkubiert mit Sekundär-Antikörper (Fa. Dako); Verdünnung 1:150; 30 min bei RT inkubieren; Proteinblock (Fa. Dako); 10 min bei RT vor Inkubation mit Detektionssystem durchgeführt

Die Ergebnisse der Immunhistochemie wurden lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop: Leitz Labor Lux S, Fa. Leitz) erfasst. Beispielhafte Areale wurden fotodokumentiert (Fotomikroskop: Zeiss Axioplan 2, mit Zeiss AxioCam HRc; Fa. Zeiss).

Es wurde dabei die zytoplasmatische sowie die membranständige Anfärbung berücksichtigt. In Fällen, bei denen die Verwendung eines Scores sinnvoll erschien, wurde ein semiquantitativer Score verwendet. In allen übrigen Fällen wurde eine deskriptive Auswertung durchgeführt.

3. Ergebnisse

Nachdem die Auswertung wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt wurde, konnten die verschiedenen Expressionsmuster in einem hierarchischen Cluster (siehe Abbildung) zusammengefasst dargestellt werden.

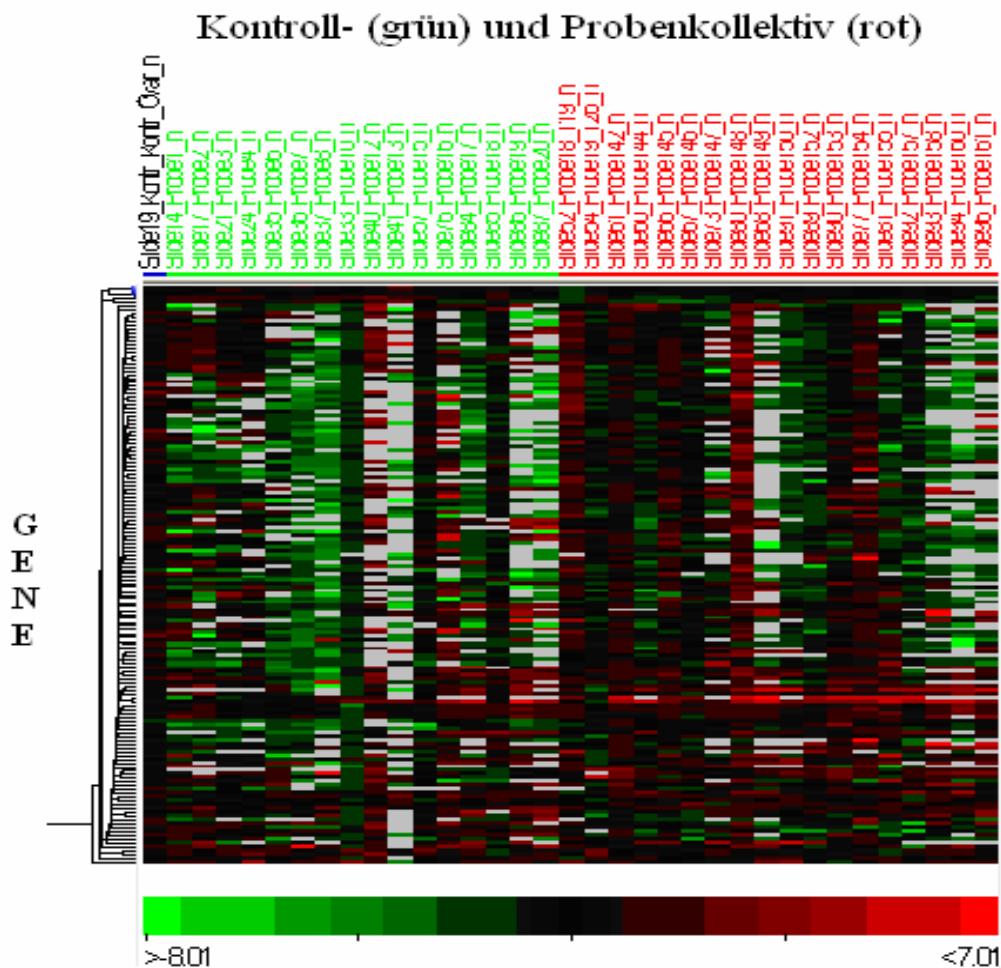


Abb. 3-1: hierarchisches Cluster aller untersuchten Gene und aller untersuchten Proben; auf der Ordinate sind die einzelnen Gene zeilenweise aufgetragen. Die Expression jedes einzelnen Genes ist als arithmetisches Mittel (Durchschnittswert) der Werte jedes einzelnen Pixels und Spots und für jede Probe farblich abgestuft dargestellt. Grüne Farbgebung bedeutet Unterexpression, rote Farbgebung Überexpression. Felder mit grauer Farbgebung zeigen an, dass die Genexpression für die entsprechende Probe nicht analysiert werden konnte. Auf der Abszisse sind die Proben des

Tumorkollektivs (rot) und des Kontrollkollektivs (grün) spaltenweise aufgetragen. In der ersten Spalte ist das Ergebnis der Kontrollhybridisierung (kommerzielle Kontrolle gg. Kommerzielle Kontrolle) aufgetragen. Hier zeigt sich erwartungsgemäß weder eine Über- noch eine Unterexpression.

Der Farbbalken unter dem hierarchischen Cluster zeigt die Zuordnung der Farbgebung zur entsprechenden Genexpression.

Bei grober Betrachtung zeigt sich, dass die Gene in den Proben des Tumorkollektivs eher zu Überexpression neigen als in den Proben des Kontrollkollektivs. Um detaillierte Aussagen zu gewinnen, werden die Expressionsmuster der Gene nun im Einzelnen betrachtet.

In den Ergebnissen der beiden Validierungsmethoden - qRT-PCR auf RNA-Ebene und Immunhistologie auf Proteinebene – zeigen sich teilweise gleichsinnige, teilweise gegensinnige Expressionsergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen der Microarrayuntersuchung.

3.1. Expression der untersuchten Hox-Gene

Für 25 Hox-Gene wurde die Genexpression untersucht. Bei 10 Hox-Genen (40%) wurden je zwei Nukleotidsequenzen desselben Genlocus analysiert, bei 15 Genen (60%) eine Nukleotidsequenz. Für die Genexpression der untersuchten Hox-Gene wurde ein sehr heterogenes Expressionsmuster nachgewiesen.

Zur Validierung der Genexpressionsmuster, die an Hand der Microarrayuntersuchung gewonnen wurden, wurde für acht ausgewählte Hox-Gene eine qRT-PCR–Untersuchung durchgeführt.

3.1.1. Hox-Gen-Expression in der Microarray-Analyse

In der Summation der Durchschnittswerte der Genexpressionen über die gesamte Tumorgruppe zeigten die paralogen Hox-Gen-Gruppen 2, 10, 11 und 13 eine verminderte Expression im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle. Es waren also im einzelnen Hox A2, B2, A10, C10, D10, A11, D11, A13(2), B13(2) und C13(2) heruntergeregt. Für die Proben der Tumorgruppe ließ sich jedoch kein Hox-Cluster (z.B Hox A1 bis Hox A13) identifizieren, der im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle komplett über- oder unterexprimiert war.

Summe der Durchschnittswerte der Log Ratio (532/635)

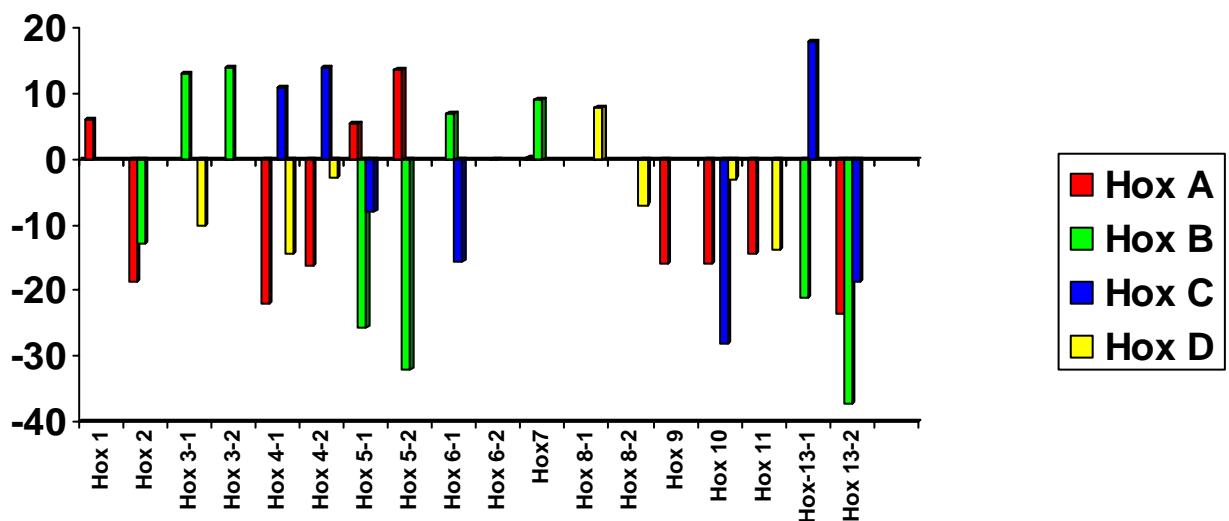


Abb. 3-2: Die Summe der Durchschnittswerte der logarithmisierten Verhältnisse der beiden Fluoreszenzwellenlängen 532nm zu 635nm (Mean log Ratio (532/635); Ordinate) in der Tumorgruppe ist aufgetragen gegen die paralogen Hox-Gruppen (Abszisse). Die Zugehörigkeit zum entsprechenden Cluster ist farblich markiert.

Für die Genexpression der Hox-Gene konnten folgende numerische Werte ermittelt werden :

<u>Symbol</u>	<u>Genname</u>	<u>Mean Log Ratio (532/635)</u>		<u>Differenz** (absolut)</u>
		Kontrolle	Tumor	
HOX-A1	Homeobox A 1	0.415	0.329	-0,046
HOX-A2	Homeobox A 2	-2.630	-1.095	1,535
HOX-A4*	Homeobox A 4	-1.283	-1.218	0,065
		-2.740	-1.011	1,729
HOX-A5*	Homeobox A 5	1.493	0.299	-1,194
		-0.402	0.801	1,203
HOX-A7	Homeobox A 7	0.396	0.008	-0,388
HOX-A9	Homeobox A9	-1.567	-0.930	0,637
HOX-A10	Homeobox A 10	-1.051	-1.054	-0,003
HOX-A11	Homeobox A 11	-0.106	-0.907	-0,801
HOX-A13	Homeobox A 13	-0.103	-1.309	-1,206
HOX-B2	Homeobox B 2	-1.882	-0.911	0,971
HOX-B3*	Homeobox B 3	0.064	0.772	0,708
		-0.530	1.072	1,602
HOX-B5*	Homeobox B 5	-0.169	-1.715	-1,546
		0.289	-1.893	-2,182
HOX-B6*	Homeobox B 6	-0.716	0.439	1,155
		-0.540	-0.011	0,592
HOX-B7	Homeobox B 7	0.029	0.605	0,576
HOX-B13*	Homeobox B 13	-2.570	-1.166	1,404
		-1.480	-2.070	-0,59
HOX-C4*	Homeobox C 4	-1.157	0.647	1,804
		0.155	0.777	0,622
HOX-C5	Homeobox C 5	-1.030	-0.473	0,557
HOX-C6	Homeobox C 6	-0.477	-0.864	-0,387
HOX-C10	Homeobox C 10	-2.468	-1.653	0,815
HOX-C13*	Homeobox C 13	0.323	1.122	0,799
		-0.815	-1.101	-0,286
HOX-D3	Homeobox D 3	0.607	-0.602	-1,209
HOX-D4*	Homeobox D 4	0.271	-0.849	-1,12
		0.267	-0.170	-0,437
HOX-D8*	Homeobox D 8	0.616	0.432	-0,184
		-0.057	-0.409	-0,352
HOX-D10	Homeobox D 10	0.998	-0.187	-1,185
HOX-D11	Homeobox D 11	-0.391	-0.815	-0,424

Tab. 3-1: numerische Werte der Genexpression der Hox-Gene; die Werte sind die Durchschnittswerte der logarithmisierten Verhältnisse (Ratio) der beiden Fluoreszenzwellenlängen 532nm(Probe) und 635nm(kommerzielle Kontrolle) der Proben des Tumor- und des Kontrollkollektives aus der komparativen Hybridisierung gegen die kommerzielle Kontrolle.

Fettgedruckte Werte: unterschiedliche Expression im Vergleich der Tumorguppe und der Kontrollgruppe auf dem Niveau $p<0,2$ (Student's t-Test).

*Für alle mit * gekennzeichneten Gene wurden jeweils zwei unterschiedliche Nukleotidsequenzen aus unterschiedlichen Abschnitten des entsprechenden Gens untersucht.

**Die Differenzen der Durchschnittswerte der Genexpression wurden zunächst absolut bestimmt. Als Zeichen der Überexpression in Proben der Tumorguppe im Vergleich zu Proben der Kontrollgruppe wurden entsprechende Differenzen als positive Zahlenwerte angegeben und rot markiert, Unterexpressionen in Proben der Tumorguppe im Vergleich zu Proben der Kontrollgruppe wurden als negative Zahlenwerte angegeben und grün markiert.

Insgesamt konnten sieben Hox-Gene (28%) in den Proben der Tumorguppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe als hochreguliert und fünf Hox-Gene (20%) als herunterreguliert identifiziert werden. Bei drei Hox-Genen (12%; Hox A5, Hox B13 und Hox C13) wurde für die beiden untersuchten Nukleotidsequenzen gegenläufige Tendenzen der Genregulation gefunden (siehe auch Diskussion). Für die Auswertung dieser Untersuchung wurde festgelegt, dass von einem eindeutigen Expressionsunterschied erst ausgegangen wurde, wenn der Unterschied des Durchschnittswertes des Logarithmus des Verhältnisses (Ratio) der beiden Fluoreszenzwellenlängen größer Eins war (Mean $\log(532/635)>1$; dies galt auch für die Bewertung der Genexpression im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle).

Somit ergab sich für folgende Gene eine deutliche, jedoch nur teilweise statistisch signifikante

- **Hochregulation** im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe:
Hox A2, Hox A4(2), Hox A5(2), Hox B3(2), Hox B6(1), Hox B13(1)
und Hox C4(1)

- **Herunterregulation** im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe:

Hox A5(1), Hox A13, Hox B5(1) und Hox B5(2), Hox D3, Hox D4(1) und Hox D10

Für Hox B5 und Hox A4 sahen wir im Vergleich zu den Proben des Kontrollkollektivs Expressionsunterschiede, die statistische Signifikanz erreichten:

- **Hox B5(2):** p-Wert = 0,16; im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe zeigt Hox B5 eine **Unterexpression** in beiden untersuchten Nukleotidsequenzen

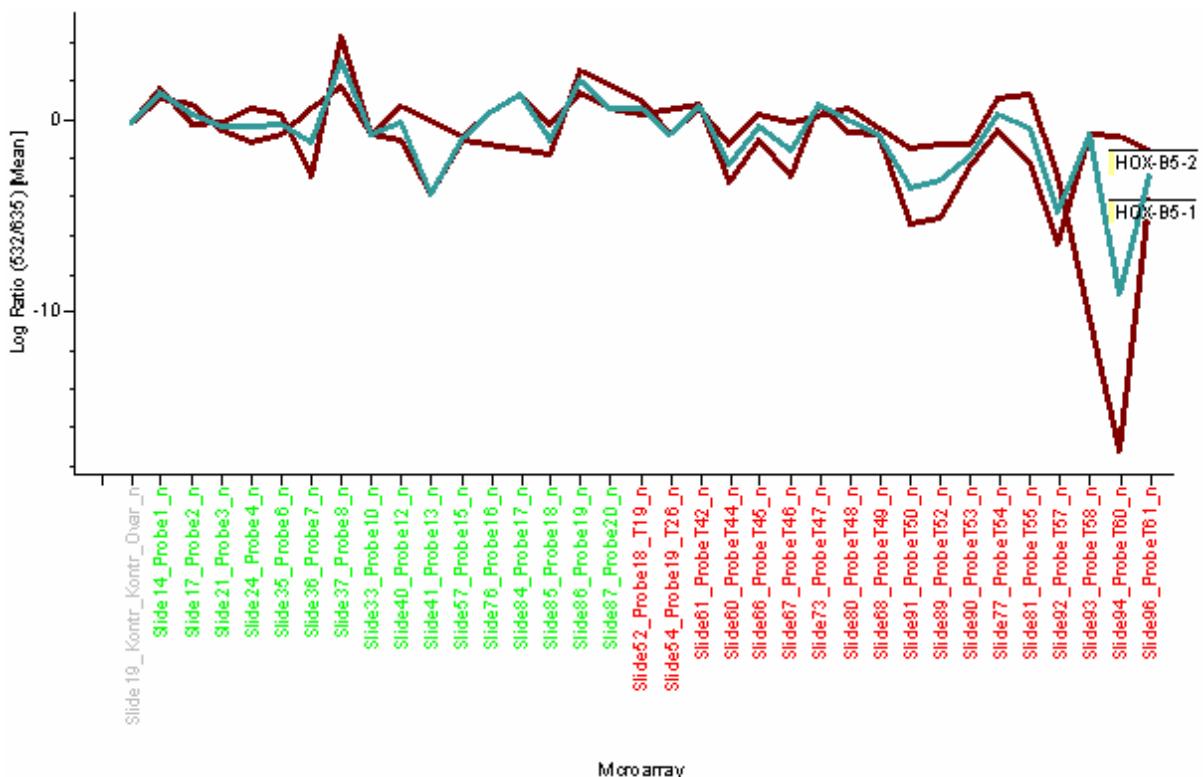


Abb. 3-3: Genexpression von Hox B5 (abgebildet ist die Expression von Hox B5 (1) und Hox B 5 (2); das arithmetische Mittel ist durch die blaue Linie dargestellt); Proben des Kontrollkollektives grün, Proben des Tumorkollektives rot; an erster Stelle der Abszisse liegt das Ergebnis der Kontrollhybridisierung;

auf der Ordinate ist der Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses der Fluoreszenzwellenlängen 532nm zu 635nm aufgetragen.

- **Hox A4(2):** p-Wert = 0,19; im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe zeigt Hox A4 (2) eine **Überexpression**.

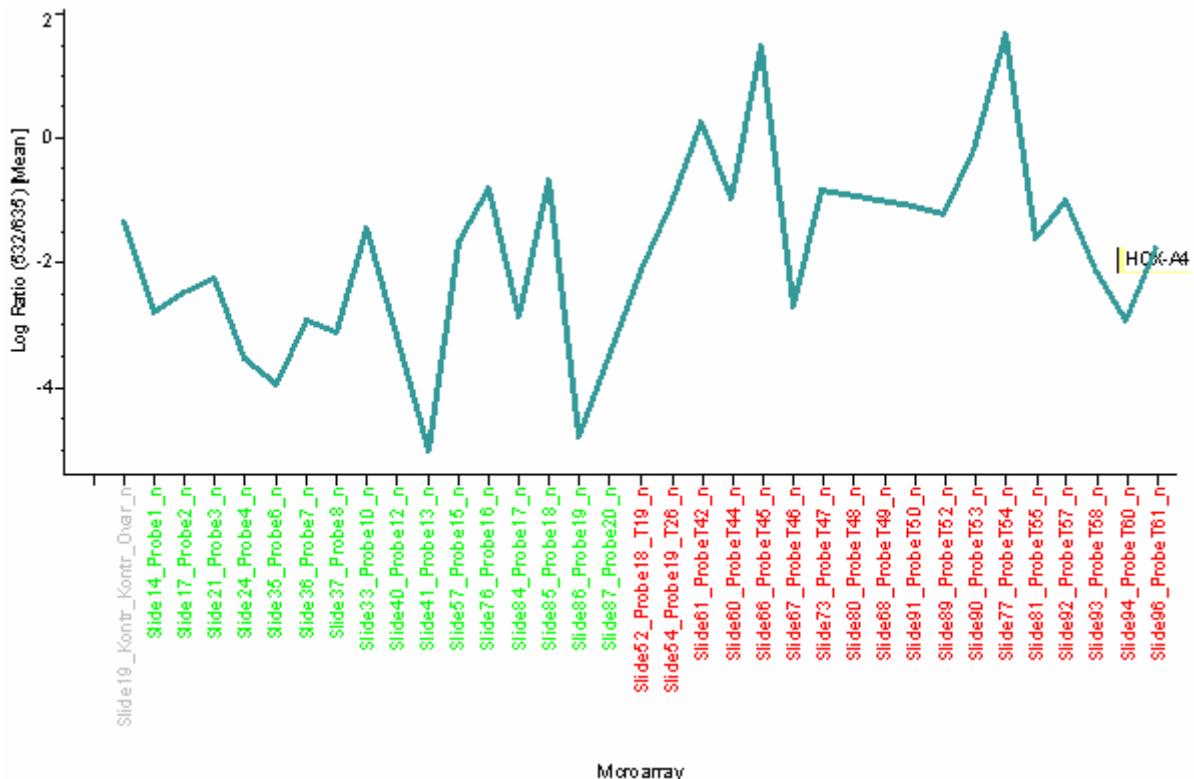


Abb. 3-4: Genexpression von Hox A4(2); Proben des Kontrollkollektives grün, Proben des Tumorkollektives rot; an erster Stelle der Abszisse liegt das Ergebnis der Kontrollhybridisierung; auf der Ordinate aufgetragen ist der Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses der Fluoreszenzwellenlängen 532nm zu 635nm (Mean log Ratio(532/635)).

Während sich bei Hox B5 beide untersuchten Nukleotidsequenzen herunterreguliert zeigten, zeigte sich bei Hox A4 vor allem die zweite untersuchte Nukleotidsequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert. Für alle weiteren untersuchten Hox-Gene wurde mittels des Student's t-Test ein korrigierter p-Wert von 1,00 errechnet. Somit konnte kein weiterer signifikanter

Unterschied in der Genexpression der Hox-Gene zwischen Proben der Tumorguppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

In der Fold-Change Analyse zeigte(n)

- Hox B5(2), Hox B13(2), Hox C 10(1) und Hox A4(1) in **mindestens fünf Proben** der Tumorguppe einen Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses der Fluoreszenzwellenlängen 532nm zu 635nm, der **kleiner als -2** im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle war.
- Hox B5(2) in **mindestens drei Proben** der Tumorguppe einen Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses der Fluoreszenzwellenlängen 532nm zu 635nm, der **kleiner als -5** ist im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle.
- **keines** der Hox-Gene einen Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses der Fluoreszenzwellenlängen 532nm zu 635nm in Proben der Tumorguppe, der in **mindestens zehn Proben größer als 2** oder in **mindestens fünf Proben größer als 5** ist.

Diese Ergebnisse belegen die große Variabilität der Hox-Gen-Expression in den Ovarialkarzinomgewebsproben im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe (Student's t-Test und Differenzen (vgl. Tab. 3-1)) sowie zur kommerziellen RNA (Fold-Change Analyse und absolute Werte (vgl. Tab. 3-1)). Insgesamt erschienen die Hox-Gene in den Proben der Tumorguppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe tendenziell häufiger hochreguliert als herunterreguliert.

Die Standardabweichungen für den Mean log Ratio(532/635) betrug für die Proben der Tumorguppe zwischen 0,75 für Hox A9 und 4,55 für Hox B5(1). Für die Proben der Kontrollgruppe lag die entsprechende Standardabweichung zwischen 0,95 für Hox B5(2) und 3,68 für Hox A7.

3.1.2. Expression der untersuchten Hox-Gene in der qRT-PCR

Die qRT PCR wurde sowohl an den Proben des Tumor- als auch des Kontrollkollektivs durchgeführt. Mit Hilfe der qRT-PCR wurden die Expressionen von insgesamt acht Hox Gene untersucht:

	Kopienanzahl	
	Durchschnittswert Tumorgruppe	Durchschnittswert Kontrollgruppe
Hox A2	681	1789
Hox A4	157	1311 (nur 15 Kontrollen)*
Hox B3	898	512
Hox B5	2627 (1246)**	2455 (nur 14 Kontrollen)*
Hox B6	67 (nur 10 Tumorproben)*	101 (nur 8 Kontrollen)*
Hox B13	417 (nur 9 Tumorproben)*	417 (nur 13 Kontrollen)*
Hox C4	6079	6022
Hox C10	1619	1713

Tab. 3-2: Durchschnittswerte der absoluten (RNA-)Kopienanzahl der einzelnen Gene; Die Durchschnittswerte sind auf ganze Zahlen gerundet.

*Proben, deren Kopienanzahl unter die Nachweisgrenze der qRT-PCR fiel wurden für die Berechnung des Durchschnittswertes nicht herangezogen.

**Die Durchschnittswertberechnung der Hox B5-Kopienanzahl in der Tumorgruppe wird durch einen „Ausreißer“ verfälscht; Ergebnis ohne „Ausreißer“: 1246 Kopien

In der qRT-PCR konnten für zwei (25%) der acht untersuchten Hox-Gene höhere Durchschnittswerte der Kopienzahlen in den Proben der Tumorgruppe

als in den Proben der Kontrollgruppe detektiert werden. In fünf (62,5%) der acht untersuchten Hox-Gene zeigten sich geringere Durchschnittswerte der Kopienzahlen in den Proben der Tumorgruppe als in den Proben der Kontrollgruppe. Für ein Hox-Gen ergaben sich exakt dieselben Durchschnittswerte der Kopienanzahlen in beiden Probengruppen.

Es ist auch hier zu bedenken, dass ein Unterschied von nur wenigen Kopien im Vergleich der Durchschnittswerte beider Gruppen nicht als Genexpressionsunterschied gewertet werden darf, da dies im Rahmen der Unschärfe der gesamten qRT-PCR-Untersuchung nicht gerechtfertigt ist.

Betrachtet man wiederum alle in der qRT-PCR untersuchten Hox-Gene, so ergibt sich wiederum als Tendenz eine verminderte Expression der Hox-Gene in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe.

3.2. Expressionsanalyse von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion

In der Microarrayuntersuchung wurde das Expressionsverhalten von 55 verschiedenen Genen der Tumor-Stroma-Interaktion untersucht. Bei 48 Genen (87,3%) wurden zwei verschiedene Nukleotidsequenzen desselben Genlocus für die Untersuchung herangezogen, bei sieben Genen (12,7%) standen lediglich die Ergebnisse aus der Analyse einer Nukleotidsequenz zur Verfügung.

Zur Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse auf RNA-Ebene wurde für ausgesuchte Gene der Tumor-Stroma-Interaktion eine qRT-PCR sowie zur Validierung der Ergebnisse auf Proteinebene eine immunhistologische Untersuchung durchgeführt.

3.2.1. Expression der untersuchten Gene der Tumor-Stroma-Interaktion in der Microarray-Analyse

Für die Gruppe der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion konnte im allgemeinen eine Zunahme der Genexpression in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe festgestellt werden. So konnten von den 55 Genen der Tumor-Stroma-Interaktion 30 Gene (54,4%) in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe als hochreguliert identifiziert werden. Gleichzeitig war lediglich ein Gen (1,8%) herunterreguliert. Acht Gene (14,5%) zeigten in den beiden untersuchten Nukleotidsequenzen gegenläufige Regulationstendenzen.

Bei der Auswertung ist zu bedenken, dass eine eindeutige Genregulation im eigentlichen Sinne erst nachgewiesen ist, wenn der Unterschied des Durchschnittswertes des Logarithmus des Verhältnisses der beiden Fluoreszenzwellenlängen größer Eins ist ($\text{Mean log}(532/635) > 1$).

Somit ergibt sich für folgende Gene eine deutliche

- **Hochregulation:**

- Rezeptoren: 4-1 BB, B7-2 (1) und B7-2(2), CD 11a, CD 18(1),
- Immunologische Faktoren mit aktivierenden Effekten: CD 11b (1), CD 24(1) und CD 24(2), GM-CSF(1), IFN- γ (1) und IFN- γ (2), IL1- β (1) und IL1- β (2), IL 7(2), IL 8(1) und IL 8(2), , IL 15 (1) und IL 15(2), IL 18(1) und IL 18(2), Ox-40-L(1) Scy A2(1) und Scy A2(2), SELE(2), SELP(1), TNF α (2),
- Immunologische Faktoren mit inhibierenden Effekten: IL 1-RA(2)
- Direkte Abwehrreaktion: BPI(2), Granzym-B(1),
- Tumorzell-assoziierte Regulation: FN1(1) und FN1(2), IGF-1(2), MMP 1(1), MMP 9(1)
- Neoangiogenese: VEGF(1) und VEGF(2)

- Sauerstofftransport: hBD(1) und hBD(2)
- Weitere Faktoren, für die bislang vor allem eine pulmonale Funktion bekannt ist: Serpina-1(1) und Serpina-1(2), Surfact A(1) und Surfact A(2), Surfact C(1) und Surfact C(2)

- **Herunterregulation:**

- CD 40-L (stimuliert die B-Zellproliferation)
- PD-GFA(2) (Mitogen für mesenchymale Zellen)
- Perforin(2) (Zellyse)
- TIMP 1(2) (Inaktivierung von Metalloproteininasen)

Symbol	Genname	Mean Log Ratio(532/635)		Differenz** (absolut)
		Kontrolle	Tumor	
4-1-BB	TNF receptor superfamily, member 9 (TNFRS 9)	-1.855	-0.741	1,114
4-1-BBL*	2	0.344	-0.295	-0,639
		-1.648	-0.837	0,811
B-7-1*	Cluster of differentiation 80 (CD 80)	0.476	0.601	0,125
		-2.445	-0.744	1,701
B-7-2*	Cluster of differentiation 86 (CD 86)	-2.394	-0.937	1,457
		-2.012	-0.399	1,613
BPI*	Bactericidal permeability increasing protein	-0.436	0.311	0,747
		-2.799	-0,341	2,458
CD-11a	Cluster of differentiation 11a	-0.019	1.050	1,069
CD-11b*	Cluster of differentiation 11b	-2.043	-1.005	1,038
		-0.765	-0.461	0,304
CD-18*	Cluster of differentiation 18	-2.762	-1.163	1,599
		-1.434	-0.508	0,926
CD-24*	Cluster of differentiation 24	-0.509	4,241	4,75
		1.590	3.313	1,723
CD-40*	Cluster of differentiation 40	-0.192	-0.421	-0,229
		-1.176	-1.199	-0,023
CD 40L	Cluster of differentiation 40L	0.670	-0.471	-1,141
ELA-2*	Elastase 2	-0.776	-1.188	-0,412
		-1.433	-1.334	0,099
eNOS*	Nitric oxide synthase	-0.678	-0.790	-0,112
		0.309	0.989	0,68
ESM-1*	Endothelial cell-specific molecule 1	-0.676	0.304	0,98
		-0.803	-0.093	0,71
FAS*	TNF receptor superfamily, member 6 (TNFRS 6)	0.312	0.189	-0,123
		0.248	-0.747	-0,995
FN1*	Fibronectin	-0.735	0.826	1,561
		-0.320	0.848	1,168
GM-CSF*	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor	-2.110	-0,486	1,624
		-1.917	-1.301	0,616
Granzym-B*	Granzym B	-1.430	-0.061	1,369
		-0.723	-0.871	-0,148
hBD*	hemoglobin delta locus	-1.930	-0.865	1,065
		-2.051	-0.649	1,402
hsp-40*	heat shock protein 40	0.768	0.484	-0,284
		0.062	0.757	0,695
hsp-70	heat shoc protein 70	-0.422	0.427	0,849
ICAM-1*	Intercellular adhesion molecule 1	0.616	1.244	0,628
		0.234	0.886	0,652
IFN-γ*	Interferon gamma	-2.247	-0.369	1,878
		-1.574	0.499	2,073
IGF-1*	Insulin like growth factor 1	0.192	0.456	0,264
		-1.801	-0.602	1,199
IL 1-β*	Interleukin 1-beta	-1.873	-0.790	1,083
		-3.157	-1.065	2,092
IL 1-RA*	Interleukin 1 receptor antagonist	-0.344	-0.168	0,176
		-2.358	-0.304	2,054
IL 6*	Interleukin 6	0.446	0.011	-0,435
		0.171	-0.152	-0,323
IL-7*	Interleukin 7	-2.017	-1.053	0,964
		-3.495	-0.920	2,575

Symbol	Genname	Mean (Ratio 532/635)		Differenz** (absolut)
		Kontrolle	Tumor	
IL-8*	Interleukin 8	-2.310	-0.691	1,619
		-2.258	-0.395	1,863
IL 12A*	Interleukin 12 A	-0.383	-0.817	-0,434
		-0.770	-0.991	-0,221
IL-15*	Interleukin 15	-2.069	-0.228	1,841
		-2.869	-1.112	1,757
IL 18*	Interleukin 18	-2.465	-0.861	1,604
		-2.212	-0.855	1,357
iNOS	Nitric oxide synthase	-1.789	-0.883	0,906
LL-37*	Cathelicidin antimicrobics peptide	-0.759	-0.742	0,017
		0.303	1.235	0,932
LTB*	Lymphotoxin B	-1.284	-0.898	0,386
		-1.284	-1.182	0,102
MMP-1*	Matrix metalloproteinase 1	-2.572	-0.760	1,812
		0.417	0.880	0,463
MMP-9*	Matrix metalloproteinase 9	-1.887	0.840	2,727
		-1.459	-0.490	0,969
OX-40-L*	TNF ligand superfamily member 4	-2.179	-0.732	1,447
		-1.633	-1.279	0,354
PD-GFA*	Platelet derived growth factor A	-1.710	-1.361	0,349
		1.095	-0.531	-1,626
PD -GFB*	Platelet derived growth factor B	-0.542	-0.460	0,082
		-2.079	-1.553	0,526
Perforin*	Perforin	-0.246	0.051	0,195
		1.093	-0.681	-1,774
RANTES*	Rantes	-2.339	-1.620	0,719
		-1.365	-0.604	0,761
Scy-A2*	Small inducible cytokine A 2	-0.330	0.811	1,141
		0.127	1.517	1,39
Scy-A3*	Small inducible cytokine A 3	0.244	-0.565	-0,809
		0.409	-0.037	-0,446
SDF	Stromal cell derived factor	-0.839	0.083	0,922
SELE*	Selectin E	-0.508	-0.066	0,442
		-2.302	-0.559	1,743
SELP*	Selectin P	-2.926	-0.883	2,043
		-0.913	-0.179	0,734
Serpina-1*	α 1-proteinase-inhibitor (α 1-Antitrypsin)	-2.360	0.395	2,755
		-2.575	-0.576	1,999
Surfact-A*	Surfactant A	-2.908	-0.934	1,974
		-0.504	0.284	1,292
Surfact-B*	Surfactant B	-1.390	-1.045	0,345
		0.763	0.755	0,008
Surfact-C*	Surfactant C	-2.348	-0.989	1,359
		-3.594	-0.488	3,106
TGF β	Transforming growth factor beta	-0.490	-0.304	0,186
TIMP-1*	Tissue inhibitor of metallo-proteinase 1	-0.518	-0.104	0,414
		-0.238	-1.757	-1,519
TNF α *	Tumor necrosis factor alpha	-0.926	-0.317	0,609
		-1.986	-0.897	1,089
VEGF*	Vascular endothelial growth factor	-0.323	2.593	2,916
		-2.552	0.105	2,657

Tab. 3-3: numerische Werte der Genexpression der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion; die Werte sind die Durchschnittswerte der logarithmierten Verhältnisse (Ratio) der beiden Fluoreszenzwellenlängen 532nm (Probe) und 635nm (kommerzielle Kontrolle) der Proben des Tumor- und des Kontrollkollektives.

Fettgedruckte Werte: unterschiedliche Expression im Vergleich der Proben der Tumorgruppe mit den Proben der Kontrollgruppe auf dem Niveau $p<0,2$ (Student's t-Test).

Für alle mit „*“ gekennzeichneten Gene wurden jeweils zwei unterschiedliche Nukleotidsequenzen aus unterschiedlichen Abschnitten des entsprechenden Gens untersucht.

**Die Differenzen der Genexpression wurden zunächst absolut bestimmt. Als Zeichen der Überexpression in Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu Proben der Kontrollgruppe wurden entsprechende Differenzen als positive Zahlenwerte angegeben und rot markiert, Unterexpressionen in Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu Proben der Kontrollgruppe wurden als negative Zahlenwerte angegeben und grün markiert.

Folgende Gene zeigten in den Ovarialkarzinomgewebsproben im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe signifikante Expressionsunterschiede auf dem Niveau $p<0,2$ (Student's t-Test):

- GM-CSF (1): p-Wert = 0,0001; im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe zeigt GM-CSF eine vermehrte Expression; für GM-CSF errechnete sich im Student's t-Test der signifikanteste Unterschied zwischen den beiden Probengruppen

- BPI (2): p-Wert = 0,006; im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe zeigt BPI eine vermehrte Expression.
- CD 24(1): p-Wert = 0,006; im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe zeigt CD 24 eine vermehrte Expression.
- MMP-1 (1): p-Wert = 0,02; im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe zeigt MMP-1 eine vermehrte Expression.
- VEGF(2): p-Wert = 0,18; im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe zeigt auch VEGF eine vermehrte Expression.

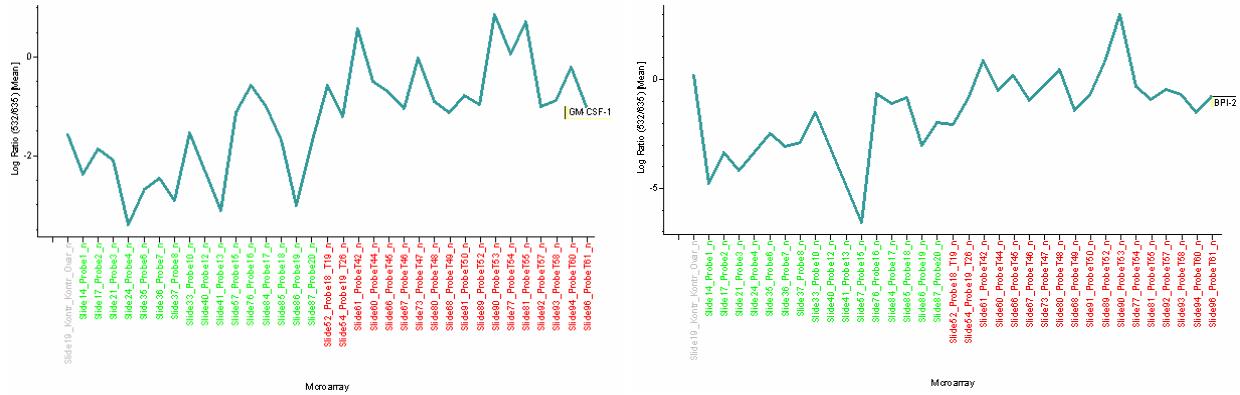


Abb. 3-5: Expression von GM-CSF(1) links und BPI (2) rechts. Auf der Ordinate Mean $\log(532/635)$. Auf der Abszisse die einzelnen Proben der Kontrollgruppe (grün) und der Tumorgruppe (rot). An erster Stelle auf der Abszisse das Ergebnis der Kontrollhybridisierung (kommerzielle Kontrolle gegen kommerzielle Kontrolle)

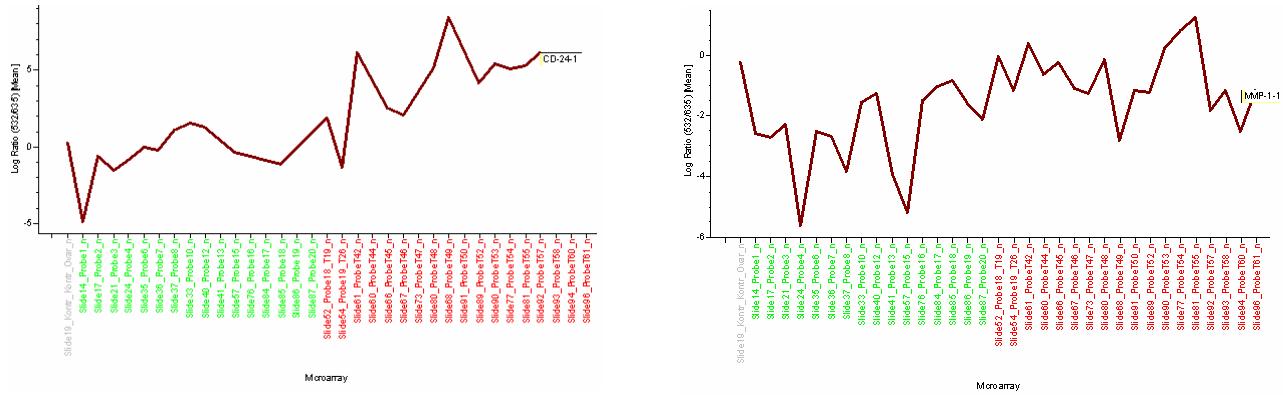


Abb.3-6: Expression von CD 24 (1) und MMP 1 (1). Auf der Ordinate der Mean $\log(532/635)$. Auf der Abszisse die einzelnen Proben der Kontrollgruppe (grün) und der Tumorgruppe(rot). An erster Stelle auf der Abszisse das Ergebnis der Kontrollhybridisierung (kommerzielle Kontrolle gegen kommerzielle Kontrolle)

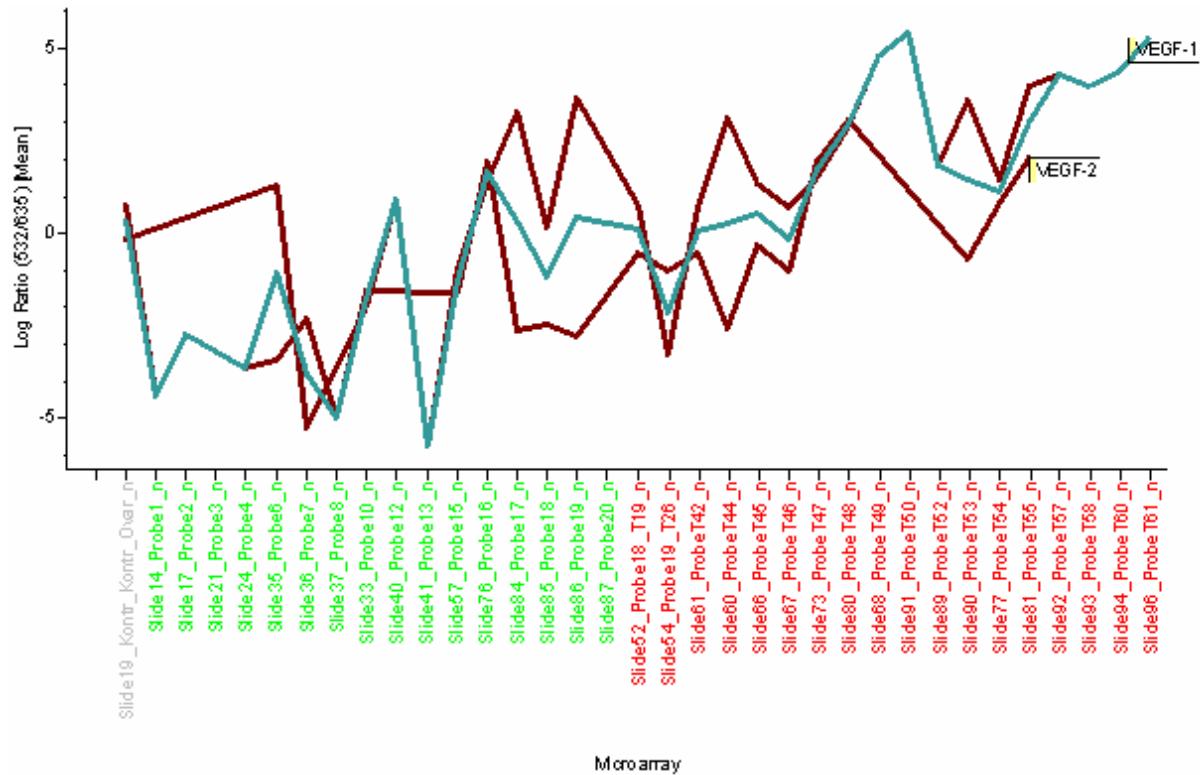


Abb. 3-7: Expression von VEGF(1) und VEGF(2). Die blaue Linie zeigt den Durchschnittswert aus den Expressionen der beiden Nukleotidsequenzen VEGF(1) und VEGF(2). Auf der Ordinate ist der Mean $\log(532/635)$ aufgetragen, auf der Ordinate die einzelnen Proben der Kontrollgruppe (grün) und der Tumorgruppe(rot). An erster Stelle auf der Abszisse das Ergebnis der

Kontrollhybridisierung (kommerzielle Kontrolle gegen kommerzielle Kontrolle).

In der Fold-Change-Analyse zeigte(n):

- CD 24(1) und CD 24(2) und VEGF(1) einen Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses (Ratio) der Fluoreszenzwellenlängen 532nm und 635nm von **größer 2** in **mindestens 10 Proben** des Tumorkollektives im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle.
- CD 24(1) einen Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses (Ratio) der Fluoreszenzwellenlängen 532nm und 635nm von **größer 5** in **mindestens 5 Proben** des Tumorkollektives im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle.
- 4-1-BBL(2), B-7-2(1), CD 11b(1); CD 18(2), CD 40(2), ELA-2(1), eNOS(1), hBD(1), IL 15(2), LTB(1) und LTB(2), OX-40L(2), PD-GFA(1), PD-GFB(2), SELP(1), Surfact A(1), Surfact C(2) und TIMP-1(2) einen Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses (Ratio) der Fluoreszenzwellenlängen 532nm und 635nm von **kleiner - 2** in **mindestens 5 Proben** des Tumorkollektives im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle.
- TIMP-1(2) einen Durchschnittswert des Logarithmus des Verhältnisses (Ratio) der Fluoreszenzwellenlängen 532nm und 635nm von **kleiner - 2** in **mindestens 10 Proben** des Tumorkollektives im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle.

Durch den Student's t-Test und die tabellarische Berechnung der Expressionsunterschiede konnten für einige Gene der Tumor-Stroma-Interaktion Expressionsunterschiede in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe festgestellt werden. In der Fold-Change Analyse

konnten die unterschiedlichen Genexpressionen im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle analysiert werden.

Die Standardabweichungen für den Mean log Ratio(532/635) betrug für die Proben der Tumorgruppe zwischen 0,64 für Surfactant B(2) und 4,08 für RANTES(1). Für die Proben der Kontrollgruppe lag die entsprechende Standardabweichung zwischen 0,84 für GM-CSF(1) und 3,66 für SDF-1.

3.2.2. Expressionsanalyse der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion in der qRT-PCR

In der qRT-PCR wurden im Rahmen der Validierung auf RNA-Ebene die Genexpressionen von CD 24, IL 12a, IL 18, LTB und SELE bestimmt. Die absolute quantitative Auswertung ergab folgendes Ergebnis:

	Kopienzahl	
	Durchschnittswert Tumorgruppe	Durchschnittswert Kontrollgruppe
CD 24	152643	72026
IL 12a	200	378
IL 18	13775	13415
LTB	1131	2294 (nur 15 Kontrollen)*
SELE	11021	49407

Tab. 3-4: Durchschnittswerte der absoluten (RNA-)Kopienanzahl der einzelnen Gene; Durchschnittswerte auf ganze Zahlen gerundet.

*Proben, deren Kopienanzahl unter die Nachweigrenze der qRT-PCR fielen wurden für die Berechnung des Durchschnittswertes nicht herangezogen

Für eines (CD 24) der fünf untersuchten Gene konnte in der qRT-PCR eine vermehrte Genexpression in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die analysierte Kopienzahl von

CD 24 erreichte in den Proben der Tumorgruppe das 2,12-fache der Kopienzahl in den Proben der Kontrollgruppe. Bei einem Gen (IL18) war die Kopienzahl in beiden Untersuchungsgruppen fast identisch. Bei den anderen drei untersuchten Genen konnte eine verminderte Genexpression in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Wiederum ist auch hier zu bedenken, dass ein Unterschied von nur wenigen Kopien im Vergleich der Durchschnittswerte beider Gruppen nicht als Genexpressionsunterschied gewertet werden darf, da dies im Rahmen der Unschärfe der gesamten qRT-PCR-Untersuchung nicht gerechtfertigt ist.

3.2.3. Ergebnis der Immunhistologie von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion

In der immunhistologischen Untersuchung wurden acht Gene der Tumor-Stroma-Interaktion (CD 24, MMP-1, MMP-9, VEGF, TIMP, hsp 70, IL-8, RANTES) analysiert. Es wurden nur die Proben der Tumorgruppe zur Validierung der Ergebnisse auf Proteinebene herangezogen.

Ergebnis der Immunhistologie

Anfärbung der Tumorzellkomplexe:

0% -- <10% (+) 10-50% + >50% ++

CD 24

- 7 7 4

(Es wurde die Anfärbung der Zellmembran gewertet)

MMP 1

7 6 3 2

(Es wurde die Anfärbung des Zytoplasmas gewertet)

VEGF

Es wurde keine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Es zeigte sich eine starke Anfärbung im Bereich des Kapillarbettes zwischen den Tumorzellkomplexen. Die Tumorzellkomplexe zeigten keine Expression.

MMP 9

Es wurde keine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Hauptsächlich Anfärbung der Granulozyten und des Fettgewebes; Entzündungs-assoziierte Expression.

TIMP

Es wurde keine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Hauptsächlich Anfärbung der Serosa und von Psammomkörperchen; in den Tumorzellkomplexen wenig bis gar keine Anfärbung; allenfalls ist fokal eine schwache Expression möglich.

hsp 70

Es wurde keine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Die Expression im Tumor wurde als gering- bis mittelgradig eingestuft (<20%). Insgesamt sehr heterogene Expression.

IL 8

Es wurde keine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Tumor durchgehend negativ; Positivität überwiegend in Makrophagen und Monozyten.

RANTES

Es wurde keine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Tumor durchgehend negativ; Positivität überwiegend in Makrophagen und Monozyten. Ähnliches Bild wie bei IL 8.

Tab. 3-5: Ergebnis der Immunhistologie

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in der Immunhistologie der Ovarialkarzinome für CD 24 eine mittel- bis hochgradige Expression in den Tumorzellkomplexen besonders im Bereich der luminalen Zellmembranen der Karzinomzellen festgestellt werden konnte.

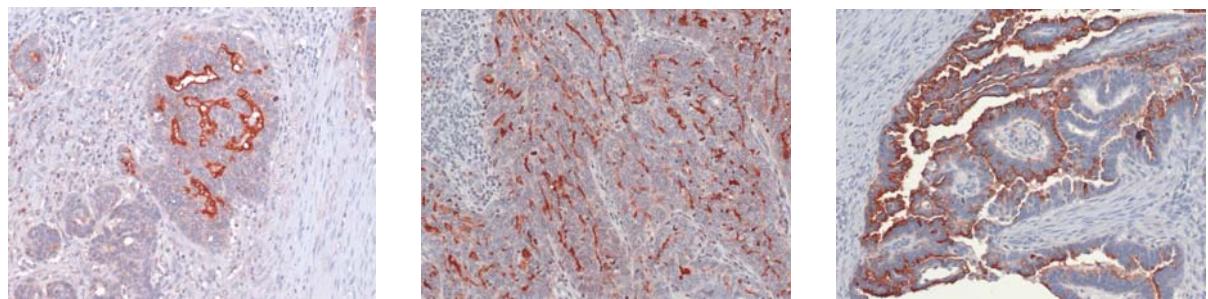


Abb. 3-8: immunhistologische Färbung von drei verschiedenen Ovarialkarzinomen für CD 24 (20-fache Vergrösserung). Vor allem in den luminalen Bereichen ist eine membranständige Anfärbung deutlich zu erkennen.

Für MMP 1 und hsp 70 konnte eine gering- bis mittelgradige Expression der Tumorzellkomplexe festgestellt werden (siehe auch Tab. 3-5)

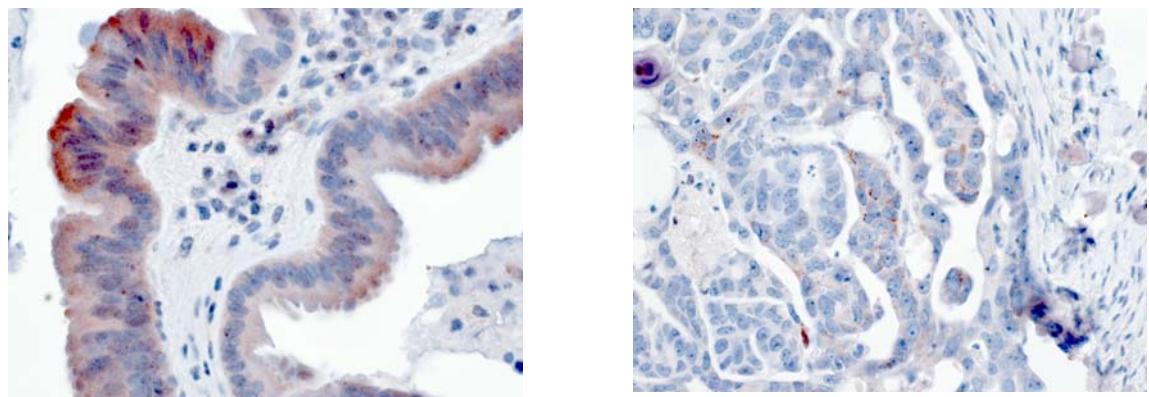


Abb. 3-9: immunhistologische Färbung von zwei Ovarialkarzinomen für MMP 1 (40-fache Vergösserung)

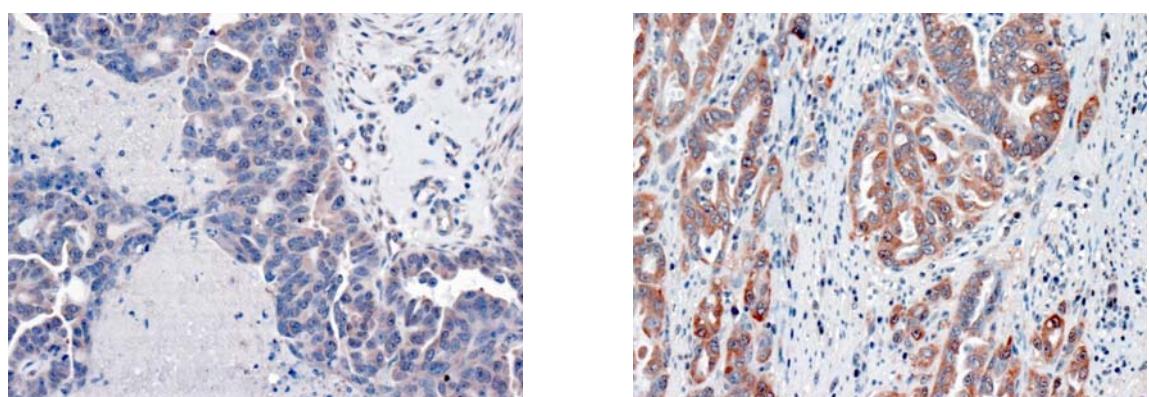


Abb. 3-10: immunhistologische Färbung von zwei Ovarialkarzinomen für hsp70 (20-fache Vergrösserung)

Für alle anderen immunhistologisch untersuchten Gene der Tumor-Stroma-Interaktion zeigte sich in den Tumorzellkomplexen keine Anfärbung. Es ergab sich somit kein Hinweis auf eine Expression in Ovarialkarzinomzellen. Der positive Nachweis einer Genexpression in der Microarray-Analyse beruhte vielmehr auf anderen Zellpopulationen in den Gewebeproben. So waren in der Immunhistologie entweder Adipozyten und Kapillarendothelien (TIMP, VEGF) oder Zellen des Immunsystems (MMP 9, IL 8, RANTES) angefärbt.

3.3. Vergleich der Ergebnisse der Microarrayuntersuchung mit den Ergebnissen der Validierungsmethoden

Auf Grund der unterschiedlichen methodischen Ansätze die verschiedene molekulare Ebenen widerspiegeln, lassen sich die Ergebnisse der Microarray-Analyse und den Validierungsuntersuchungen nicht direkt und absolut miteinander vergleichen. Es lassen sich aber gleich- oder gegenläufige Regulationstendenzen in den Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungsmethoden feststellen. Somit kann die Wertigkeit der Befunde der Microarrayuntersuchung durch die Ergebnisse der Validierungsmethode(n) besser beurteilt werden.

3.3.1 Vergleich der Untersuchungsergebnisse der Hox-Gen-Expression zwischen Microarray-Analyse und qRT-PCR

Für insgesamt acht Hox-Gene wurde zusätzlich zur Microarrayuntersuchung eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Hierbei konnte für drei Hox-Gene die Regulationstendenz aus dem Microarray in der qRT-PCR bestätigt werden. So wurden für Hox C4 und Hox B3 jeweils kongruente Hochregulationen bei den Ovarialkarzinomen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden, für Hox B5 eine entsprechend kongruente Herunterregulation.

Für Hox B13 wurden in der Microarray-Analyse für die beiden untersuchten Nukleotidsequenzen gegenläufige Regulationstendenzen detektiert. Hier zeigte sich in der qRT-PCR kein Regulationsunterschied zwischen den Proben der Tumorgruppe und den Proben der Kontrollgruppe.

Für vier Hox-Gene zeigten sich in der qRT-PCR im Vergleich zu den Ergebnissen der Microarrayuntersuchung gegenläufige Regulationstendenzen. Es handelt sich hierbei um Hox A2, Hox A4, Hox B6 und Hox C10.

3.3.2. Vergleich der Untersuchungsergebnisse der Expression von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion zwischen Microarrayuntersuchung, qRT-PCR und Immunhistologie

Für vier Gene der Tumor-Stroma-Interaktion wurde zusätzlich zur Microarrayuntersuchung eine qRT-PCR durchgeführt. In zwei Fällen (IL 12a (herunterreguliert) und IL 18 (hochreguliert)) konnten die Ergebnisse der Microarrayuntersuchung bestätigt werden. Im Fall von LTB und SELE zeigte sich in der qRT-PCR jeweils eine Herunterregulation der Genexpression in der Tumorgruppe während in der Microarrayuntersuchung jeweils eine Hochregulation in den Tumorproben im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert wurde.

Für sieben Gene der Tumor-Stroma-Interaktion wurde ergänzend zur Microarrayuntersuchung eine immunhistologische Untersuchung durchgeführt. Bis auf MMP1 wurden in den anderen sechs durchgeführten Immunhistologien keine semiquantitativen Auswertungen durchgeführt. Es zeigte sich jedoch jeweils tendenziell eine Bestätigung der im Microarray gewonnenen Untersuchungsergebnisse. Es ist hierbei festzuhalten, dass die im Microarray detektierten Genexpressionen lediglich bei MMP 1 und hsp 70 von den Ovarialkarzinomzellen verursacht zu sein scheinen. Für die anderen fünf untersuchten Gene (IL 8, MMP 9, Rantes, TIMP und VEGF) stammt die

detektierte Genexpression aus verschiedenen Zellen aus der Umgebung der Ovarialkarzinomzellen (siehe Tab. Ergebnis der Immunhistologie).

Für CD 24 wurden neben der Microarrayuntersuchung eine qRT-PCR und eine immunhistologische Untersuchung durchgeführt. In der qRT-PCR zeigte sich eine Bestätigung der in der Microarrayuntersuchung gewonnenen Ergebnisse. So konnte auch in der qRT-PCR eine deutliche Hochregulation von CD 24 in den Ovarialkarzinomen im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe detektiert werden. In der Immunhistologie zeigte sich ebenfalls eine deutliche Anfärbung von Ovarialkarzinomzellen mit einem Antikörper für CD 24 (siehe Tab. 3-5). Somit wurde die hochgradige CD 24 Überexpression in Ovarialkarzinomen mit drei verschiedenen Methoden kongruent belegt.

3.4. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Im Folgenden seien die Gene mit den eindeutigsten Expressionsunterschieden zwischen Tumor- und Kontrollgruppe in dieser Untersuchung kurz zusammengefasst. Zur übersichtlicheren Darstellung der Ergebnisse wurde ein modifiziertes Cluster erstellt, welches aus Ausschnitten aus dem zu Beginn des Ergebnisteiles gezeigten hierarchischen Cluster (Abb. 3-1) besteht. Der einzige Unterschied besteht darin, dass in dem oben gezeigten Cluster die Reihenfolge der Gene geclustert, also die Gene entsprechend ihrer Gleichheit in der Expression angeordnet wurden, und in dem hier dargestellten Cluster die Proben entsprechend ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression in Gruppen angeordnet wurden.

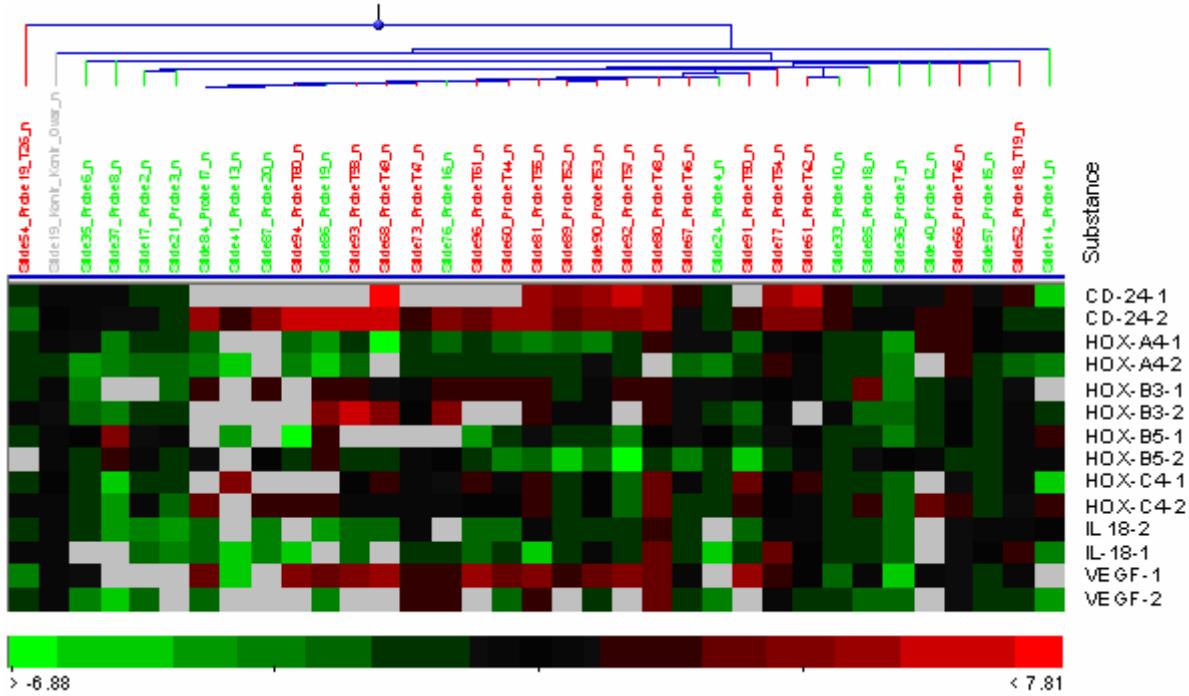


Abb. 3-11: Auf der Ordinate sind die Gene zeilenweise aufgetragen. Die Expression jedes einzelnen Genes ist als arithmetisches Mittel (Durchschnittswert) der Werte jedes einzelnen Pixels und Spots und für jede Probe farblich abgestuft dargestellt. Grüne Farbgebung bedeutet Unterexpression, rote Farbgebung Überexpression im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle. Felder mit grauer Farbgebung zeigen an, dass die Genexpression für die entsprechende Probe nicht analysiert werden konnte. Auf der Abszisse sind die Proben des Tumorkollektivs (rot) und des Kontrollkollektivs (grün) spaltenweise sowie die Kontrollhybridisierung (kommerzielle Kontrolle gg. Kommerzielle Kontrolle; grau) aufgetragen. Der Farbbalken unter dem hierarchischen Cluster zeigt die Zuordnung der Farbgebung zur entsprechenden Genexpression.

Zwar konnte keine eindeutige Diskriminierung zwischen Proben des Tumor- und Proben des Kontrollkollektives erzielt werden, aber an Hand der Farbgebung zeigen sich eindeutige Unterschiede in den Regulationstendenzen der Gene in den Proben beider Gruppen, so z.B. die CD 24-Überexpression (rot) in Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe.

Wie oben ausgeführt konnten die hier dargestellten Ergebnisse der Microarrayuntersuchung in der qRT-PCR und/oder Immunhistologie, soweit durchgeführt, bestätigt werden. Einzige Ausnahme stellt das Hox A 4 dar, für das in der qRT-PCR eine gegenläufige Regulationstendenz detektiert wurde (s.o.).

4.Diskussion

4.1 Die Genexpressionsanalyse von Ovarialkarzinomen

Genexpressionsanalysen werden mit unterschiedlichen Zielen durchgeführt. Ein Großteil der bislang publizierten Untersuchungen zu Ovarialkarzinomen zielt auf die Detektion neuer Tumormarker für diese Karzinome im Allgemeinen und für deren Subentitäten im Speziellen ab. In unserer Untersuchung wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um neue Einblicke in die Mechanismen der Tumorenstehung von Ovarialkarzinomen zu erhalten. Deswegen wurde eine Vielzahl von Hox-Genen, die nach heutigem Kenntnisstand eine entscheidende Rolle im Zellzyklus, Zellwachstum und der Zelldifferenzierung wahrnehmen, untersucht.

Die Analyse von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion wurde ergänzend durchgeführt, um die Interaktion der Ovarialkarzinomzellen mit dem umgebenden Stroma zu beleuchten und eine mögliche Beteiligung in der Karzinogenese aufzudecken. Die Ergebnisse schließen hier an publizierte Studien an, deren Ergebnisse überprüft werden sollten.

4.1.1 Kritische Betrachtung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Hox-Gene

Wie unter Punkt 1.4 schon beschrieben, sind sowohl eine Hoch- als auch eine Herunterregulation von Hox-Genen im Rahmen der Tumorentstehung und -progression denkbar (Abate-Shen et al., 2002; Grier et al., 2005). Die genaue Funktion der einzelnen Hox-Gene im Zellzyklus und Zellmetabolismus ist dabei über die jeweiligen Downstream-Target-Gene definiert. Hierbei ist die genaue Zuordnung zwischen Hox-Gen und Downstream-Gen(en) noch nicht für alle Hox-Gene bekannt.

Die Expression von Hox-Genen wurde schon an einer Reihe von Tumoren untersucht (siehe hierzu 1.4). Zur Expression in Ovarialkarzinomen liegen bisher vier, in der Methodik unterschiedliche, Studien vor (Yamashita et al., 2005; Cheng et al., 2005 und zwei Untersuchungen von Naora et al., beide 2001). Weiterhin wurden bei anderen Genexpressionsuntersuchungen mittels Microarray oder qRT-PCR die Expression von einzelnen Hox-Genen untersucht, aber die Ergebnisse nicht detailliert beschrieben (u.a. Santin et al., 2004).

4.1.1.1 Unterexpression von Hox B5 in serösen Ovarialkarzinomen

Die Genexpression von Hox B5 wurde in der vorliegenden Untersuchung mittels zwei Nukleotidsequenzen untersucht, die beide im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Herunterregulierung in den Proben der Tumorgruppe zeigten. Hierbei zeigte die Nukleotidsequenz Hox B 5(2) den signifikantesten Expressionsunterschied aller untersuchten Hox-Gene im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe. In einer Untersuchung von Santin et al (2004) wurde Hox B 5 in serösen Ovarialkarzinomen als hochreguliert identifiziert. Für diese Untersuchung wurden Zelllinien von serösen Ovarialkarzinomen (10 primäre und 2 etablierte) mit 5 Zelllinien von normalem Ovarepithel verglichen. Die deutliche Diskrepanz zu unseren Ergebnissen kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Ergebnisse von Zellkulturstudien nur mit Einschränkungen auf die in-vivo-Situation übertragen werden können.

Wu et al. (2003) schreiben Hox B 5 eine wesentliche Steuerungsfunktion für die Entwicklung von vaskulärem Endothel aus Vorläuferzellen zu. Hershko et al. (2003) weisen auf die im Vergleich zu anderen Genen unterschiedliche, gewebsspezifische Methylierung und deren Bedeutung für die Expression von Hox B 5 im Rahmen der postnatalen de novo Methylierung hin. Allerdings ist in dieser Untersuchung keine Analyse der Methylierung in Ovargewebe durchgeführt worden.

Nach der in der Einleitung erwähnten Theorie könnten sowohl eine Herunter- als auch eine Hochregulation von Hox B 5 im Rahmen der Karzinogenese möglich sein. Allerdings ist hierzu anzumerken, dass das paraloge Hox Gen Hox A 5 in 60% aller Mammakarzinome herunterreguliert ist und dies mit einer verminderten Expression des Tumorsuppressors p53 einhergeht (Raman et al., 2000). Im Rahmen der Expression paraloser Hox-Gene entlang der Körperachse könnte die Rolle des paralogen Hox Gens Hox B 5 in Ovarialkarzinomen ähnlich sein, zumal auch Hox B5 sehr ähnliche (Hershko et al., 2003) Methylierungsmuster aufweist wie Hox A 5. Auch in unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle paraloge Hox-Gruppen einheitlichere Regulationstendenzen zeigen als Gene innerhalb eines Hox-Clusters. Allerdings zeigt Hox A5 nur in einer der beiden untersuchten Nukleotidsequenzen eine Herunterregulation im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Regulation von Hox B 5 endgültig zu bestimmen, ihre Auswirkung auf Downstream-Gene zu evaluieren und die Bedeutung für die Karzinogenese von serösen Ovarialkarzinomen zu klären.

4.1.1.2 Überexpression von Hox A 4 in serösen Ovarialkarzinomen

Auch für die Expressionsanalyse von Hox A 4 wurden zwei Nukleotidsequenzen des entsprechenden Gens verwendet. Es zeigte sich für eine der beiden Nukleotidsequenzen in der Microarrayanalyse eine signifikante Überexpression in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe. In der zweiten untersuchten Nukleotidsequenz zeigte sich nur eine geringfügige, nicht signifikante Überexpression in den Proben der Tumorgruppe. In der qRT-PCR-Untersuchung fand sich eine größere Kopienanzahl in den Proben der Kontrollgruppe als in den Proben der Tumorgruppe. Somit ergeben sich für beide Untersuchungstechniken

gegensätzliche Ergebnisse. Sowohl die Tumorproben als auch die Proben der Kontrollgruppe unterlagen den gleichen äußereren Einflüssen. Bei 40-maliger Amplifikation („repeats“; siehe 2.3.1.3) in der qRT-PCR können allerdings geringe Unterschiede in der Kopienanzahl im Ausgangsmaterial bzw. kleinste Störungen in der zuvor durchgeführten Transskription und in der Ausgangs-cDNA zu stark erhöhter (falsch positiver) oder stark erniedrigter (falsch negativer) Kopienanzahl führen. Hier darf ein Unterschied in der durchschnittlichen Kopienanzahl von 1154 Kopien (Tumorgruppe durchschnittlich 157 Kopien; Kontrollgruppe durchschnittlich 1311 Kopien) nicht als signifikanter Expressionsunterschied gewertet werden, auch wenn es relativ gesehen einer 8,3-fach erhöhten Genexpression in der Kontrollgruppe entspricht. Des Weiteren ist zu bedenken, dass es sich bei den im Ergebnisteil dargestellten Werten der Microarrayanalyse um das *logarithmisierte Verhältnis* der jeweiligen Proben zur kommerziellen Kontrolle handelt, es sich also nicht um die absolute Kopienanzahl handelt. Die entsprechende Potenz zur Basis 10 stellt also das Verhältnis der absoluten Kopienanzahl in der Tumorprobe im Vergleich zur absoluten Kopienanzahl in der kommerziellen Kontrolle dar.

In einer Untersuchung von Yamashita et al. (2006) wurde eine Hochregulation von Hox A4 in einer qRT-PCR-Analyse für bestimmte Ovarialkarzinomzelllinien beobachtet. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen in der vorliegenden Microarrayanalyse überein. In weiteren Untersuchungen zur Funktion von Hox A4 konnte neben der Funktion als Transkriptionsfaktor in der Entwicklung des embryonalen Nervensystems eine biologische Bedeutung von Hox A4 für die Differenzierung von braunem und weißem Fettgewebe gezeigt werden, wobei für diese Differenzierung offenbar alle paralogen Hox 4-Gene (Hox A4, Hox B4, Hox C4 und Hox D4) relevant sind (Cantile et al., 2003).

Die Tatsache, dass das Ergebnis der Microarrayanalyse in der vorliegenden qRT-PCR-Untersuchung nicht bestätigt werden konnte, kann Hinweis darauf

sein, dass in der qRT-PCR-Validierung für Hox A4 nicht absolut kongruentes Ausgangsmaterial zur Verfügung stand.

4.1.1.3 Kritische Evaluation weiterer Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Hox-Gene

Betrachtet man die Expression der Hox-Gene in den Tumorproben ohne sie mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe zu vergleichen, d.h. wenn man nur das Ergebnis der Microarrayanalyse betrachtet, welches durch die komparative Hybridisierung gegen die kommerzielle RNA zustande kam, so ergeben sich Hinweise auf weitere Regulationstendenzen, welche in Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen diskutiert werden können.

So wurde eine verminderte Expression von Hox A10, Hox A11 und Hox A 13 festgestellt. Dies ist von Interesse, da Kobayashi et al. (2003) in einer Untersuchung an Mäusen beobachten konnten, dass alle drei genannten Gene wesentlich zur Formierung (Hox A13) und Differenzierung (Hox A 10, Hox A 11 und Hox A 13) des weiblichen Reproduktionstraktes bei Mäusen beitragen. Eine Herunterregulierung mit einer damit verbundenen Entdifferenzierung des Gewebes spricht für die in der Einleitung vorgestellte Hypothese, dass eine Herunterregulierung der Genexpression von Hox-Genen als ein wichtiger Faktor in der Karzinogenese von Ovarialkarzinomen vorstellbar ist.

Taylor et al. (1997) beschrieben, dass die Regulation von Hox-Genen im adulten weiblichen Reproduktionstrakt jeweils segmentspezifisch erfolgt (z.B. Expression von Hox A 9 im Oviduct). Darauf basierend konnten Cheng et al. (2005) nachweisen, dass die unterschiedliche Expression verschiedener Hox-Gene in Ovarialkarzinomen mit den verschiedenen Phänotypen dieser Tumoren korreliert. So zeigten seröse Ovarialkarzinome praktisch keine bzw. nur eine minimale Expression von Hox A 10 und A 11, was wiederum mit den Ergebnissen der vorliegenden Microarrayanalyse übereinstimmt. Cheng et al.

(2005) fanden allerdings eine starke Expression von Hox A 9. Dies könnte eventuell den phänotypischen Unterschied der serösen Ovarialkarzinome gegenüber anderen Ovarialkarzinomen, in denen neben Hox A9 auch Hox A10 (endometrioide Ovarialkarzinome) bzw. Hox A10 und Hox A11 (muzinöse Ovarialkarzinome) exprimiert sind, erklären. In unseren Analysen zeigte sich auch für Hox A 9 tendenziell eine verminderte Expression, was in Anbetracht der Ergebnisse von Taylor et al. (2000) für eine stark reduzierte Differenzierungsfähigkeit des Gewebes im Rahmen der Karzinogenese spricht. Letztlich ist die Frage noch nicht beantwortet, ob zum einen Hox A9 über- oder unterexprimiert ist und ob die Über- bzw. Unterexpression der Hox-Gene für den Phänotyp des Gewebes von kausaler Bedeutung ist oder ob die biologische Rolle der Expressionsänderung der Hox-Gene vielmehr in einer veränderten Regulation von Zellzyklus und Zellwachstums zu suchen ist.

Aus der Übersicht über die Expressionen in der gesamten Hox-Gengruppe lässt sich die Vermutung ableiten, dass nicht die Über- oder Unterexpression eines gesamten Hox-Clusters für seröse Ovarialkarzinome, sondern vielmehr die verminderte Expression einzelner Gruppen paraloser Hox-Gene wie Hox 9, Hox 10 und Hox 11 signifikant ist. Hier gilt es zu klären, ob paraloge Hox-Gene gleiche Effekte auf die entsprechenden Down-stream-Gene ausüben und somit gleiche Rollen bei der Steuerung von Zellzyklus und Zelldifferenzierung spielen. Ob die Expression gewebsspezifisch entsprechend der Expression in der Embryogenese wie im Fall von Hox A9, Hox A 10 und Hox A11 verändert ist, oder ob die Expressionsveränderung wie im Fall von Hox B5 ohne Korrelation zur Embryologie erfolgt, muss ebenfalls in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.1.2 Kritische Betrachtung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion müssen für jedes Gen und im Hinblick auf dessen Funktion einzeln betrachtet werden. Die deutlichsten Expressionsänderungen fanden sich in der vorliegenden Studie für CD 24 und VEGF.

4.1.2.1 Überexpression von CD 24 in serösen Ovarialkarzinomen

Von anderen Autoren wurde bereits in verschiedenen Neoplasien eine erhöhte Expression von CD 24 nachgewiesen. Eine CD 24 Überexpression hat sich zum Teil als signifikanter Prognosefaktor erwiesen (Kristiansen et al., 2004). Im Besonderen konnten Kristiansen et al. (2002) CD 24 als unabhängigen Prognosefaktor für den Verlauf von invasiven Ovarialkarzinomen darstellen. In diesem Zusammenhang kommt auch der Funktion von CD 24 als ein Ligand von P-Selectin und der damit verbundenen möglichen Rolle bei der Metastasierung eine wichtige Bedeutung zu (Sammar et al., 1994; Aigner et al., 1997).

In der vorliegenden Untersuchung konnte sowohl in der Microarray-Analyse als auch in der qRT-PCR-Untersuchung eine deutliche Überexpression von CD24 in den Tumorproben im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch in der immunhistochemischen Untersuchung konnte auf Proteinebene eine deutliche, membranständige CD 24 Expression in Ovarialkarzinomzellen festgestellt werden. Die zytoplasmatische Expression wurde hierbei nicht berücksichtigt, da CD 24 ein Zelloberflächenprotein ist und daher auch an der Zellmembran seine biologische Bedeutung und Funktion hat. Im Vergleich hierzu wurde in anderen Untersuchungen ebenfalls in allen untersuchten Ovarialkarzinomen eine membranständige Expression festgestellt,

jedoch allein für die zytoplasmatische Expression von CD 24 eine prognostische Relevanz beobachtet (Kistiansen et al., 2002; Choi et al., 2005).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen zum einen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (u.a. Le Page et al., 2004; Choi et al., 2005; Welsh et al., 2001), zeigen aber im Umkehrschluss auch die Validität der vorliegenden Untersuchung auf. Es kann also als gesichert angesehen werden, dass CD 24 in der Karzinogenese der serösen Ovarialkarzinome bedeutsam ist; der Mechanismus, der der vermehrten Expression von CD 24 zugrunde liegt, ist dabei aber noch nicht geklärt .

4.1.2.2 Überexpression von VEGF in serösen Ovarialkarzinomen

Wie in vielen anderen Tumoren ist die Rolle von VEGF auch in serösen Ovarialkarzinomen in der Regulation der Neoangiogenese zu sehen, welche für das Tumorwachstum eine obligate Voraussetzung ist. In anderen Untersuchungen wurde bis auf eine Ausnahme (Lancaster et al., 2004) eine Überexpression von VEGF in serösen Ovarialkarzinomen beobachtet (u.a. Kassim et al., 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine erhöhte Expression von VEGF in Geweben vorliegt, die von einem Ovarialkarzinom infiltriert sind (siehe 3.2.1). In der durchgeföhrten Immunhistochemie konnte aber deutlich gezeigt werden, dass die Expression von VEGF auf Proteinebene ausschließlich im Bereich des Kapillarbettes und nicht in den Tumorzellen stattfindet. Dennoch wird man der Hochregulation von VEGF bei der Entstehung der Ovarialkarzinommetastasen eine zentrale Bedeutung zuschreiben, da ja das Wachstum der Tumorzellen nur bei adäquater Gefäßneubildung möglich ist.

Weiterhin ist anzumerken, dass für eine exakte Expressionsanalyse von VEGF in den Tumorzellen eine Mikrodissektion unumgänglich ist, da schon kleinste Anteile des umgebenden Stromas die Expressionsanalyse auf Grund der starken

Expression in den Endothelzellen verfälschen würden. Eine mögliche Alternative stellen für diese Fragestellung Untersuchungen an Zellkulturen dar.

4.1.2.3 Überexpression von IL 18 in serösen Ovarialkarzinomen

Die Expression von IL 18 wurde mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Nukleotidsequenzen des entsprechenden Genlocus untersucht. Für beide Nukleotidsequenzen wurde in der Microarrayanalyse eine geringe Überexpression in den Tumorproben im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe festgestellt, wobei der Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant war. Dieses Ergebnis konnte in der qRT-PCR bestätigt werden, da auch hier keine größeren Expressionsunterschiede festgestellt wurden (durchschnittlich 13775 Kopien in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu durchschnittlich 13415 Kopien in den Proben der Kontrollgruppe). Andere Arbeitsgruppen haben eine Überexpression von IL 18 in Ovarialkarzinomen (Le Page et al., 2006) bzw. in Sera von Ovarialkarzinompatientinnen (Akahira et al., 2004) beobachtet.

Zu IL 18 wurde in der vorliegenden Arbeit wegen fehlender Verfügbarkeit entsprechender Antikörper keine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt. So konnte nicht unterschieden werden, ob die Überexpression durch eine massive Invasion von Entzündungszellen in das Tumorgewebe oder durch eine vermehrte IL18-Produktion der Karzinomzellen zu erklären ist.

Ein interessanter Nebenaspekt ist der Einfluss von IL 18 auf die Bildung des Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich für GM-CSF die signifikanteste Überexpression in den Tumorproben im Vergleich zu den Kontrollen. Hier ist ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhter IL 18 Produktion und der signifikanten Überexpression von GM-CSF zu vermuten.

4.1.2.4 Expressionen weiterer Gene der Tumor-Stroma-Interaktion in serösen Ovarialkarzinomen

Im Rahmen der Expressionsanalyse der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion sind neben GM-CSF noch MMP-1 und BPI hervorzuheben, die jeweils in einer der beiden verwendeten Nukleotidsequenzen eine signifikante Überexpression in den Proben der Tumorgruppe im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe zeigten. Dieses Ergebnis stimmt mit Mitteilungen anderer Arbeitsgruppen überein.

So wurde GM-CSF in vielen Untersuchungen zu Ovarialkarzinomen als hochreguliert beschrieben (u.a. Burke et al., 1996). Das Zytokin GM-CSF stimuliert somit nicht nur die Proliferation und Differenzierung verschiedener hämatopoetischer Vorläuferzellen.

Ebenfalls wurde MMP-1 in drei unterschiedlichen Untersuchungen zu serösen Ovarialkarzinomen als hochreguliert identifiziert (Ono et al., 2000; Shridar et al., 2001 und Marquez et al., 2005). MMP-1 verfügt über die Fähigkeit Kollagenasen der Typen I, II, III, VII und X zu spalten. MMP-1 kann durch Bindung des „tissue-inhibitor of metalloproteinases“ (TIMP) am C-terminalen Ende inhibiert werden. Behrens et al. (2001) fanden eine erhöhte Expression von MMP-1 in serösen, invasiven Ovarialkarzinomen im Vergleich zu serösen Borderline-Tumoren und führten die vermehrte Invasivität der serösen, invasiven Ovarialkarzinome auf die erhöhte katalytische Aktivität in Folge der vermehrten Expression von MMP-1 zurück.

BPI (Bactericidal-permeability increasing protein) hingegen wurde im Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen in bisherigen Untersuchungen noch nicht beschrieben. Es besitzt eine spezifische, zytotoxische Aktivität gegen Gram-negative Bakterien und vermutlich eine antiangiogenetische Wirkung (van der Schaft et al., 2002). Auch in diesem Fall wurde aufgrund des Fehlens geeigneter BPI-Antikörper nicht mittels Immunhistologie der Frage

nachgegangen, ob die Expression von den Karzinomzellen oder vom umgebenden Stroma ausgeht.

Viele weitere Gene der Tumor-Stroma-Interaktion zeigten eine absolute Differenz zwischen den Werten der Tumorgruppe und der Kontrollgruppe, die grösser als zwei ist. Allerdings sind nach Berechnung mittels des Student's T-Test diese Ergebnisse nicht signifikant bezüglich der gesamten Gruppe. Ein Grossteil dieser Faktoren gehört zu Genen, die einen proinflammatorischen Effekt besitzen. Interessanterweise sind aber auch Gene darunter, welche vor allem für ihre pulmonale Funktion bekannt sind. Für diese Gene (Serpin A, Surfactant A und Surfactant C) liegen noch keine Untersuchungen im Zusammenhang mit serösen Ovarialkarzinomen vor.

Tendenziell zeigen die Gene der Tumor-Stroma-Interaktion eine Überexpression in den Tumorproben im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe. Dies ist hauptsächlich auf die tumorassoziierte Entzündungsreaktion zurückzuführen. Einige der Gene werden aber auch direkt von den Karzinomzellen vermehrt exprimiert, z.B. CD 24. Um im Rahmen einer Microarrayanalyse über die genaue zelluläre Herkunft der überexprimierten Gene absolut zuverlässige Aussagen zu gewinnen ist eine Mikrodissektion des Probenmaterials oder, wie in der vorliegenden Untersuchung durchgeführt, eine zusätzliche immunhistochemische Analyse unerlässlich.

4.2 Diskussion der Methodik

Die Expressionsanalyse mit Hilfe von Microarrays erwies sich in vielen Bereichen als probates Mittel, um Veränderungen zellulärer Regulationsmechanismen im Zusammenhang mit der Entstehung und dem Verlauf von Erkrankungen unmittelbar auf RNA-Ebene zu verfolgen. Dabei ist die Microarraymethodik sehr gut geeignet, um mit relativ kleinen Probengrößen die Expressionsmuster vieler verschiedener Gene auf einmal zu untersuchen.

Als ergänzende Untersuchungsverfahren und zur Absicherung der Ergebnisse der Microarrayuntersuchungen verwendeten wir die qRT-PCR Methodik, um die Genexpressionen auf RNA-Ebene zu validieren, und die Immunhistochemie, um die Ergebnisse auf Proteinebene zu ergänzen und zu überprüfen.

In der folgenden Diskussion werden jene Schritte der Methodik diskutiert, welche entweder für die grundsätzliche Validität der Ergebnisse entscheidend sind oder sich maßgeblich von der Vorgehensweise anderer Untersuchungen unterscheiden.

4.2.1 Diskussion der Auswahl des Untersuchungsmaterials

4.2.1.1 Gewebeproben der Tumorgruppe und der Vergleichsgruppe

Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Tumor- und Vergleichsproben wurden wie unter 2.1 beschrieben gewonnen. Sowohl für die Proben der Tumorgruppe als auch für die Proben der Kontrollgruppe ist davon auszugehen, dass nicht eine reine Epithelzellpopulation von Tumorzellen oder Epithelzellen normaler Schleimhaut in den Proben vorlag, sondern dass immer benachbarte Stromazellen oder Endothelzellen mit enthalten waren. Die von uns gewählte Vorgehensweise der Probengewinnung stellt aber die einzige klinisch praktikable Methode dar, ohne Verwendung von Amplifikationsschritten, wie sie bei mikrodisseziertem oder zytologischem Material notwendig wären, auszukommen. Derartige zusätzliche Schritte bergen die Gefahr der artifiziellen Verfälschung der *in vivo* vorhandenen Expressionsmuster der untersuchten Gene. Wir erhielten aus allen Proben ausreichend RNA, sodass wir auf weitere Amplifikationsschritte verzichten konnten und lediglich für die Labelling-Reaktion die vorhandene mRNA transskribieren mussten.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass auch bei einer sorgfältig durchgeführten Mikrodissektion die Möglichkeit der Verunreinigung (Hergenhahn et al., 2003)

des Probenmaterials durch Stromazellen besteht und durch die anschließend durchzuführende Amplifikation eine erhebliche Verfälschung der Ergebnisse entstehen kann. Außerdem ist es im Rahmen einer Untersuchung der Expressionsveränderungen im Rahmen der Tumorentstehung, -entdifferenzierung und -progression durchaus von Vorteil auch angrenzendes Gewebe mit zu untersuchen, um Tumor – Stroma – Interaktionen zu verstehen. Die Zuordnung der jeweiligen Expressionsprofile zu bestimmten Zelltypen muss dann durch andere Untersuchungsmethoden wie der Immunhistologie erreicht werden. Zusätzlich können auf diese Weise die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen validiert und den entsprechenden Gewebskomponenten zugeordnet werden.

In der Vergangenheit wurden in anderen Studien überwiegend die Genexpressionsmuster von Ovarialkarzinomzelllinien wie z. B. OV 1063 (Hough et al., 2000) oder Sk-OV 3 (Ismail et al., 2000) analysiert. Zorn et al. (2003) konnten zeigen, dass die Verwendung von verschiedenen Zelllinienpräparationen als Kontrolle bereits einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen hat. Die Analyse von Ovarialkarzinom-zelllinien ist somit äußerst kritisch zu betrachten, da die Anzüchtung und Präparation der Zelllinien multiple Veränderungen in der Expression der untersuchten Gene nach sich zieht. Dies betrifft neben den Genen der Tumor-Stroma-Interaktion vor allem die Gene der Steuerung des Zellzyklus, des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, zu denen die in der vorliegenden Untersuchung im Mittelpunkt stehenden Hox-Gene zählen.

In der vorliegenden Untersuchung erfolgte die Gewebsasservierung direkt im Operationssaal und hochgradig standardisiert, jedoch lassen sich naturgemäß Probleme aufgrund geringer Ungenauigkeiten hinsichtlich der Entnahmelokalisation und aufgrund von Einflüssen möglicherweise bestehender anderer Erkrankungen z.B. einer Endometriose oder hormoneller Störungen und der Heterogenität des entnommenen Gewebes nicht ganz ausschließen.

Daher ist es auch für den Vergleich verschiedener Genexpressionsuntersuchungen auf der Basis von Microarrays überaus wichtig, dass vergleichbares Untersuchungsmaterial verwendet wird. Dies gilt umso mehr, wenn die Microarraytechnik für diagnostische und prognostische Aussagen verwendet wird. Hier muss die Art der Gewinnung des Ausgangsmaterials hochgradig standardisiert sein, um verlässliche und vergleichbare Aussagen treffen zu können.

4.2.1.2 Kommerzielle RNA als Kontrolle für die Hybridisierung

Da es sich bei der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Technik um eine komparative Hybridisierung handelt, stellte sich die Frage, welche RNA am besten als Kontrolle geeignet war. Die Genexpression der Kontrolle beeinflusst das Ergebnis der Microarrayuntersuchung so sehr, dass die Vergleichbarkeit einzelner Microarrayuntersuchungen allein durch die Wahl unterschiedlicher Kontrollen unmöglich werden kann (Zorn et al., 2003). Um innerhalb der durchgeführten Untersuchung möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde auf kommerzielle RNA zurückgegriffen und die Kontrollen aller Experimente aus einer einzigen Charge bestritten (total human ovary, Fa. Ambion). Dabei wurde aus den oben erwähnten Gründen ebenfalls auf zusätzliche Amplifikationsschritte verzichtet. Somit ergab sich keine Änderung der Kontrolle innerhalb der Untersuchungsreihe. Es ist allerdings zu bemerken, dass die Kontroll-RNA aufgrund von Defiziten an Informationen seitens des Herstellers über ihre Herkunft nur bruchstückhaft charakterisiert ist. Weiterhin ist die Vergleichbarkeit mit anderen Studien nur mit Einschränkungen gegeben, da dort andere Kontrollen, z. B. Bürstenabstriche des Ovarialepithels (Marquez et al., 2005), verwendet wurden.

4.2.2 Kritische Erwägungen zur Bearbeitung der Proben-mRNA bis hin zur Proben-cDNA

Die Präparation des Untersuchungsmaterials umfasste von der Gewebsentnahme über die mRNA-Extraktion bis hin zur hybridisierbaren, gelabelten Proben-cDNA mehrere kritische Teilschritte. Besonders wichtig ist hierzu anzumerken, dass mRNA eine sehr kurze Halbwertszeit hat, die unter anderem durch den raschen Abbau durch RNasen bedingt ist. Dies führt dazu, dass nur Zell- und Gewebsmaterial, welches unmittelbar nach der Entnahme aus dem Organismus konserviert wird (Schockgefrierung oder Konservierung mittels RNA-Later) für eine valide Untersuchung verwendbar ist. Besonders negativ wirkt sich auf die RNA-Menge und –Qualität die Zeit der warmen Ischämie bei ca. 37°C (Almeida et al., 2004) aus, welche auf Grund der Operationstechnik unvermeidbar ist, aber mit ca. fünf bis acht Minuten so kurz wie möglich gehalten wurde. Dies gilt für die Proben der Kontrollgruppe. Bei den Proben der Tumorgruppe war die warme Ischämiezeit wesentlich kürzer bzw. fast Null, da diese Gewebsproben direkt aus makroskopisch sichtbaren Metastasen entnommen wurden.

Die Qualität der mRNA wurde vor dem Labelling mittels Gelelektrophorese (siehe 2.2.6) überprüft, um nur gut erhaltenes Ausgangsmaterial für die Genexpressionsanalysen zu verwenden. Proben welche der Qualitätskontrolle nicht genügten, wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen, denn bei der Verwendung von teilweise degraderter RNA können Fragmente bei der späteren Hybridisierung zu falsch positiven Ergebnissen führen, indem sie sich unspezifisch an target-cDNA anlagern und zu einem Fluoreszenzsignal führen. Um diesen Fehler möglichst klein zu halten, wurde neben der optimalen Probenkonservierung zusätzlich wie unter 2.2.8. beschrieben Cot-1-DNA und Poly-A-DNA hinzugefügt, welche cDNA Fragmente degraderter mRNA vor der Hybridisierung auf dem Microarray binden können.

Jochumsen et al. (2007) konnten zeigen, dass bis zu dreimaliges Auftauen von Gewebsproben, im Speziellen von Ovarialtumoren, nicht zu signifikanten Unterschieden bei den Ergebnissen von Genexpressionsanalysen führt. Diese Anzahl an Auftauvorgängen wurde im Versuchsablauf weder für die Analyse mittels Microarray noch in der Analyse mittels qRT-PCR überschritten (siehe 2. Material und Methoden) und stellte im gesamten Versuchsablauf kein Problem dar. Natürlich wurden im weiteren Versuchsablauf auch andere wesentliche Vorsichtsmassnahmen im Umgang mit RNA berücksichtigt. So wurde z.B. das Arbeitsumfeld möglichst RNase-frei gestaltet, die Arbeitsvorgänge möglichst zügig und die Reaktionsabläufe bei optimalen Rahmenbedingungen (Temperatur etc.) durchgeführt.

Weiterhin können sich falsch positive Ergebnisse aus einer zu hohen Zahl an Amplifikationsschritten ergeben, da die hier verwendeten Enzyme sehr unspezifisch RNA bzw. cDNA amplifizieren. Dieses Risiko konnte in der vorliegenden Untersuchung wiederum minimiert werden, da aus den entnommenen Gewebsproben in allen Fällen ausreichend RNA als Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, um direkt nach der RNA-Extraktion – ohne weiteren Amplifikationsschritt – mit der Transkription der mRNA und dem Labelling der cDNA fortzufahren (siehe auch 4.2.1.1).

Trotz all dieser Vorkehrungen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sowohl zu falsch positiven als auch falsch negativen Hybridisierungsergebnissen kommt. Wie groß dieses Problem ist, lässt sich auch unter Zuhilfenahme der gängigen Literatur nur schwer abschätzen.

4.2.3. Herstellung der Microarrays unter Berücksichtigung der Validität der target-cDNA

Auf die Bereitstellung der target-cDNA ist im Vergleich zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen in der vorliegenden Untersuchung ein besonders großes

Augenmerk gelegt worden. Viele andere Arbeitsgruppen verwendeten kommerziell erworbene target-cDNA oder zumeist kommerziell erworbene Microarrays mit bereits aufgespotteter target-cDNA z. B. Affymetrix® Human Genome array (Marquez et al., 2005; Spentzos et al., 2004; Hibbs et al., 2004). Dieses Vorgehen ist zum einen zeitsparend und unkompliziert, zum anderen aber sehr teuer und vor allem hinsichtlich der target-cDNA-Sequenzen unsicher. So wiesen allein 22,2% der von uns bezogenen Klone nicht das in der RZPD-Datenbank ausgewiesene Insert auf und mehr als 50% der Nukleotidsequenzen überschritten die angegebene Sequenzlänge erheblich (>330bp). Besonders aufgrund dieser Probleme wurde in der vorliegenden Untersuchung die target-cDNA durch die eigenständig durchgeführte Klonierung und die anschliessende Sequenzkontrolle mittels selbst durchgeführter Sequenzierung und Vergleich mit der Gendatenbank UniGene sorgfältig überprüft. Klone, deren Inserts falsche Sequenzen enthielten oder auf Grund ihrer Längenabweichung nicht geeignet waren, wurden nicht verwendet. Die Sequenzen der gespotteten target-cDNA waren somit in der vorliegenden Untersuchung komplett bekannt. Die Analyseergebnisse sind daher als besonders valide und absolut sequenzspezifisch anzusehen.

Ebenso konnte auf Grund der eigenständigen Bereitstellung der target-cDNA und der eigenständigen Herstellung des Microarrays der Array nach eigenen Interessens- (z.B. Hox-Gene) und Methodikschwerpunkten (z.B. Auswahl der house-keeping-Gene, vierfache Redundanz der target-Spots) gestaltet werden. So wurde in der vorliegenden Untersuchung speziell auf die Expression bestimmter Hox-Gene und einer Auswahl an Genen der Tumor-Stroma-Interaktion fokussiert. Im Unterschied zu kommerziell erworbenen Microarrays wurde also nicht eine unübersehbar große Menge von Datenmaterial produziert, was mit der Notwendigkeit zusätzlicher Normalisierungen und erheblicher Unübersichtlichkeit einhergeht.

Die Zeitspanne der optimalen Verwendbarkeit der Microarrays beträgt bis zu drei Monaten. In der vorliegenden Untersuchung konnten alle Proben innerhalb dieser Zeitspanne untersucht werden, so dass die Vergleichbarkeit der Microarrays auf Grund der gleichen Herstellungs- (z.B. beim Spotting) und Anwendungsbedingungen gegeben war. Bei kommerziell erworbenen Slides kann ebenfalls kein Einfluss auf Herstellungsbedingungen, Auslieferungszeit etc. genommen werden. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Slides müsste durch Standardhybridisierungen und -auswertungen kontrolliert werden.

Die eigenständige Präparation der Microarray-Slides und das in Zusammenarbeit mit dem Genzentrum der LMU durchgeführte Spotting führte im Vergleich zu kommerziellen Slides zu keinerlei Qualitätseinschränkung hinsichtlich der Auswertbarkeit oder zusätzlichen Artefakten. Hierzu wurden Vergleichshybridisierungen mit einigen kommerziellen Slides durchgeführt. Allerdings ist zur Herstellung und Anwendung der eigenständig hergestellten Microarrays anzumerken, dass sowohl die Herstellungsschritte als auch die anschließende Verwendung teilweise sehr diffizil und labortechnisch sehr anspruchsvoll ist.

4.2.4 Design des Microarrays

Das Design des Microarrays (siehe auch 2.2.3) wurde primär unter dem Aspekt der Generierung möglichst verlässlicher Ergebnisse gewählt. In dieser Hinsicht wurde jedes Gen vierfach redundant gespottet. Dies trifft ebenso auf die house-keeping-Gene und die Kontrollen zu. So konnten in der Auswertung (siehe 4.2.5) einzelne Spots, die artifiziell verändert waren bzw. den Qualitätskriterien nicht entsprachen, ohne Ergebnisverlust ausgesondert werden. Diese Qualitätssicherung ist in kommerziellen Microarrays nicht vorhanden, da hier einzelne Gene meistens nur einmalig gespottet sind.

4.2.5 Auswertung der Microarrayanalyse

Die Auswertung erfolgte nach den unter 2.2.10 genannten Bestimmungen. Bei der statistischen Auswertung wurde neben dem Student's t-Test zur Herausfilterung der unterschiedlichen Expressionen in den zwei bekannten Gruppen und der Fold-Change-Analyse zur Quantifizierung des Unterschiedes der Expression das hierarchische Clustering als visuelle und mathematische Darstellung der Ergebnisse verwendet. Dieses wurde ebenfalls nach gängiger Methode mittels der Pearson-Korrelation durchgeführt. Diese Auswertungen sind allesamt Standardverfahren für Genexpressionsstudien (Santin et al., 2004; Shridhar et al., 2002 usw.).

Im Vergleich zu vielen anderen Studien z.B. Zhang et al. (2005) wurde in der vorliegenden Untersuchung darauf verzichtet, die Microarrays über die gesamte Untersuchungsgruppe zu normalisieren. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da (1.) Microarrays, die im gesamten als nicht brauchbar identifiziert wurden, von vornherein aus der Auswertung genommen wurden sowie (2.) jeder Microarray für sich normalisiert wurde und die Anzahl der analysierten Gene soweit übersichtlich war, dass artifizielle Abweichungen („Ausreißer“) ohne statistische Analyse durch den Untersucher entdeckt werden konnten. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurde jeder Spot auf jedem Microarray einzeln kontrolliert und z.B. bei Verunreinigung durch einen Staubpartikel ausgeschlossen. Gesamte Microarrays wurden z.B. ausgeschlossen sobald kein sinnvolles Clustering mehr möglich war, Spots verwischt waren oder Teile des Microarrays nicht hybridisiert waren. Kriterien welche zu einem automatischen Ausschluss eines Spots führten sind unter 2.2.10 genannt.

4.2.6 Kritische Betrachtung der Validierungsuntersuchungen und deren Vergleichbarkeit mit der Microarrayanalyse

Im Unterschied zu anderen Genexpressionsstudien wurden die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zweifach validiert. Zum einen wurden die Ergebnisse mittels qRT-PCR auf RNA-Ebene und zum anderen mittels Immunhistologie auf Proteinebene überprüft.

4.2.6.1 Die Validierung mittels qRT-PCR

Die qRT-PCR eignet sich auf Grund ihrer Eigenschaften sehr gut zur direkten, stichprobenartigen Überprüfung von Ergebnissen aus Microarrayuntersuchungen und wurde in vielen Untersuchungen verwendet (u.a. Ono et al., 2000; Welsh et al., 2001; Jazaeri et al., 2002). Allerdings können auf Grund der Methodik nicht alle Expressionsergebnisse einer Microarrayuntersuchung überprüft werden, da dies bei mehreren hundert bis tausend untersuchten Genen und einer representativen Probenanzahl ein Untersuchungsvolumen von mehreren tausend qRT-PCR-Untersuchungen implizieren würde. In der vorliegenden Untersuchung wurden fünf von 80 in der Microarrayuntersuchung untersuchten Genen mittels qRT-PCR überprüft (6,25%). Dies übertrifft den Prozentsatz an Genen, welcher in den meisten bisherigen Studien überprüft wurde (z.B. Schummer et al. (0,03%), 1999; Welsh et al. (0,05%), 2001). Dabei war in den meisten Untersuchungen die qRT-PCR die einzige Validierungsmethode.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die qRT-PCR gemäss Standardverfahren durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dabei absolut quantitativ ausgewertet, da eine relative Auswertung – hier wird in den meisten Untersuchungen die Methode von Pfaffl (2001) verwendet – auf Grund der variablen Expression der house-keeping-Gene in der Microarrayuntersuchung zu

unsicher erschien. Diese Problematik wurde teilweise bereits von Wiedemann et al. (2004) und z.B. für Beta-Actin von Schummer et al. (1999) beschrieben, von anderen Arbeitsgruppen hingegen gar nicht erwähnt (Jazaeri et al., 2002).

4.2.6.2 Die Validierung mittels Immunhistologie

Wie bereits erwähnt ist die Validierung mittels Immunhistologie ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Untersuchung. Mit der Immunhistologie konnten die in der Microarrayuntersuchung und in der qRT-PCR detektierten Genexpressionsergebnisse nicht nur auf Proteinebene bestätigt werden, sondern auch bestimmten Zellpopulationen zugeordnet werden. Letzteres ist bei Genexpressionsanalysen, welche ohne Mikrodissektion arbeiten, sehr wichtig, um die Expressionsmuster mit den Gewebsveränderungen zu korrelieren. Nur so ist es möglich, die richtigen biologischen Schlussfolgerungen zu ziehen. So konnte in der vorliegenden Untersuchung z.B. gezeigt werden, dass die vermehrte CD 24-Expression wirklich von den Ovarialkarzinomzellen stammt (siehe 4.1.2.1).

Zahlreiche andere Untersuchungen verwendeten ebenfalls die Immunhistologie als Validierungsmethode (u.a. Hibbs et al., 2004 Santin et al., 2004) oder als Primäruntersuchungsmethode (Kristiansen et al., 2002). Es wurden – wie in der vorliegenden Studie – sowohl semiquantitative, mittels eigens eingeführten Scores (Santin et al., 2004; Zhang et al., 2005), als auch deskriptive Auswertungen (Hibbs et al., 2004) angewendet.

4.3 Betrachtung des Designs der vorliegenden Untersuchung

Zusammenfassend zeichnet sich das Design der vorliegenden Untersuchung im Gegensatz zu anderen Untersuchungen durch die besonders große Zahl von Kontrollen auf verschiedenen Ebenen aus. (1.) Jede RNA-Probe wurde in der

Hybridisierung mit einer kommerziellen RNA-Kontrolle verglichen. (2.) Die Tumorgewebsproben wurden mit nicht-neoplastischen Proben einer Kontrollgruppe verglichen. Die Expressionsergebnisse wurden (3.) zum einen mittels qRT-PCR und (4.) mittels Immunhistologie validiert.

Die Kontrollen (1.) und (2.) ermöglichten nicht nur eine Auswertung und Ergebnisanalyse innerhalb der Tumorgruppe im Vergleich mit der kommerziellen Kontrolle, sondern erlaubten auch den wichtigen Vergleich mit physiologischem Gewebe. Hierdurch rückt die Bedeutung der kommerziellen Kontrolle etwas in den Hintergrund, da beide Gruppen gegen dieselbe Kontrolle verglichen wurden und somit den Expressionsunterschieden in den beiden Gruppen dieselbe Basis zugrunde liegt.

Die zweifache Validierung der Ergebnisse nicht nur auf RNA-Ebene (qRT-PCR), sondern auch auf Proteinebene (Immunhistologie) ermöglicht neben der Ergebnisbestätigung der Expressionsanalyse auch die Zuordnung zu einzelnen Zellpopulationen und eine genauere Hypothesenbildung bezüglich der vermutlichen biologischen Funktion (siehe auch 4.2.6.2).

Von einer Korrelation der Expressionsanalyse mit dem klinischen Verlauf der Ovarialkarzinompatientinnen, dem Tumorgrad und dem Staging wurde im Verlauf der vorliegenden Untersuchung Abstand genommen. Dies wäre aufgrund der relativ kleinen Fallzahl, die ausschließlich seröse high-grade Ovarialkarzinome in fortgeschrittenen Stadien umfasste, nicht sinnvoll möglich gewesen.

5. Zusammenfassung

Über die Bedeutung der Hox-Gene im Rahmen der Entstehung und Progression seröser Ovarialkarzinome ist bislang nur wenig bekannt. Da Hox-Gene nicht nur eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktoren in der Embryogenese sondern auch im adulten weiblichen Reproduktionstrakt spielen, wurde der Frage nachgegangen, wie sich die Expressionsmuster dieser Gengruppe in serösen Ovarialkarzinomen im Vergleich zu nicht-neoplastischen Gewebsproben verhalten. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Expression von 25 Hox-Genen in 18 Fällen von serösen Ovarialkarzinomen mittels einer Microarrayanalyse untersucht und mit der Hox-Expression in 16 nicht-neoplastischen Gewebsproben des weiblichen Genitaltraktes, die ebenfalls mittels Microarrayanalyse untersucht wurden, verglichen. Beide Kollektive wurden komparativ gegen eine kommerzielle cDNA-Kontrolle hybridisiert. Die Untersuchungsergebnisse wurden mittels qRT-PCR überprüft. Auf gleiche Weise wurden an demselben Probenmaterial ergänzend die Expressionsmuster von 55 Genen der Tumor-Stroma-Interaktion analysiert. Bei dieser Gruppe von Genen wurde zur Validierung zusätzlich eine Expressionsanalyse auf Proteinebene mit Hilfe einer immunhistologischen Untersuchung angeschlossen. Der verwendete Microarray war für die vorliegende Untersuchung eigenständig konzipiert, validiert und angefertigt worden. Dadurch war die Konzeption des Microarrays im besonderen Maße auf die Zielsetzung der Untersuchung abgestimmt, die Validität der Ergebnisse gesichert und der finanzielle Aufwand der Microarrayanalyse deutlich geringer als bei kommerziellen Arrays. Die Validierung auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR und auf Proteinebene mittels Immunhistologie wurde nach Standardprotokollen durchgeführt.

Das wesentliche methodische Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist die Feststellung, dass sich die Genexpressionsanalyse mit Hilfe von cDNA-Microarrays zum einen als eine sehr wertvolle und aussagekräftige Technik erwies, zum anderen aber auch sehr hohe Anforderungen an die Untersuchungsplanung und –durchführung stellt und in der vorliegenden Untersuchung eine Vielzahl von möglichen Fehlerquellen definiert werden konnten.

Zu den tumorbiologischen Ergebnissen: Für die Gruppe der untersuchten Hox-Gene wurde eine Überexpression von Hox A4 in den Tumorproben im Vergleich zu den nicht-neoplastischen Gewebsproben beobachtet, für Hox B5 fand sich eine verminderte Expression. Dieses Ergebnis konnte in der qRT-PCR für Hox B5 bestätigt werden. In der gesamten Gruppe der Hox-Gene erwiesen sich zwölf Gene im Tumorgewebe im Vergleich zu den Kontrollgewebsproben unterschiedlich exprimiert, 13 Hox-Gene waren beim Vergleich der Tumorgruppe mit der kommerziellen cDNA-Kontrolle auffällig. Die paralogen Hox-Gruppen 2, 10, 11 und 13 zeigten in ihrer Summe der Durchschnittswerte eine verminderte Expression im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle. Keines der vier untersuchten Hox-Cluster A-D wies eine gänzlich einheitliche Expressionsveränderung (Unter- oder Überexpression) verglichen mit der kommerziellen Kontrolle auf.

In der Gruppe der Gene der Tumor-Stroma-Interaktion konnte eine statistisch signifikante Überexpression für GM-CSF, BPI, CD 24, MMP1 und VEGF festgestellt werden. Beispielhaft wurde durch die vergleichende qRT-PCR Analyse das Ergebnis für CD 24 bestätigt. Für insgesamt acht Gene aus der Gruppe der Tumor-Stroma-Interaktion wurden zusätzlich immunhistologische Untersuchungen durchgeführt, die die deutliche Expression dieser Gene bestätigte. Insbesondere konnte die Überexpression von CD 24 eindeutig den Ovarialkarzinomzellen zugeordnet werden.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ergibt sich die Hypothese, dass sowohl eine Überexpression als auch eine Herabregulation von Hox-Genen zur Entstehung und Progression von Ovarialkarzinomen beiträgt. Inwiefern aber die veränderte Expression der betroffenen Hox-Gene Ursache oder Folge der neoplastischen Transformation ist und welche Auswirkungen diese Veränderungen auf „down-stream“-Gene und die Biologie der Karzinomzellen hat, wird in zukünftigen Untersuchungen weiter zu klären sein. Für die Gene der Tumor-Stroma-Interaktion ergab sich – wie erwartet – insgesamt eine erhöhte Expression im Tumorgewebe. Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die mit unterschiedlichen Methoden erbracht worden waren, konnten damit bestätigt werden. Diese gute Korrelation mit den Literaturdaten valdiert auch zusätzlich die Ergebnisse der Microarray-Befunde zu den 25 untersuchten Hox-Genen.

Neben den methodischen Erkenntnissen konnten durch die vorliegenden Untersuchungen somit neue Aspekte zur Bedeutung der Hox-Gene und von Genen der Tumor-Stroma-Interaktion beim serösen Ovarialkarzinom erarbeitet werden.

6. Literaturverzeichnis

6.1 Zeitschriften, Buchbeiträge

Abate-Shen, C.: Deregulated Homeobox Gene expression in cancer: cause or consequence?; Nature Reviews (Cancer), 2: 777-785, (2002)

Agarwal, R.; Kaye, S.: Prognostic factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture?; Annals of Oncology, 16: 4-6, (2005)

Aigner, S.; Stoegher, Z.M.; Fogel, M.; Weber, E.; Zarn, J.; Ruppert, M.; Zeller, Y.; Vestweber, D.; Stahel, R.; Sammar, M.; Altevogt, P.: CD 24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells; Blood, 89: 3385-3395, (1997)

Akahira, J.; Konno, R.; Ito, K., Okamura, K., Yaegashi, N.: Impact of serum interleukin-18 level as a prognostic indicator in patients with epithelial ovarian carcinoma; Int J Clin Oncol, 9: 42-46, (2004)

Almeida, A.; Paul, T.J.; Magdelenat, H.; Radvanyi, F.: Gene expression analysis by real -time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of tissue handling; Anal Biochem, 328: 101-108, (2004)

Bai, F.; Feng, Y.; Cheng, J.; Shi, J.; Yang, R.; Cui H.: Analysis of gene expression patterns of ovarian cancer cell lines with different metastatic potentials; Int J Gynecol Cancer, 16: 202-209, (2006)

Bapat, S.; Mali, A.; Koppikar, C.; Kurrey, N.: Stem and Progenitor-Like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer; Cancer Res, 65:3025-3029, (2005)

Barnett, G.; Friedrich, C.: Recent developments in ovarian cancer genetics; Curr. Opin Obstet Gynecol ,16: 79-85, (2004)

Bell, R.; Petticrew, M.; Sheldon, T.: The performance of screening tests for ovarian cancer: results of a systematic review; *Br J Obstet Gynecol*, 105:1136-1147, (1998)

Behrens, P.; Rothe, M.; Florin, A.; Wellmann, A.; Wernert, N.: Invasive properties of serous human epithelial ovarian tumors are related to Ets-1, MMP-1 and MMP-9 expression; *Int J Mol Med*, 8: 149-154, (2001)

Benson, G.V.; Lim, H.; Paria, B.C.; Satokata, I.; Dey, S.K.; Maas, R.L.: Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression; *Development*, 122: 2687-2696, (1996)

Boncinelli, E.: Homeobox genes and disease; *Curr Opin Genet Dev*, 7:331-337, (1997)

Borgstrom P.; Hillan, K.J.; Sriramarao, P.; Ferrara, N.: Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy; *Cancer Research*, 56: 4032-4039 (1996)

Bray, F.; Loos, A.-H.; Tognazzo, S.; La Vecchia, C.: Ovarian cancer in Europe: Cross sectional trends in incidence and mortality in 28 countries, 1953-2000; *International Journal of Cancer*, 113: 977-990, (2005)

Brazma, A.; Hingamp, P.; Quackenbush, J.; Sherlock, G.; Spellman, P.; Stoeckert, C.; Aach, J.; Ansorge, W.; Ball, C.; Causton, H.; Gaasterland, T.; Glenisson, P.; Holstege, F.; Kim, I.; Markowitz, V.; Matese, J.; Parkinson, H.; Robinson, A.; Sarkans, U.; Schulze-Kremer, S.; Stewart, J.; Taylor, R.; Vilo, J.; Vingron, M.: Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-towards standards for microarray data; *Nature Genetics*, 29: 365-371, (2001)

Bristow, R.E.; Tomacruz, R.S.; Armstrong, D.K.; Trimble, E.L.; Montz, F.J.: Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis; *J Clin Oncol.*, 20:1248-1259, (2002)

Burke, F.; Relf, M.; Negus, R.; Balkwill, F.: A cytokine profile of normal and malignant ovary; *Cytokine*, 8: 578-585, (1996)

Canis, M.; Rabischong, B.; Botchorishvilli, R.; Tamburro, S.; Wattiez, A.; Mage, G.; Pouly, J.L.; Bruhat, M.A.: Risk of spread of ovarian cancer after laparoscopic surgery; *Curr Opin Obst Gynecol.*, 13:9-14, (2001)

Cantile, M.; Procino, A.; D'Armiento, M.; Cindolo, L.; Cillo, C.: HOX gene network is involved in the transcriptional regulation of in vivo human adipogenesis; *J Cell Physiol.*, 194: 225-236, (2003)

Carè, A.; Felicetti, F.; Meccia, E.; Bottero, L.; Parenza, M.; Stoppacciaro, A.; Peschle, C.; Colombo, M.; Hox B7: A keyfactor for tumor associated angiogenic switch; *Cancer Res.*, 61: 6532-6539, (2001)

Cheng, W.; Liu, J.; Yoshida, H.; Rosen, D.; Naora, H.: Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract; *Nature Medicine*, 11:531-537, (2005)

Choi, Y.; Kim, S.; Shin, Y.; Hong, Y.; Lee, S.; Kang, S.; Ahn, G.: Cytoplasmatic CD24 expression in advanced ovarian serous borderline tumors; *Gynecologic Oncology*, 97: 379-386, (2005)

Churchill, G.: Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays; *Nature Genetics Supplement*, 32: 490-495, (2002)

Cillo, C., Barba, P.; Freschi, G.; Bucciarelli, G.; Magli, M.C.; Boncinelli, E.; Hox gene expression in normal and neoplastic human kidney; *Int. J. Cancer*, 51: 892-897, (1992)

Cillo, C.; Faiella, A.; Cantile, M.; Boncinelli, E.: Homeobox Genes and Cancer; *Experimental Cell Research*, 248: 1-9, (1999)

Cillo, C.; Faiella, A.; Cantile, M.; Boncinelli, E.: Homeobox Genes in Normal and Malignant cells; *Journal of cellular physiology*, 188:161-169, (2001)

Connolly, D. T.: Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function; *J Cell Biochem*, 47: 219-223, (1991)

Dettmar, P.; Diebold, J.; Nährig, J.; Nathrath, W.: Histologische Stadieneinteilung in Manual Maligne Ovarialtumoren; Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag, (2004)

Fleming, J.; Beaugié, C.; Haviv, I.; Chenevix-Trench, G.; Tan, O.: Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses; *Molecular and Cellular Endocrinology*, : 1-18, (2005)

Gehring, W.; Hiromi, Y.: Homeotic genes and the homeobox; *Ann Rev Genet*, 20: 147-173, (1986)

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut; *Krebs in Deutschland (kid)*; Saarbrücken: 64-67, (2006)

Golub, T.R.; Slonim, D.K.; Tamayo, P.; Huard, C.; Gaasenbeek, M.; Mesirov, J.P.; Coller, H.; Loh, M.L.; Downing, J.R.; Caligiuri, M.A.; Bloomfield, C.D.; Lander E.S.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring; *Science*, 286: 531-536, (1999)

Goodman, F.; Bacchelli, C.; Brady, A.; Brueton, L.; Fryns, J.; Mortlock, D.; Innis, J.; Holmes, L.; Donnenfeld, A.; Feingold, M.; Beemer, F.; Hennekam. R.; Scambler, P.: Novel HOX A13 mutations and phenotypic spectrum of of hand-foot-genital syndrome; *Am J Hum Genet.*, 67:197-202, (2000)

Grier, D.; Thompson, A.; Kwasniewska, A.; McGonigle, G.; Halliday, H.; Lappin, T.: The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer; *J Pathol*, 205:154-171, (2005)

Guttmacher, A.; Collins, F.: Breast and ovarian cancer; *N Engl J Med.*, 348: 2339-2347, (2003)

Hatano, M.; Roberts, C.W.; Minden, M.; Crist, W.M.; Korsmeyer, S.J.: Deregulation of a homeobox gene, HOX 11, by the t(10;14) in T cell leukemia; *Science*, 253: 79-82, (1991)

Hedge, P.; Qi, R.; Abernathy, K.; Gay, C.; Dharap, S.; Gaspard, R.; Earl-Hughes, J.; Snesrud, E.; Lee, N.; Quackenbush, J.: A concise guide to cDNA microarray analysis; *Biotechniques*, 29: 548-562, (2000)

Hergenhahn, M.; Kenzelmann, M.; Grone, H.J.: Laser-controlled microdissection of tissues opens a window of new opportunities; *Pathol Res Pract*, 199: 419-423, (2003)

Hershko, A.; Kafri, T.; Fainsod, A.; Razin, A.: Methylation of Hox A5 and Hox B5 and its relevance to expression during mouse development; *Gene*, 302:65-72, (2003)

Hibbs, K.; Skubitz, K.; Pambuccian, S.; Casey, R.; Burleson, K.; Oegema, T.; Thiele, J.; Grindle, S.; Bliss, R.; Skubitz, A.: Differential gene expression in ovarian carcinoma – Identification of potential biomarkers; *Am J Pathol*, 165:397-414, (2004)

Hough, C.; Cho, K.; Zonderman, A.; Schwartz, D.; Morin, P.: Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer; *Cancer Res.*, 61:3869-3876, (2001)

Hough, C.; Sherman-Baust, C.; Pizer, E.; Montz, F.; Im, D.; Rosenshein, N.; Cho, K.; Riggins, G.; Morin, P.: Large-Scale serial analyses of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer; *Cancer Res.*, 60:6281-6287,(2000)

Hovde, C.J.; Gray, B.H.: Characterization of a protein from normal human polymorphonuclear leukocytes with bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*; *Infect Immun.*, 54: 142-148, (1986)

Hsieh-Li, H.M.; Witte, D.; Weinstein, M.; Branford, W.; Li, H.; Small, K.; Potter, S.: Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription an function in male and female fertility; *Development*, 121: 1373-1385, (1995)

Hung, Y.; Ueda, M.; Terai, Y.; Kumagai, K.; Ueki, K.; Kanda, K.; Yamaguchi, H.; Akise, D.; Ueki, M.: Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells; *Cancer Science*, 94: 437-441, (2003)

Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO): Interdisziplinäre Leitline der deutschen Krebsgesellschaft und der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe; Maligne Ovarialtumoren (2000)

Ismail, R.; Baldwin, R.; Fang, J.; Browning, D.; Karlan, B.; Gasson, J.; Chang, D.: Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells; *Cancer Res.*, 60: 6744-6749, (2000)

Jazaeri, A.; Yee, C.; Sotiriou, C.; Brantley, K.; Boyd, J.; Liu, E.: Gene Expression Profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked and sporadic ovarian cancers; *Journal of the National Cancer Institute*, 94:990-1000, (2002)

Jochumsen, K.M.; Tan, Q.; Dahlgaard, J.; Kruse, T.; Mogensen, O.: RNA quality and gene expression analysis of ovarian tumor tissue undergoing repeated thaw-freezing; *Exp Mol Pathol.*, 82: 95-102, (2007)

Kamps, M.P.; Murre, C.; Sun, X.H.; Baltimore, D.: A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL; *Cell*, 60: 547-555, (1990)

Kassim, S.; El-Salahy, E.; Fayed, S.; Helal, S.; Helal, T.; Azzam, E.; Khalifa, A.: Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients; *Clinical Biochemistry*, 37: 363-369, (2004)

Kay, R.; Rosten, P.M.; Humphries, R.K.: CD 24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor; *J. Immunol.*, 147: 1412-1416, (1991)

Kobayashi, A.; Behringer, R.: Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals; *Nature Reviews/Genetics*, 4: 969-980, (2003)

Kosaki, K.; Kosaki, R.; Suzuki, T.; Yoshihashi, H.; Takahashi, T.; Sasaki, K.; Tomita, M.; McGinnis, W.; Matsuo, N.: Complete mutation analysis panel of the 39 human Hox genes; *Teratology*, 65: 50-62, (2002)

Kristiansen, G.; Denkert C.; Schlüns, K.; Dahl, E.; Pilarsky, C.; Hauptmann, S.: CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival; American Journal of Pathology, 161: 1215-1221, (2002)

Kristiansen, G.; Sammar, M.; Altevogt, P.: Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule; Journal of Molecular Histology, 35: 255-262, (2004)

Krumlauf, R.: Hox genes in vertebrate development; Cell, 78: 191-201, (1994)

Lancaster, J.; Dressman, H.; Whitaker, R.; Havrilesky, L.; Gray, J.; Marks, J.; Nevins, J.; Berchuck, A.: Gene expression patterns that characterize advanced stage serous ovarian cancer; J Soc Gynecol Investig, 11:51-59, (2004)

Lee, M-L.; Kuo, F.; Whitmore, G.A.; Sklar, J.: Importance of replication in microarray gene expression studies: Statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations; Proc Natl Acad Sci USA, 97: 9834-9839, (2000)

Le Page, C.; Ouellet, V.; Madore, J.; Hudson, T.; Tonin, P.; Provencher, D.; Mes-Masson, A.: From gene profiling to diagnostic markers: IL-18 and FGF-2 complement CA-125 as serum-based markers in epithelial ovarian cancer; Int. J. Cancer, 118: 1750-1758, (2006)

Le Page, C.; Ouellet, V.; Madore, J.; Ren, F.; Hudson, T.; Tonin, P.; Provencher, D.; Mes-Masson, A.: Gene expression profiling of primary cultures of ovarian epithelial cells identifies novel molecular classifiers of ovarian cancer; British Journal of Cancer, ?:1-10,(2006)

Le Page, C.; Provencher D.; Maugard, C.; Ouellet, V.; Mes-Masson, A.: Signature of a silent killer: expression profiling in epithelial ovarian cancer; Expert Rev. Mol. Diagn., 4: 157-167, (2004)

Lu, K.; Patterson, A.; Wang, L.; Marquez, R.; Atkinson, E.; Baggerly, K.; Ramoth, L.; Rosen, D.; Liu, J.; Hellstrom, I.; Smith, D.; Hartmann, L.; Fishman, D.; Berchuck, A.; Schmandt, R.; Whitaker, R.; Gershenson, D.; Mills, G.; Bast, R.: Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis; Clin Cancer Res., 10: 3291-3300, (2004)

Ma, L.; Benson, G.; Lim, H.; Dey, S.; Maas, R.: Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in müllerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES); *Developmental Biology*, 197: 141-154, (1998)

Marquez, R.; Baggerly, K.; Patterson, A.; Liu, J.; Broaddus, R.; Frumovitz, M.; Atkinson, E.; Smith, D.; Hartmann, L.; Fishman, D.; Berchuck, A.; Whitaker, R.; Gershenson, D.; Mills, G.; Bast, R.; Lu, K.: Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium and colon; *Clin Cancer Res*, 11: 6116-6126, (2005)

Mayr, D.; Diebold, J.: Grading of ovarian carcinomas; *Int J Gynecol Pathol.*, 19:348-353, (2000)

Naora, H.; Yang, Y.; Montz, F.; Seidman, J.; Kurman, R.; Roden, R.: A serologically identified tumor antigen encoded by a homeobox gene promotes growth of ovarian epithelial cells; *PNAS*, 98:4060-4065, (2001)

Naora, H.; Montz, F.; Chai, C.; Roden, R.: Aberrant expression of homeobox gene HOXA7 is associated with müllerian-like differentiation of epithelial ovarian tumors and the generation of specific autologous antibody reponse; *PNAS*, 98:15209-15214, (2001)

Ntzani, E.; Ioannidis, J.: Predictive ability of DNA microarrays for cancer outcomes and correlates: an empirical assessment; *Lancet*, 362: 1439-1444, (2003)

Okamura, H.; Tsutsui, H.; Komatsu, T.; Yutsudo, M.; Hakura, A.; Tanimoto, T.; Toriqoe, K.; Okura, T.; Nukada, Y.; Hattori, K.: Cloning of a new cytokine that induces IFN gamma production by T cells; *Nature (London)*, 378: 88-91 (1995)

Ono, K.; Tanaka, T.; Tsunoda, T.; Kitahara, O.; Kihara, Ch.; Okamoto, A.; Ochiai, K.; Takagi, T.; Nakamura, Y.: Identification by cDNA Microarray of Genes involved in Ovarian Carcinogenesis; *Cancer Research*, 60:5007-5011, (2000)

Pardal, R.; Clarke, M.; Morrison, S.: Applying the principles of stem-cell biology to cancer; *Nature Reviews*, 3:895-902, (2003)

Pfaffl, M.: Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung; BIOspektrum, 10:92-96, (2004)

Pfaffl, M: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR; Nucleic Acids Research, 29: 2002-2007, (2001)

Purdie, D.; Webb, P.; Siskind, V.; Bain, C.; Green, A.: The different etiologies of mucinous and nonmucinous epithelial ovarian cancers; Gynecologic Oncology, 88:145-148, (2003)

Raman, V.; Martensen, S.; Reisman, D.; Evron, E.; Odenwald, W.; Jaffee, E.; Marks, J.; Sukumar, S. Compromised HoxA5 function can limit p53 expression in human breast tumours; Nature, 405:974-978, (2000)

Ramaswamy, S.; Tamayo, P.; Rifkin, R.; Mukherjee, S.; Yeang, C.; Angelo, M.; Ladd, C.; Reich, M.; Latulippe, E.; Mesirov, J.; Poggio, T.; Gerald, W.; Loda, M.; Lander, E.; Golub, T.: Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures; PNAS, 98:15149-15154, (2001)

Ramaswamy, S.; Golub, T.: DNA Microarrays in clinical oncology; Journal of Clinical Oncology, 20:1932-1941, (2002)

Redline, R.; Hudock, P.; MacFee, M.; Patterson, P.: Expression of AbdB-Type homeobox genes in human tumors ; Laboratory Investigation, 71: 663-670, (1994)

Reya, T.; Morrison, S.; Clarke, M.; Weissman, I.: Stem cells, cancer and cancer stem cells; Nature, 414:105-111, (2001)

Sambrook, J.; Bowtell, D.: DNA Microarrays; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2003)

Sammar, M.; Aigner, S., Hubbe, M., Schirrmacher, V.; Schachner, M.; Vestweber, D.; Altevogt, P.: Heat-stable antigen (CD 24) as ligand for mouse P-selectin; Int. Immunol., 6: 1027-1036, (1994)

Samuel, S.; Naora, H.: Homeobox gene expression in cancer: Insights from developmental regulation and deregulation; *Eur J Cancer* 41:2428-2437, (2005)

Santin, A.; Zhan, F.; Bellone, S.; Palmieri, M.; Cane, S.; Bignotti, E., Anfossi, S.; Gokden, M.; Dunn, D.; Roman, J.; O'Brien, T.; Tian, E.; Cannon, M.; Shaughnessy, J.; Pecorelli, S.: Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium:identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy; *Int. J. Cancer*, 112:14-25, (2004)

Satokata, I.; Benson, G.; Maas, R.: Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa 10-deficient mice; *Nature* 374: 460-463, (1995)

Schelling, M.; Anthuber, C.; Rutke, S.: Früherkennung und Diagnostik in Manual Maligne Ovarialtumoren; Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag, (2004)

Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R.W.; Brown, P.O.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray; *Science*, 270: 467-470, (1995)

Schena, M.; Heller, R.; Theriault, P.; Konrad, K.; Lachenmeier, E.; Davis, R.: Microarrays:biotechnology's discovery platform for functional genomics; *Tibtech*,16:301-306, (1998)

Schmalfeldt, B. et al.: Manual Maligne Ovarialtumoren; Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag, (2004)

Schummer, M.; Ng, W.; Bumgarner, R.; Nelson, P.; Schummer, B.; Bednarski, D.; Hassell, L.; Baldwin, R.; Karlan, B.; Hood, L.: Comparative hybridization of an array of 21 500 ovarian cDNAs fort he discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas; *Gene*, 238: 375-385, (1999)

Schwartz, D.; Kardia, S.; Shedden, K.; Kuick, R.; Michailidis, G.; Taylor, J.; Misek, D.; Wu, R.; Zhai, Y.; Darrah, D.; Reed, H.; Ellenson, L.; Giordano, T.; Fearon, E.; Hanash, S.; Cho, K.: Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas; *Cancer Res.*:4722-4729,(2002)

Scott, M. P.: A rational nomenclature for vertebrate homeobox (HOX) genes; *Nucleic Acids Research*, 21:1687-1688, (1993)

Segal, M.; Friedman, N.; Koller, D.; Regev, A.: A module map showing conditional activity of expression modules in cancer; *Nature Genetics*, 36:1090-1098, (2004)

Senger, D.R.; Brown, L.F.; Claffey, K.P.; Dvorak, H.F.: Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation; *Invasion Metastasis*, 14: 385-394, (1995)

Shridhar, V.; Lee, J.; Pandita, A.; Iturria, S.; Avula, R.; Staub, J.; Morrissey, M.; Calhoun, E.; Sen, A.; Kalli, K.; Keeney, G.; Roche, P.; Cliby, W.; Lu, K.; Schmandt, R.; Mills, G.; Bast, R.; James, C.; Couch, F.; Hartmann, C.; Lillie, J.; Smith, D.: Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors; *Cancer Res*, 61: 5895-5904, (2001)

Shridhar, V.; Sen, A.; Chien, J.; Staub, J.; Avula, R.; Kovats, S.; Lee, J.; Lillie, J.; Smith, D.: Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization; *Cancer Res.*; 62:262-270,(2002)

Simon, R.; Radmacher, M.; Dobbin, K.; McShane, L.: Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification; *J Natl Cancer Inst.*, 95: 14-18, (2003)

Singer, G., Stöhr, R.; Cope, L.; Dehari, R.; Hartmann, A.; Cao, D.; Wang, T.; Kurman, R.; Shih, I.: Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis; *Am J Surg Pathol*, 29:218-224, (2005)

Spentzos, D.; Levine, D.; Ramoni, M.; Joseph, M.; Gu, X.; Boyd, J.; Libermann, T.; Cannistra, S.: Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer; *J of Clin Oncol*, 22:4700-4710, (2004)

Stauber, M.; Weyerstahl T. et al.: *Gynäkologie und Geburtshilfe*; Thieme Verlag: 279-309(2005)

Stears, R.; Martinsky, T.; Schena, M.: Trends in microarray analysis; *Nature Medicine*, 9:140-145, (2003)

Stein, S.; Fritsch, R.; Lemaire, L.; Kessel, M.: Checklist: Vertebrate homeobox genes; *Mechanisms of development*, 55: 91-108, (1996)

Taylor, H.; Bagot, C.; Kardana, A.; Olive, D.; Arici, A.: HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis; *Human Reproduction*, 14:1328-1331, (1999)

Taylor, H.; Heuvel, G.; Igarashi, P.: A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: Late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes; *Biology of Reproduction*, 57: 1338-1345, (1997)

Taylor, H.S.: The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract; *Semin Reprod Med*, 18: 81-89 (2000)

Tingulstad, S.; Skjeldestad, F.E.; Halvorsen, T.B.; Hagen, B.: Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer; *Obstet Gynecol*, 101:885-891, (2003)

Tsutsui H.; Nakanishi, K.; Matsui, K.; Higashino, K.; Okamura, H.; Miyazawa, Y.; Kaneda, K.: Interferon-gamma-inducing factor (IGIF) upregulates Fas-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones; *Journal of Immunology* 157: 3967-3973, (1996)

Van der Schaft, D.W.; Wagstaff, J.; Mayo, K.H.; Griffioen, A.W.: The antiangiogenic properties of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI); *Ann Med*, 34: 19-24 (2002)

Welsh, J.; Zarrinkar, P.; Sapiroso, S.; Kern, S.; Behling, C.; Monk, B.; Lockhart, D.; Burger, R.; Hampton, G.: Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples indentifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer; PNAS, 98:1176-1181, (2001)

Wiedemann, C.; Schulz, H.; Weber, B.: Quantitative Real-Time PCR: eine Frage der Normalisierung; BIOspektrum, 10: 1-4, (2004)

Wu, Y.; Moser, M.; Bautch, V.; Patterson, C.: HoxB5 is an upstream transcriptional switch for differentiation of the vascular endothelium from precursor cells; Molecular and Cellular Biology, 23:5680-5691, (2003)

Yamashita, T.; Tazawa, S.; Yawei, Z.; Katayama, H.; Kato, Y.; Nishiwaki, K.; Yokohama, Y.; Ishikawa, M.: Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells; Int J Oncol, 28:931-938, (2006)

Yoshimoto, T.; Okamura, H.; Tagawa, Y.I.; Iwakura, Y.; Nakanishi, K.: Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B-cells; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 94: 3948-53, (1997)

Yue, H.; Eastman, P.S.; Wang, B.; Minor, J.; Doctolero, M.; Nuttall, R.; Stack, R.; Becker, J.; Montgomery, J.; Vainer, M.; Johnston, R.: An evaluation of the performance of cDNA miroarrays for detecting changes in global mRNA expression; Nucleic Acids Res, 29: e41, (2001)

Zhang, X.; Feng, Y.; Cheng, Y.; Yao, Y.; Ye, X.; Fu, T.; Cheng, H.: Characterization of differentially expressed genes in ovarian cancer by cDNA microarrays; Int J Gynecol Cancer, 15: 50-57, (2005)

Zhao, Y.; Potter, S.: Functional comparison of the Hoxa 4, Hoxa 10 and Hoxa 11 homeoboxes; Developmental Biology, 244: 21-36, (2002)

Zorn, K.; Bonome, T.; Gangi, L.; Chandramouli, G.; Awtrey, C.; Gardner, G.; Barret, J.; Boyd, J.; Birrer, M.: Gene expression profiles of serous, endometrioid and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer; Clin Cancer Res., 11: 6422-6430, (2005)

Zorn, K.; Jazaeri, A.; Awtrey, C.; Gardner, G.; Mok, S.; Boyd, J.; Birrer, M.: Choice of normal ovarian control influences determination of differentially expressed genes in ovarian cancer profiling studies; Clin Cancer Res., 9:4811-4818, (2003)

6.2 Internet

Robert-Koch Institut:

www.rki.de

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.:

www.gekid.de

Stanford University:

www.cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/index.html

Arbeitsgruppe Ovarialkarzinome:

www.ago-ovar.de

Weitere verwendete Internetadressen:

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank

wwwCOPE.org

www.pubmed.com

www.sciencegateway.org

www.primer3.sourceforge.net

7. Reagenzien und Gerätschaften

7.1 Verwendete Reagenzien

1. Mehrfach verwendete Reagenzien und Puffer:

Natrium-Chlorid	Fa. AppliChem
Natrium-Citrat	Fa. AppliChem
Ethanol (95%)	Fa. AppliChem
Aqua für Fluoreszenzanwendungen	Fa. AppliChem
Borsäure	Fa. AppliChem
EDTA	Fa. Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Fa. Sigma-Aldrich
Diethylpyrocarbonat(DEPC)	Fa. Sigma-Aldrich
SDS (Sodium duodecyl-sulfat)	Fa. Sigma-Aldrich
HCl	Fa. Merck
20 x SSC ; pH= 8,0, (wurde auch als Vorlage für alle Verdünnungsstufen verwendet)	175,3 g NaCl 88,2 g Na- Citrat

in 1000ml DEPC- Aqua bidest

10% SDS; pH= 8,0 (wurde auch als Vorlage für alle Verdünnungsstufen verwendet)	100g Sodium duodecyl-sulfat in 1000ml DEPC- Aqua bidest
---	--

0,5 M EDTA ; pH= 8,0	186,12 g Na-2-EDTA in 1000ml Aqua bidest
----------------------	---

1,0 M TRIS-Hcl; pH= 7,5	121,14 g TRIS in 1000ml Aqua bidest; Titration mit Hcl
-------------------------	--

2. Herstellung der Target-cDNA:

Luria-Betani-Agar:	10g Trypton, Yeast 5g Extrakt, 5g NaCl, 50 µg/ml Ampicillin (pH 7,2)	
Bakterienklone		RZPD
Betain		Fa. Sigma-Aldrich
Cot-1-DNA		Fa. Roche

3. Beschichtung der Objektträger:

Objektträger		Fa. Menzel Gläser
Poly-L-Lysin - Lösung		Fa. Sigma-Aldrich
PBS	8,1g Natriumchlorid	
	0,862g di-Na-hydrogenphosphat-Dihydrat	
	0,248g Kaliumhydrogenphosphat	

in 1000ml Aqua bidest
(Apotheke des Klinikums Innenstadt der LMU)

4. Blocking der Microarrays:

1- Methyl- 2- Pyrrolidione		Fa. Sigma-Aldrich
Bernsteinsäureanhydrid		Fa. Sigma-Aldrich
1 M Sodiumborat		Fa. AppliChem

5. RNA-Konservierung/ RNA-Extraktion:

RNA-Later		Fa. Quiagen
„SV RNA Total isolation system“-Kit		Fa. Promega
Trizol		Fa. Invitrogen
Chloroform		Fa. AppliChem
Isopropanol		Fa. AppliChem
Spin column assembly		Fa. Corning
RNase-Zap		Fa. Sigma
RNA Molecular Weight Marker II (1,5-6,9kb)		Fa. Roche

6. Labelling der a-RNA:

kommerzielle RNA „total human ovary“	Fa. Ambion
Random Primers (random hexamers)	Fa. Promega
Reaktionsgefäß (silanisiert)	Fa. Corning
Deoxy-Nukleotid-Triphosphat (dNTP) (PCR-Grade-Nucleotides)	Fa. Roche
Ribonuclease Inhibitor RNAsin	Fa. Promega
Deoxy-Thymidin-Triphosphat	Fa. Promega
Kit „Superscript II“ (1,4-dithio-DL-threitol, RNase H und Reverse Transkriptase)	Fa. Invitrogen
FluoroLinkTM Cy3-dUTP	Fa. Amersham Biosciences
FluoroLinkTM Cy5-dUTP	Fa. Amersham Biosciences
MicroSpinTM G-50 Columns	Fa. Amersham Biosciences
Kommmerzielle RNA: Total human ovary	Fa. Ambion
Microspinsäule Sephadex G 50	Fa. Corning

7. Gelelektrophorese

Fertiggel	Fa. Invitrogen
10xMOPS:	0,4M 3-(N-Morpholino) propansulfonsäure, 0,1M Natriumacetat, 10mM EDTA (pH=8,0); ad 1000ml A.bidest; 10M NaOH zur Einstellung des pH auf 7,0
RNA Molecular Weight Marker II (1,5-6,9kb)	Fa. Roche
10xTBE-Puffer:	108g TRIS, 55g Borsäure, 40ml 0,5M EDTA, ad 1000ml A.bidest (pH 8,0)
SYBR-Gold-Farbstoff	Fa. Invitrogen

8. Hybridisierung

LifterSlip Slides	Fa. Erie Scientific
Formamid	Fa. Merck
Poly-A-DNA	Fa. Roche
Cot-1-DNA	Fa. Roche

9. qRT-PCR:

5 fach iScript Reaction Mix	Fa. Bio-Rad
iScript Reverse Transcriptase	Fa. Bio-Rad
Nuclease freies Wasser	Fa. Bio-Rad
qRT-Primer (Konzentration 100µM)	Fa. Metabion
Sonde HS 00231127_m1 (Hox B 3)	Fa. Applied Biosystems
Sonde HS 00197189_m1 (Hox B 13)	Fa. Applied Biosystems
Sonde HS 00155517_m1 (IL 18)	Fa. Applied Biosystems
SYBR-Green	Fa. Invitrogen

10. Immunhistologie:

CD 24 Antikörper (Best. Nr. 103-0697-1)	Fa. Zytomed-Systems
VEGF Antikörper (Best. Nr. M7273)	Fa. Dako
MMP-1 Antikörper (Best. Nr. IM 35 L)	Fa. Calbiochem
MMP-9 Antikörper (Best. Nr. VP-M 644)	Fa. Vector (Vertrieb: Linaris)
TIMP-1 Antikörper (Best. Nr. BP 858)	Fa. Acris
RANTES Antikörper (Best. Nr. CTS 11559)	Fa. Natu Tec
IL-8 Antikörper (Best. Nr. L 156 M)	Fa. Zytomed-Systems
TNF-α Antikörper	
Hsp-70 Antikörper (Best Nr. NCN-hsp 70)	Fa. Novocastra
Ig M/ SS: Strept-ABC/hrp (Best. Nr. K 0377)	Fa. Dako
Sekundär Antikörper (Best. Nr. E 0465)	Fa. Dako
Hematoxylin (Gill's Formula)	
(Best. Nr. H 3401)	Fa. Vector
Amino-Ethyl-Carbazole (AEC (red) single solution)	
(Kat. Nr. 00-1122)	Fa. Zytomed-Systems
H2O2	Fa. Sigma-Aldrich
Xylol	Fa. Sigma-Aldrich
Kaiser's Glyceraldehyde	Fa. Merck
TRS 6, TRS 9	Fa. Dako
Vectastatin	Fa. Vector
AB-Komplex	Fa. Vector

Enhancer	Fa. Linaris
Protaqs IV	Fa. Quartett
LSAB, Ig M / SS	Fa. Dako
ABC Kit Universal	Fa. Vector

7.2. Verwendete Gerätschaften

Sequenzierer: 3130 Genetic Analyzer	Fa. Applie Biosystems/Hitachi
Microarrayer: OmniGrid Accent	Fa. Gene Machines
Spectrolinker	Fa. Spectronics
Elktrophorese: E 835	Fa. Consort
Speedvac (Concentrator 5301)	Fa. Eppendorf
Hydratationskammer	Fa. Sigma
Hybridisierungssystem HC4-S2	Fa. Quantifoil-Instruments
Scanner: Axon 4000B mit Verwendung der Software GenePix® Pro 6.0 und Acuity® 4.0	Fa. Axon Instruments (jetzt Molecular Devices Corporation)
Zentrifugen: centrifuge 5417 R, 5417 C und 5810 R	Fa. Eppendorf
Heraeus Megafuge 1.0 R	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
PGM Cycler (Master cycler gradient)	Fa. Eppendorf
iCycler (IQ Multicolor Real-Time Detection System)	Fa. BioRad
Photometer "GeneQuant pro"	Fa. Pharmacia (jetzt Pfizer)
Lichtmikroskop: Leitz Labor Lux S	Fa. Leica Microsystems
Fotomikroskop: Zeiss Axioplan 2 mit Zeiss AxioCam HRc	Fa. Carl Zeiss

7.3 Firmenanschriften

Acris Antibodies GmbH
Im Himmelreich 11
D-32120 Hiddenhausen

Ambion (Europe) Ltd
Spitfire Close
Huntingdon, Cambridgeshire

PE 29 6XY

United Kingdom

Amersham Biosciences Europe GmbH

Munzinger Str. 9

D-79111 Freiburg

AppliChem GmbH

Ottoweg 4

D-64291 Darmstadt

Applied Biosystems

850 Lincoln Centre Drive

Foster City, CA 94404

USA

Bio-Rad Laboratories

2000 Alfred Nobel Drive

Hercules, CA 94547

USA

Calbiochem/ Merck Biosciences GmbH

Ob der Röth 4

D-65824 Schwalbach

Carl Zeiss Jena GmbH

Carl-Zeiss-Promenade 10

07745 Jena

Consort nv

Parklaan 36

B-3600 Turnhout

Belgien

Corning Incorporated
One Riverfront Plaza
Corning, NY 14831
USA

DAKO Cytomation GmbH
Hamburger Strasse 181
D-22083 Hamburg

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Peter-Henlein-Str. 2
50389 Wesseling-Berzdorf

Erie Scientific Company
20 Post Road
Portsmouth
NH 03801
USA

Gene Machines
935 Washington Street
San Carlos
CA 94070
USA

Invitrogen GmbH
Technologiepark Karlsruhe
Emmy-Noether Strasse 10
D-76131 Karlsruhe

Gerhard Menzel
Glasbearbeitungswerk GmbH& Co.KG
Saarbrückenerstr. 248
D-38116 Braunschweig

Leica Microsystems GmbH
Ernst-Leitz-Strasse 17-37
35578 Wetzlar

Linaris Biologische Produkte GmbH
Hotelstrasse 11
D-97877 Wertheim-Bettingen

Merck Biosciences GmbH
Ob der Röth 4
D-65824 Schwalbach

Metabion GmbH
Lena-Christ-Str. 44
82152 Martinsried

Molecular Devices Corporation
1311 Orleans Drive
Sunnyvale
CA 94089-1136
USA

Natu Tec GmbH
Forschungs- und Laborsysteme
Königslacherstrasse 15-21
60528 Frankfurt

Novocastra
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne
NE 12 8 EW
United Kingdom

Pfizer Healthcare

88 McNabb Street

Markham

Ontario L3R 5L2

Canada

Promega GmbH

Schildkrötstr. 15

D-68199 Mannheim

Quartett Immundiagnostika und

Biotechnologie GmbH

Schichauweg 16

12307 Berlin

Quantifoil Instruments GmbH

Bio Instrumentation Center Jena

Winzerlaer Strasse 2

D-07745 Jena

Roche Diagnostics GmbH

Roche Applied Science

Sandhofer Strasse 116

D-68305 Mannheim

Ressourcenzentrum für

Genomforschung GmbH (RZPD)

Heubnerweg 6

D-14059 Berlin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Eschenstr. 5

D-82024 Taufkirchen

Spectronics Corporation
956 Brush Hollow Road
Wesrbury
NY 11590
USA

Vector Laboratories Inc.
30 Ingold Road, Burlingame
CA 94010
USA

Zytomed-Systems
Anhaltinerstrasse 27
D-14163 Berlin

8. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Löhrs und Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Diebold, der mir diese Arbeit überliess, durch zahlreiche Ratschläge und Überlegungen zum Gelingen beitrag und jederzeit hilfsbereit und freundlich für Fragen zur Verfügung stand.

Ein sehr grosses Dankeschön möchte ich der medizinisch-technischen Assistentin Frau Beate Luthardt aussprechen, die mit großem Rat und Tat vor allem der praktischen Durchführung der Untersuchung beistand. Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der LMU München, die an der Durchführung dieser Arbeit beteiligt waren, insbesondere Frau PD Dr. Iris Bittmann, ohne deren Einsatz die Etablierung der Microarray-Technik nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Alexander Burges bedanken, der die Kooperation mit der Universitäts-Frauenklinik der LMU München (Standort Grosshadern; Direktor Prof. Dr. K. Friese) ermöglichte und die Probenentnahme leitete.

Herrn Dr. H. Blum, Genzentrum der LMU München (Direktor Prof. Dr. P. Cramer), möchte ich für seine Leistungen und seinen Rat bei der Herstellung der Microarrays danken.

9.Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Christian Günther Pfeifer

geboren am 04.02.1981

in Rosenheim

ledig

Schulbildung:

1987-1991 Besuch der Grundschule in Ruhpolding

1991-2000 Besuch des Chiemgau-Gymnasiums in Traunstein

Juni 2000 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

(Leistungskurse Biologie und Mathematik)

Wehrdienst:

Juli 2000-April 2001 Allgemeiner Wehrdienst

Krankenpflegedienst:

Mai 2001-Juli 2001 Krankenhaus Vinzentinum Ruhpolding

Studium:

Oktober 2001 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München

September 2003: 1. Ärztliche Prüfung

Praktisches Jahr August 2006-Juli 2007

1. Tertial : Chirurgie (Allgemein- und Unfallchirurgie) am Regionalspital Oberwallis (Schweiz)
2. Tertial : Innere Medizin am Regionalkrankenhaus Bozen (Italien)
3. Tertial : Anästhesie am Kreiskrankenhaus Traunstein

November 2007: 2. Ärztliche Prüfung

Famulaturen:

2004 : Traumatologie/Chirurgie am Pretoria Academic Hospital (Südafrika)

2004 : Praxisfamulatur Allgemeinmedizin und Orthopädie

2005 : Radiologie am Klinikum der Universität München (LMU) Innenstadt

2006 : Unfallchirurgie an der berufsgenossenschaftlichen
Unfallklinik in Murnau

Promotion:

Experimentelle Doktorarbeit zum Thema „Genexpressionsanalyse von HOX-Genen und Genen der Tumor-Stroma-Interaktion an humanen, serösen Ovarialkarzinomen“ am Pathologischen Institut der LMU München bei Prof. Diebold

Publikationen:

„Gene Expression Analysis of Serous Ovarian Carcinoma Using an In-house Customized cDNA-Microarray“; Pathol. Res. Pract. 202(2006)4; p. 227 (Abstract)

Vorstellung der Dissertationsarbeit auf der 90. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie in Berlin (4/2006)