

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Frieze

**Die Expression von Metastasen-assoziierten Genen beim
Ovarialkarzinom**

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

vorgelegt von

Christine Julia Dannenmann

aus

Albstadt-Ebingen

2011

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München.

Berichterstatter: Prof. Dr. rer.nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dolores J. Schendel
Prof. Dr. Werner Meier

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ansgar Brüning

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2011

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
2	<i>Einleitung</i>	<i>1</i>
	<i>2.1 Das Ovar</i>	<i>1</i>
	2.1.1 <i>Die Entwicklung</i>	<i>1</i>
	2.1.2 <i>Form, Lage, Gliederung</i>	<i>2</i>
	2.1.3 <i>Physiologie</i>	<i>3</i>
	<i>2.2 Ovarialtumor</i>	<i>6</i>
	2.2.1 <i>Epidemiologie</i>	<i>7</i>
	2.2.2 <i>Ätiologie und Risikofaktoren</i>	<i>8</i>
	2.2.3 <i>Früherkennung und Diagnostik</i>	<i>10</i>
	2.2.4 <i>Relative Häufigkeit der Ovar-Neoplasien</i>	<i>11</i>
	2.2.5 <i>Histopathologische Klassifikation und Stadieneinteilung</i>	<i>15</i>
	2.2.6 <i>Therapie</i>	<i>18</i>
	<i>2.3 MTA1/ MTA2/ MTA3/ ERα/ ERβ/ E-cadherin</i>	<i>18</i>
	<i>2.4 Zielsetzung</i>	<i>27</i>
3	<i>Material und Methoden</i>	<i>28</i>
	<i>3.1 Material</i>	<i>28</i>
	<i>3.2 Methoden</i>	<i>31</i>
	3.2.1 <i>Patientinnenkollektiv</i>	<i>31</i>
	3.2.2 <i>Verarbeitung der Gewebeproben</i>	<i>31</i>
	3.2.2.1 <i>Einbettung in Paraffin</i>	<i>31</i>
	3.2.2.2 <i>Immunhistochemische Aufarbeitung</i>	<i>32</i>
	3.2.3 <i>Kontrollen</i>	<i>35</i>
	3.2.4 <i>Auswertung</i>	<i>36</i>
	3.2.5 <i>Nachweis von MTA1/ MTA2/ MTA3 mittels Immunfluoreszenz</i>	<i>37</i>
	3.2.6 <i>Statistik</i>	<i>38</i>

4	<i>Ergebnisse</i>	39
	4.1 <i>Immunhistochemische Analyse</i>	39
	4.2 <i>Diagrammauswertungen</i>	44
	4.3 <i>Korrelationen</i>	47
	4.4 <i>Ergänzende Experimente</i>	48
	4.5 <i>Immunfluoreszenz</i>	50
5	<i>Diskussion</i>	52
6	<i>Zusammenfassung</i>	57
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	58
8	<i>Danksagung</i>	71
9	<i>Lebenslauf</i>	72

2 Einleitung

Das Ovarialkarzinom stellt vor allem für europäische und nordamerikanische Frauen eine relativ häufig auftretende Krebserkrankung dar. Auf Grund mangelnder Frühsymptomatik wird diese Erkrankung in vielen Fällen zu spät erkannt und ist somit leider ein oftmals letal endender Prozess.

Bei der Progression des Ovarialkarzinoms scheinen die unterschiedlichsten Zellvorgänge und verschiedene Risikofaktoren eine Rolle zu spielen. Diese hängen zum Teil auch mit der speziellen Struktur, Funktion sowie Entwicklung des Ovars zusammen, welche deshalb im Folgenden dargestellt werden sollen.

2.1 Das Ovar

2.1.1 Die Entwicklung

In der vierten Entwicklungswoche erfolgt geschlechterunabhängig das „indifferente Stadium“. Dabei verdickt sich zunächst die Keimleiste (Crista gonadalis) und Epithel, welches in die Tiefe wächst, bildet in der Keimleiste Keimstränge (Chordae sexuales). In der Dottersackwand entstehen Urkeimzellen, die in der sechsten Entwicklungswoche in die Keimstränge einwandern. Die weitere Entwicklung erfolgt je nach Geschlecht der Urkeimzelle verschieden.

Die Keimstränge lösen sich im Mark auf und in den Rindensträngen beginnen die weiblichen Urkeimzellen (Oogonien oder Oyogonien) sich lebhaft zu teilen. Einige Millionen Eizellen entstehen im Laufe der Fetalzeit wovon aber ständig viele absterben.

Nach der Geburt vermehren sich die weiblichen Keimzellen nicht mehr, so dass bei Eintritt der Monatsblutung (Menarche) noch etwa 200 000- 400 000 in jedem Ovarium übrig sind.

Die Zellen der Keimstränge werden zu Follikelzellen, das Mesenchym verdichtet sich zur bindegewebigen Hülle um das Ovarium und das Epithel der Keimleisten wird zum Peritonealüberzug.

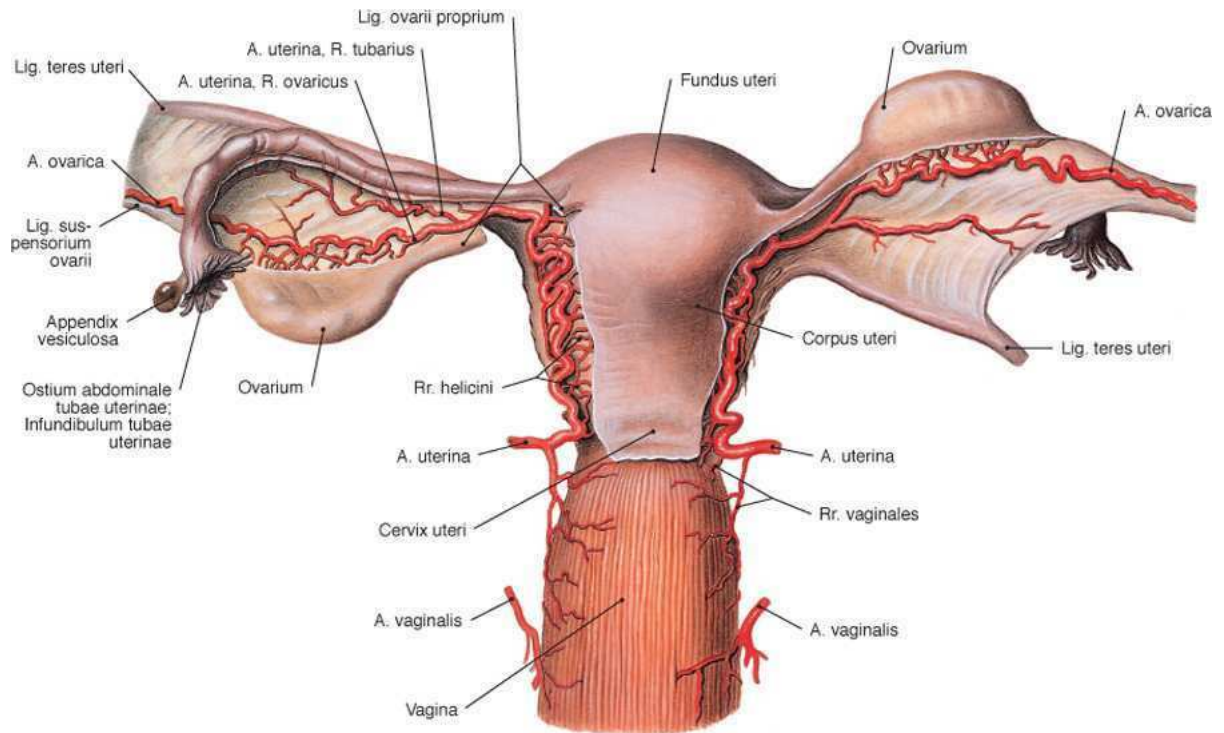
Die erste Reifeteilung der Eizelle beginnt schon gegen Ende der Embryonalperiode, wird bei Geburt jedoch unterbrochen und erst bei der geschlechtsreifen Frau fortgesetzt.

Der Abstieg des Ovars führt nur bis ins kleine Becken. Das für den Abstieg verantwortliche Leitband differenziert sich dabei zum Ligamentum ovarii proprium (zwischen Ovarium und

Uterus) und dem Ligamentum teres uteri (vom Uterus durch den Leistenkanal in die großen Schamlippen).

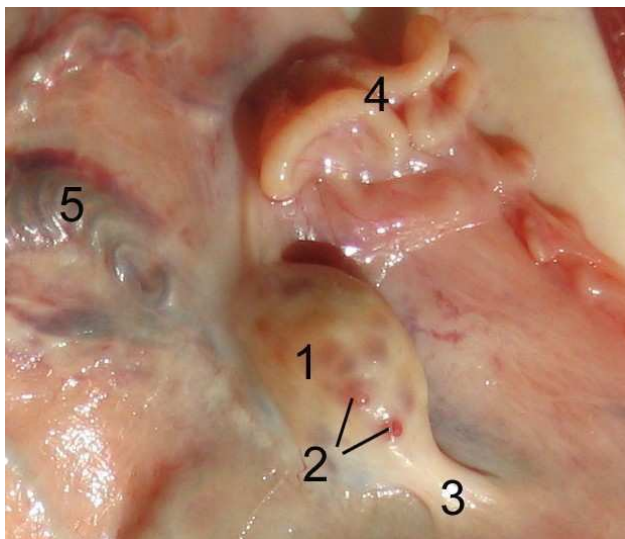
2.1.2 Form, Lage, Gliederung

Abb.1



Kiechle, Gynäkologie und Geburtshilfe © Elsevier GmbH. www.studentconsult.de

Abb.2



Beispiel: Schafsovar (wikipedia.de) 1: Eierstock, 2: Tertiärfollikel, 3: Ligamentum ovarii proprium, 4: Eileiter, 5: Arteria und Vena ovarica im Mesovarium

Das Ovar ist die weibliche Keimdrüse. Es wird beschrieben, es habe in etwa die Form einer Dörrpflaume und misst bei der geschlechtsreifen Frau um die 4 x 2 x 1 cm. Nach den Wechseljahren, also dem Ende der Eireifung (Menopause) bildet es sich wieder zurück und ist bei der postmenopausalen Frau oft nur noch mandelgroß.

Das Ovar liegt intraperitoneal in der Eierstockgrube der sogenannten Fossa ovarica. Der hintere obere Pol des Eierstocks wird vom Fransenrichter der Tuba uterina (Eileiter; s.Abb.1 und 5) bedeckt, der vordere untere Pol zeigt auf den Uterus. Desweiteren grenzt das Ovarium an Darmschlingen, an Arteria und Vena obturatoria sowie an den Nervus oturatorius. Das Aufhängeband des Ovariums, das Ligamentum suspensorium ovarii, welches vom hinteren Pol zur Beckenwand zieht, enthält Arteria und Vena ovarica, Lymphbahnen und Nerven. Das Gebärmutter-Eierstockband, das Ligamentum ovarii proprium (s. Abb.1), verbindet den vorderen Pol mit dem Uterus. Es enthält unter anderem einen Ast der Arteria uterina. Das Mesovarium, eine Peritonealduplikatur, verbindet das Ovarium mit dem Ligamentum latum uteri und gibt damit dem Eierstock eine begrenzte Beweglichkeit.

Das Ovarium lässt sich in vier Schichten einteilen. Der Peritonealüberzug, der aus Epithelzellen der Keimleiste besteht, die Tunica albuginea, die die bindegewebige Kapsel darstellt, dem Cortex ovarii (Eierstockrinde) mit Ovarialfollikeln und die Medulla ovarii (Eierstockmark) mit lockerem Bindegewebe, Nerven, Blut- und Lymphgefäße.

2.1.3 Physiologie

Ovarialfollikel und Ovulation

Zur Reifung muss der diploide Chromosomensatz der Ovozyte halbiert werden, um nach der Befruchtung wieder den normalen Chromosomensatz zu erhalten. Die primäre Ovozyte schnürt dabei seine überschüssigen Chromosomen als kleine Polzelle ab. Damit liegt nur eine reife Eizelle vor, die das gesamte Zellplasma erhalten hat: der Ovocytus secundarius.

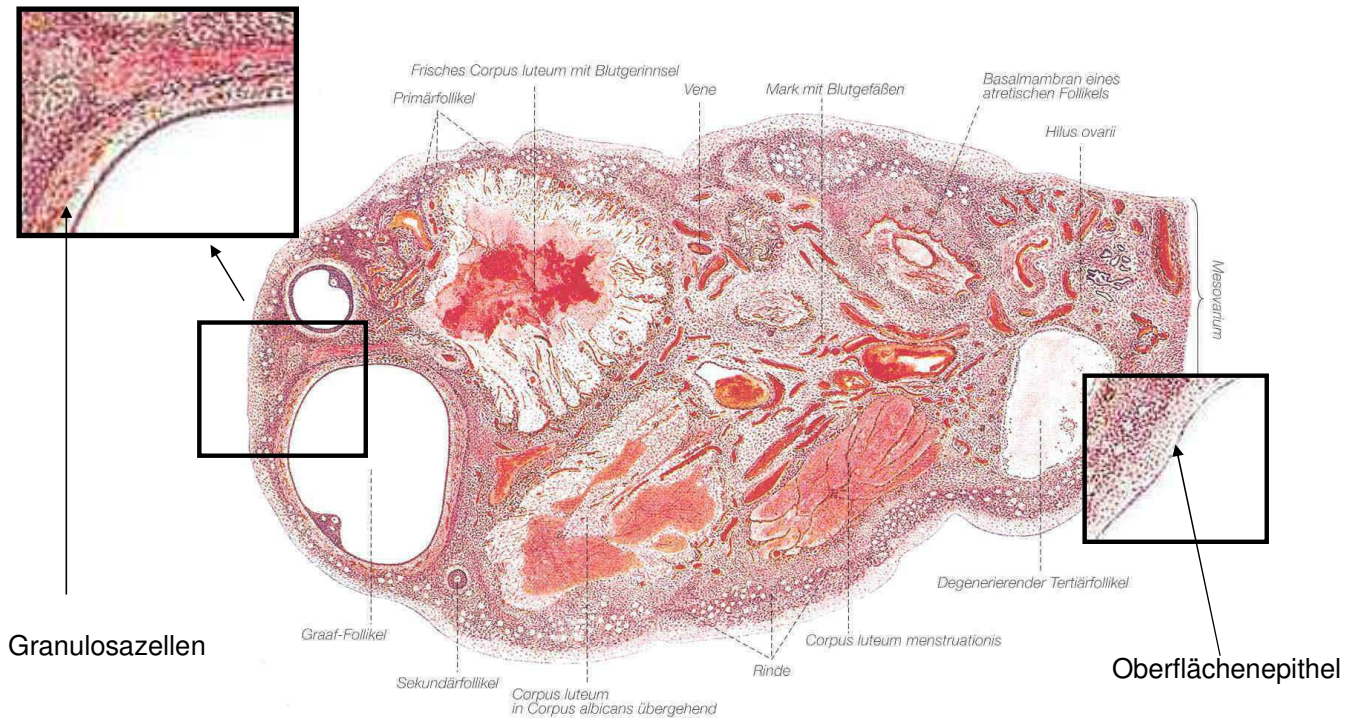
Die Eizellen sind von Follikelzellen umhüllt und bilden zusammen den Ovarialfollikel.

Die Follikelzellen verändern sich mit der Reifung der Eizellen.

Dabei gibt es vier Stadien der Follikelreifung:

- Primordialfollikel (von einer Schicht flacher Follikelzellen umgeben)
- Primärfollikel (eine Schicht kubischer Follikelzellen) (s.Abb.4, S.5)
- Sekundärfollikel (mehrere Follikelzellschichten) (s.Abb.4, S.5)
- Tertiärfollikel (flüssigkeitsgefüllter Hohlraum von 3-5 mm Durchmesser); den reifen Follikel nennt man auch Graaf-Follikel (s.Abb.4, S.5)

Abb.3



Der reife Ovarialfollikel besteht aus dem Eihügel mit Oozyt, Zona pellucida und Coronaria radiata (Follikelzellen um die Eizelle), dem Follikelepithel (Stratum granulosum = Granulosaschicht) (s.Abb.3, S.4) und der Theca (bindegewebige Hülle) mit Theca interna und Theca externa. Die Theca interna, also die Innenschicht ist zell- und gefäßreich und ernährt somit den Follikel. Die Theca externa, die Außenschicht, schützt als faserreiches, mechanisch beanspruchtes Hüllgewebe den Follikel.

Ovulation

Der reife Follikel löst sich durch zunehmenden Druck in der Follikelhöhle (durch steigende Sekretion von Follikelflüssigkeit) von der Follikelwand ab. Gleichzeitig reißt die Follikelwand an der Oberfläche des Ovars ein und Eizelle und Hüllzelle werden mitsamt der Follikelflüssigkeit in die Peritonealhöhle ausgespült.

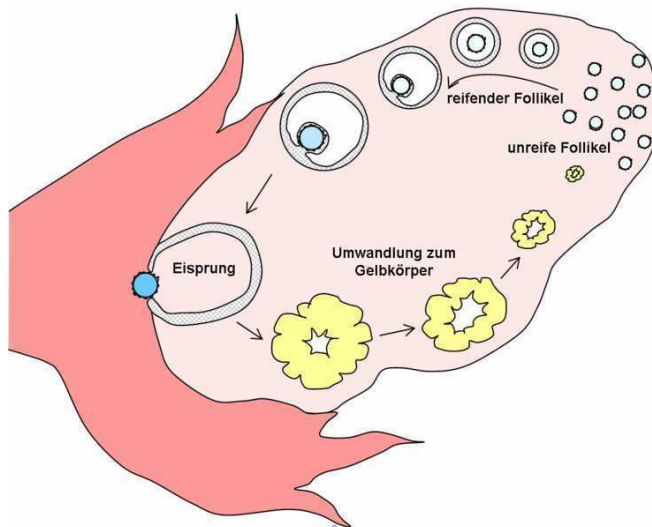


Abb.4

Hier werden sie vom Fransenstrich der Tuba uterina (s.Abb.4, S.5 und Abb.1, S.2) aufgenommen und mit Hilfe der Endosalpinx (Mukosa der Tube) weiter in Richtung Uterus transportiert (Endosalpinx, s.Abb.5, S.6). Die Endosalpinx- oder Tunica mucosa tubae,- soll an dieser Stelle schon einmal erwähnt werden, da wir die Expression von MTA Proteinen u. a. auch an diesem, direkt dem Ovar anliegenden Gewebe, mituntersucht haben, und dort eine starke Expression dieser Proteine fanden.

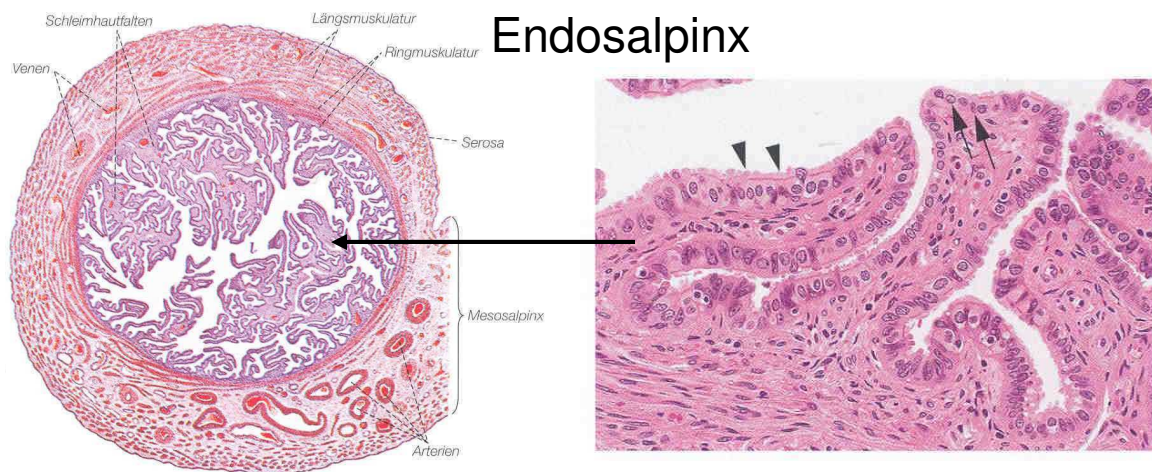


Abb.5

Hormone im Ovarialzyklus

Durch unsere Vergleichsstudien am gesunden Ovar fiel uns auch eine besondere MTA Expression bei den Granulosazellen auf, deren Lage, Struktur und Funktion hier darum kurz erwähnt werden soll.

Neben der Aufgabe der Vermehrung und Reifung stellt das Ovarium auch eine endokrine Drüse dar.

Die Thecazellen produzieren in der ersten Zyklushälfte Androgene, die von den Granulosazellen aufgenommen und in Östrogene umgebaut werden. Dies geschieht unter dem Einfluß von Follitropin, einem Hormon der Adenohypophyse. Um die benötigte Hormonmenge zu gewährleisten wachsen jeweils 20 Follikel bis zum Tertiärfollikel heran, wovon im Normfall nur einer bis zum Eisprung gelangt und die andern sich wieder zurückbilden.

In der zweiten Zyklushälfte, also nach dem Eisprung, vergrößern sich die Theca- und Granulosazellen und werden nun als Luteinzellen, der gesamte Follikel als Corpus luteum (Gelbkörper) bezeichnet. Durch die Vergrößerung kann ein einzelner Gelbkörper genügend Hormone produzieren um gegebenenfalls eine Schwangerschaft die ersten Wochen aufrechtzuerhalten (Corpus gravidans).

Die Thecaluteinzellen geben wieder Androgene an die Granulosaluteinzellen ab, die wiederum Androgene in Östrogene und Gestagene („Gelbkörperhormon“=Progesteron) umbauen. Wird der Gelbkörper nach 12 Tagen nicht durch β hCG (Choriongonadotropin) stimuliert, so bildet er sich zurück (Corpus albicans) und die Menstruation wird ausgelöst.

Östrogene und Gestagene regulieren die Abläufe an Endometrium, Vagina und anderen Organen. Die Hormonproduktion im Ovarium wird dabei von Hormonen der Hypophyse bestimmt und diese wiederum vom Hypothalamus (über das Gonadotropin-Releasing-Hormon) überwacht.

An Hypophysenhormonen existiert dabei zum einen das FSH (Follitropin), welches das Wachstum und die Reife der Follikel sowie die Östrogensynthese reguliert und zum anderen das LH (Lutropin), welches für Eisprung, Aufbau des Gelbkörpers und Gestagensynthese verantwortlich ist.

2.2 Ovarialtumor

In unserer Studie haben wir Experimente an Ovarialkarzinomgeweben durchgeführt. Zum besseren Verständnis sollen im Folgenden Hintergrundinformationen zur Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren sowie zur Einteilung der unterschiedlichen Ovarialkarzinomarten gegeben werden. Zudem wird eine Übersicht über die histopathologische Klassifikation und Stadieneinteilung dargestellt, mit der auch die von uns verwendeten Gewebeschnitte klassifiziert wurden.

2.2.1 Epidemiologie

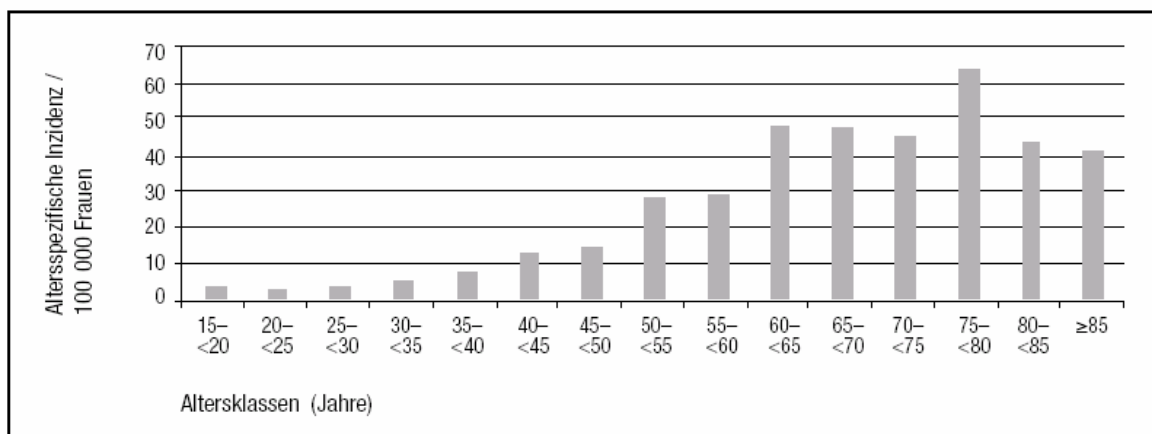
Das Ovarialkarzinom stellt 5% aller weiblichen Krebsarten dar. Es ist damit das 7.häufigste Malignom der europäischen Frau [16] allerdings aber die führende Todesursache unter allen malignen gynäkologischen Prozessen. In Europa werden jährlich über 61 000 neue Fälle diagnostiziert und rund 39 000 Todesfälle auf Grund bösartiger Neoplasien im Ovar dokumentiert [15]. Während die Neuerkrankungsrate in Afrika und Asien eher niedrig ist (ca. 3 pro 100 000), wird sie im Westen und Norden Europas sowie in Nordamerika als hoch eingestuft [15]. Deutschland liegt mit einer Inzidenzrate von 14 pro 100 000 Frauen, das heißt ca. 8 000 Neuerkrankungen [16] pro Jahr, im europäischen Mittelbereich.

75% der Patientinnen befinden sich wegen generell mangelnder Vorsorgemöglichkeit und fehlender Frühsymptomatik bereits während der Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III und IV) [15]. Das ist der wesentliche Grund für die insgesamt niedere Überlebensrate.

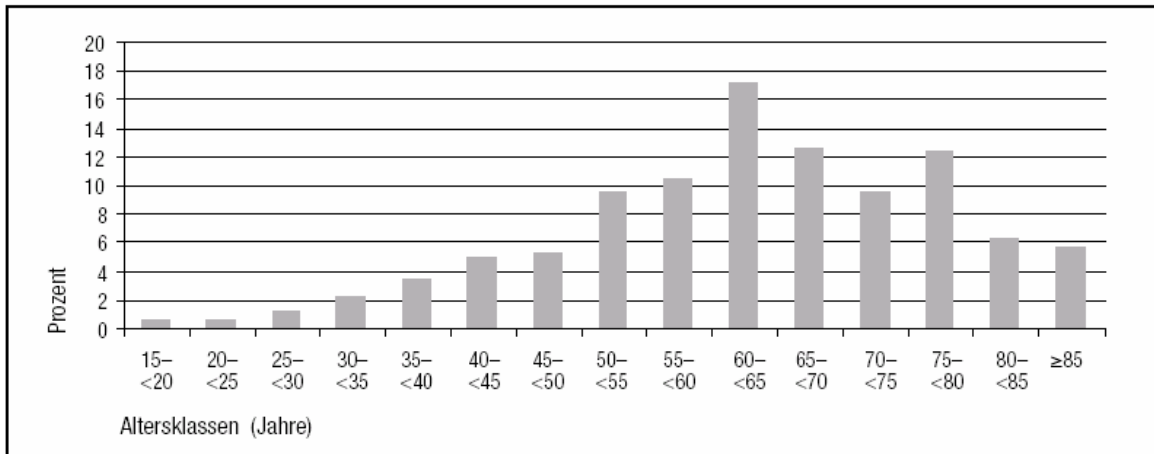
Da das Überleben der Patientinnen vom Stadium des Ovarialkarzinoms abhängt, beträgt die 5-Jahresüberlebenschance im frühen Stadium 80-90% wohingegen im fortgeschrittenen Stadium mit 25% gerechnet wird.

Auf Grund einer schlechteren Prognose ist die Sterblichkeit höher als die der beiden anderen Lokalisationen zusammen. Der Verlauf der altersspezifischen Inzidenz ähnelt der des Zervixkarzinoms [7].

Mit einem Lifetime-risk Faktor von 1.53 % liegt das Risiko einer weißen Frau, in ihrem Leben an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, höher als das von schwarzen Frauen mit 0,95% [6]. Im Grunde können alle Altersstufen betroffen sein. Jedoch ist die Rate der Neuerkrankungen bei den 65- bis 85-jährigen am höchsten (54/ 100 000). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beträgt das mittlere Alter der Patientinnen 58 Jahre [12].



Altersspezifische Inzidenz maligner Ovarialtumoren (1999–2004, n = 1411).



Altersverteilung bei Diagnosestellung maligner Ovarialtumoren (1999-2004, n = 1411).

Tab.2

Erkrankungen von Frauen unter 40 Jahren basieren meist auf genetischen Prädispositionen [15].

2.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Trotz Fortschritte in der Tumorforschung ist die Ätiologie des Ovarialkarzinoms bis heute weitgehend unklar. Es scheinen genetische, endokrinologische und andere Einflüsse die Karzinogenese multifaktoriell zu bedingen.

Bei ca. 5-10% aller Ovarialkarzinome, das sind ca. 300 Fälle pro Jahr, spielt die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle.

	Relatives Risiko	Lebenszeit-Risiko
Negative Familienanamnese	1	1,6%
Positive Familienanamnese	2,9- 7,2	4,6- 11,5%
1x 2. Verwandtschaftsgrad	2,9	4,6%
1x 1. Verwandtschaftsgrad	3,1- 3,6	5,0-5,7%
> 2 betroffene Verwandte	4,6	7,2%

Tab.3, [16]

Tritt die Erkrankung bei mehr als 2 Verwandten 1. Grades auf, dann wird von einem hereditären Ovarialkarzinom gesprochen.

Die hereditären Ovarialkarzinome können nach ihrem Phänotyp eingeteilt werden. In 85-90% der Fälle lässt sich die bösartige Erkrankung dem „Brust-Ovarialkarzinom-Syndrom (HBOC)“ zuordnen, in 5-10% dem „nichtpolypösen Kolorektalkarzinom-Syndrom (HNPCC)“ auch

„Lynch- Syndrom II“ genannt. In den meisten Fällen basiert das HBOC auf einer inaktivierenden Mutation des BRCA1-Gens, seltener des BRCA2-Gens. Liegt eine Mutation des BRCA1-Gens (macht 80% der hereditären Ovarialkarzinomfällen aus [16]) vor, werden die Trägerinnen zu 45-65% im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinoms erkranken [16]. Das Risiko für Frauen mit einer Keimbahnmutation des BRCA2-Gens ist mit 25- 30% [16] dagegen geringer. Die Vererbung erfolgt autosomal-dominant mit unterschiedlicher Penetranz [12]. Eine BRCA- Mutation hat ein extrem hohes Risiko zur Folge, an einem Mamma- oder Ovarialkarzinom zu erkranken.

Nach einer „Ovulationshypothese“ von Fathalla (1971)[13] soll ein Zusammenhang zwischen wiederholten Ovulationen und dem Auftreten eines Ovarialkarzinoms bestehen. Durch die Beschädigung des Epithels während des Eisprungs könne es zu spontanen Mutationen und fehlerhaften Reparaturprozessen kommen und damit zur Karzinomentwicklung.

Desweiteren scheint die Ernährung (übermäßiger Verzehr von gesättigten Fettsäuren) Einfluss auf diese maligne Neoplasie zu haben. Demnach sollen adipöse Frauen und Diabetikerinnen häufiger davon betroffen sein als normalgewichtige, gesunde Frauen [16]. Vor allem in den westlichen Industrienationen mit hohem Verbrauch an Fett- und Milchprodukten sei die Inzidenz erhöht[12].

In einigen Fall-Kontroll-Studien zeigte sich, dass auch eine späte Menopause ein Risikofaktor darstellen kann.

Permanent erhöhte Serumspiegel von Gonadotropine und Steroidhormone können mitogen wirken [17] und durch die Dauerstimulation vom Ovariepithel ein Ovarialkarzinom hervorrufen.

Was den Risikofaktor Rauchen betrifft, konnten Einflüsse bisher nur beim muzinösen Ovarialkarzinom beobachtet werden [14]. Weiter können eine frühe Menarche (<11Jahre), eine primäre Sterilität und Umweltfaktoren wie Asbest, Talkpuder und ionisierende Strahlung die Entstehung der bösartigen Geschwulst begünstigen [16].

Ein vermindertes Erkrankungsrisiko ist eine erhöhte Geburtenrate, damit sinkt das Risiko mit der ersten Geburt um 40% und mit jeder weiteren um 10-15% [18]. Auch hormonelle Ovulationshemmer („Pille“) scheinen vor Ovarialkrebs zu schützen, steigern allerdings als Kombinationspräparate von Östrogenen mit Gestagenen geringfügig das Mammakarzinomrisiko [16]. Als weitere Schutzfaktoren sind lange Stillzeiten, Fenretinid und eine Hysterektomie oder Tubenligatur beschrieben[16].

Tumorzentrum München (2007)

FIGO-Stadium	Anteil Patientinnen (n = 2911) %	Alter (Median) (Jahre)	Alter (Anteil ≥ 70 Jahre) %	Grading				Op-Radikalität		Lokalisation beidseits %
				GB*	G1	G2	G3	radikal	Tumorrest ≤ 2 cm	
I	29,8	56,5	21,0	29,6	22,1	30,0	18,4	97,4	0,9	14,7
II	6,9	63,2	32,2	10,8	12,4	32,8	44,1	86,2	9,8	37,8
III	46,5	64,1	34,1	1,7	6,7	34,6	57,1	33,6	36,7	60,6
IV	16,8	68,1	43,4	0	3,7	26,0	70,3	13,9	33,2	61,0
Gesamt	100	63,0	31,6	10,4	11,2	31,7	46,6	52,7	24,0	44,3

* Grading Borderline

Verteilung klinischer Kenngrößen in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium, Tab.4

Histologie	Anteil Patientinnen (n = 3081) %	Alter (Median) (Jahre)	FIGO-Stadium			
			FIGO I	FIGO II	FIGO III	FIGO IV
Karzinome						
Borderline	9,9	54,9	87,0	6,1	6,5	0,4
muzinös	6,5	60,0	56,5	4,7	28,5	10,4
klarzellig	1,6	59,8	68,9	6,7	17,8	6,7
endometroid	9,0	62,1	42,0	12,7	31,9	13,4
serös	49,9	64,0	15,2	6,4	60,1	18,3
Adeno-NOS*	9,5	69,3	9,7	5,2	52,8	32,2
undifferenziert	2,5	64,5	6,8	10,8	63,5	18,9
Keimzelltumoren	1,1	26,6	70,0	0	25,0	5,0
Keimstrang-Stroma-Tumoren	1,9	54,3	83,3	7,1	9,5	0
Multiple Angaben (ohne Sarkome)	5,9	59,6	36,6	8,0	40,6	14,9
Maligne Müller-Mischtumoren	0,6	70,2	13,3	13,3	66,7	6,7
Sarkome	1,8	67,7	13,2	10,5	60,5	15,8

* Not otherwise specified

Verteilung klinischer Kenngrößen in Abhängigkeit von der Histologie, Tab.5

2.2.3 Früherkennung und Diagnostik

Ovarialkarzinome sind im Frühstadium asymptomatisch weshalb sie in der Regel während Routineuntersuchungen entdeckt werden, durch Palpation eines Adnextumors oder Ultraschalluntersuchungen. Prämenopausal sind die Adnextumoren größtenteils benigne (>95%). Postmenopausal muss ein zystischer oder zystisch-solider Adnextumor grundsätzlich operativ abgeklärt werden [16].

Auf Grund niedriger Prävalenz des Ovarialkarzinoms ist ein effektives Screening durch ungenügende Spezifität und mangelnde Sensitivität limitiert. Als Screeningmethoden stehen zum einen die Bestimmung von Tumormarkern, der Einsatz der Transvaginalsonographie (additiv auch Farbdoppler) [15] sowie die bimanuelle rektovaginale Palpation [16] zur Verfügung.

Der Tumormarker CA-125 ist ein hochmolekulares Glykoprotein und wird in erster Linie von serösen Ovarialkarzinomen gebildet. Zwar ist dieser Wert bei über 80% der Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium erhöht jedoch findet sich im niedrigen Stadium (FIGO I) lediglich in der Hälfte aller Fälle ein erhöhtes CA-125. Falsch erhöhte CA-125-Werte ergeben sich auch oft bei benignen Tumoren, Infektionskrankheiten, Schwangerschaft usw. [15].

Bei Keimzelltumoren können AFP, hCG und LDH nachgewiesen werden, bei Stromatumoren Östradiol und Testosteron.

2.2.4 Relative Häufigkeit der Ovar-Neoplasien

1. Oberflächenepithel-Stromatumoren (bis 90%)

Das Oberflächenepithel bedeckt das Ovar und besteht aus einer einzelnen Schicht flacher bis kubischer Zellen [64/ 65/ 66]. In der Tumorforschung kommt dem Oberflächenepithel große Aufmerksamkeit zu, da 90% aller Ovarialkarzinome aus dieser Struktur entstehen [64/ 67/ 68/ 69]. Diese Krebsart ist die am häufigsten tödlich endende unter allen ovariellen Neoplasien sowie die primäre Todesursache gynäkologischer Malignitäten in der westlichen Welt [70]. Während der embryonalen Entwicklung hat das Oberflächenepithel aber auch das extraovarielle Mesothelium seinen Ursprung im Zölomepithel.

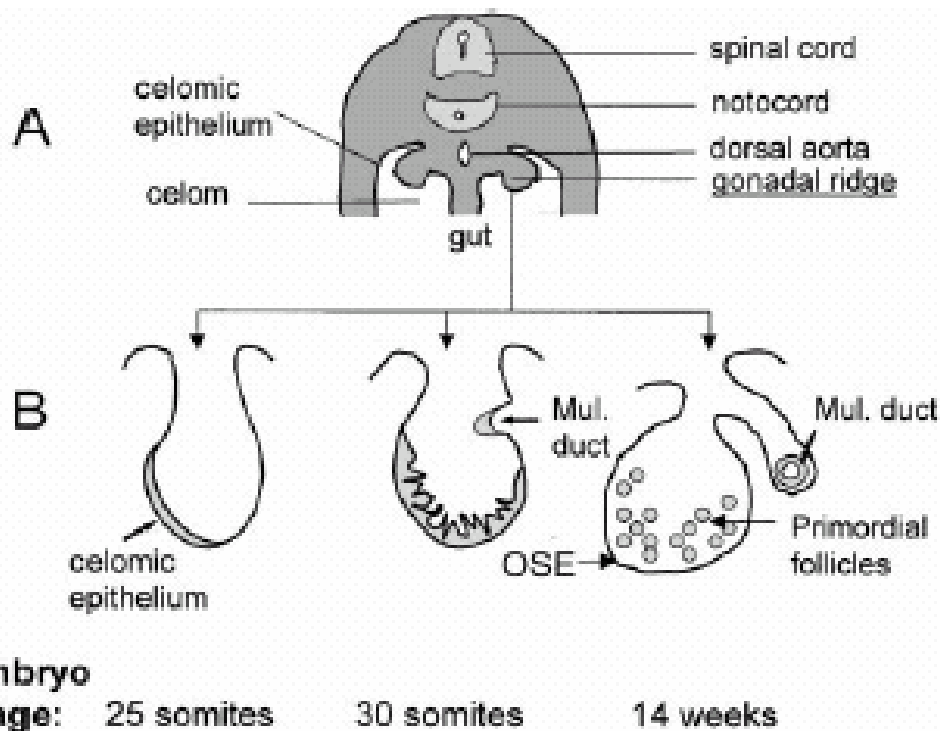


Abb.6

Das extraovarielle Mesothelium auch als der Müllerscher Gang bezeichnet, besteht aus dem Eileiter, dem Endometrium und der Zervix.

Trotz desselben Ursprungs aus dem Zölomepithel, existieren Unterschiede zwischen Oberflächenepithel und extraovariellem Mesothelium, die scheinbar mit lokal aktiven Faktoren in Zusammenhang steht. Einer dieser Unterschiede stellt die Expression vom Glykoprotein CA 125 dar. CA 125 stellt bei der erwachsenen Frau zugleich einen Differenzierungs- und Tumormarker für ovarielle Neoplasien und Neoplasien des Müllerschen Gangs dar [71]. Dieses Glykoprotein wird im Eileiter-, Endometrium- und Zervixepithel exprimiert, aber auch von Pleura, Pericard und Peritoneum. Im Oberflächenepithel hingegen findet keine CA 125- Expression statt. Es ist damit die einzige Struktur die aus dem Zölomepithel entsteht und kein CA 125 exprimiert bzw. den Differenzierungsmarker während der Entwicklung sehr früh schon verliert [72]. Entwickelt sich aus dem Oberflächenepithel aber ein Karzinom, kann die Expression von CA 125 nachgewiesen werden. Scheinbar besitzt das Oberflächenepithel unter pathologischen Bedingungen wieder die multipotente Differenzierungskapazität des Zölomepithels [70].

Das Oberflächenepithel der erwachsenen Frau enthält die Keratin-Typen 7, 8, 18 und 19. Diese Keratinkombination ist typisch für einen simplen Epithelaufbau. Weiter exprimiert es das Mucin Antigen MU1, die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und Zilien, die das Oberflächenepithel vom extraovariellen Mesothelium unterscheidet, sowie Mikrovilli apikal

und eine Basallamina [67, 73, 74, 75, 76]. Der interzelluläre Kontakt wird hauptsächlich durch einfache Desmosomen, tight junctions [67, 73], verschiedene Integrine [77, 78] und Cadherine [79, 80] hergestellt. Die Mitglieder der Cadherin-Familie sind calciumabhängige Zelladhäsionsmoleküle und zuständig für die Zell-Zell-Verbindungen und haben auf Grund ihrer engen Beziehung zu den Cateninen indirekt Einfluss auf die Genexpression. E-cadherin als das wichtigste Zelladhäsionsmolekül der meisten Epithelien ist im Endometrium-, Eileiter- und Zervixepithel stark präsent während es im Oberflächenepithel weniger zu finden ist. Hier kann E-cadherin hauptsächlich dort beobachtet werden, wo die Zellen eine zylinderähnliche Form besitzen bzw. bereits der Prozess der Metaplasie stattfindet [79, 80, 81, 82].

Das Oberflächenepithel nimmt am Ovulationszyklus teil. Es rupturiert wenn das Ei in den Eileiter ausgestoßen wird und ist zuständig für die Reparatur nach der Ovulation. Die Funktion variiert mit dem Reproduktionszyklus und kann damit als eine Hormon-abhängige Struktur bezeichnet werden [64, 67, 83].

Befindet sich das Oberflächenepithel nicht gerade im Stadium der Ovulation, so besitzt das Oberflächenepithel eine einfache, beinahe primitive epitheliale und mesenchymale Struktur. Wie bereits gesagt besitzt es unter bestimmten Bedingungen und während bestimmter Vorgänge multipotente Differenzierungskapazität. In Folge der Ruptur durch die Ovulation nehmen die Epithelzellen die phänotypischen Merkmale von Stromazellen an und haben damit die Möglichkeit die Oberfläche des Ovars wieder zu reparieren. Unterliegt das Oberflächenepithel dem Prozess der Metaplasie, einer benignen Umformung oder einer neoplastischen Progression kann es den phänotypische Eigenschaften von Müllerschen-Gangepithel-Derivaten annehmen, d.h. des Eileiters, des Endometriums oder der Zervix annehmen [70]. Anders als im gewöhnlichen gesunden Oberflächenepithel können die Epithelzellen in diesem Zustand den Tumor- und Differenzierungsmarker CA 125 exprimieren und geben somit Aufschluss über die Entwicklung des Ovars [72].

Die Differenzierung erfolgt dabei in solch ausgeprägtem Ausmaß, dass das Ovarialkarzinom auch danach klassifiziert wird [70]. Dabei werden die Neoplasien in seröse (Tuben-ähnliche endometriöse (Endometrium-ähnliche) und muzinöse (Endozervix-ähnliche) Adenokarzinome eingeteilt [70].

Der Tumor wird eingeteilt nach dem am häufigsten vorkommenden Zelltyp, weitere Zelltypen, die weniger als 10% ausmachen, können dabei vernachlässigt werden. Über 80% aller epithelialer Ovarialkarzinome sind seröse Adenokarzinome.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Häufigkeit der Ovarneoplasien gegeben:

1. Oberflächenepithel-Stromatumoren (bis 90%)1.1 **Seröse** Tumoren1.2 **Muzinöse** Tumoren, endozervikale und intestinale Typen1.3 **Endometroide** Tumoren1.4 **Klarzellige** Tumoren

1.5 Transitionalzellige Tumoren

1.6 Plattenepithelkarzinome

1.7 Epitheliale Mischtumoren (Formen spezifiziert)

1.8 Undifferenzierte Karzinome

2. Keimstrangstromatumoren (bis 3%)**3. Keimzelltumoren (1 bis 3%)****4. Gonadoblastom (selten)****5. Keimzell-Keimstrangstroma-Tumor (selten)****6. Tumoren des Rete ovarii****7. Mesotheliale Tumoren****8. Tumoren unsicherer Histogenese und verschiedene Tumoren****9. Gestationale trophoblastische Erkrankungen****10. Weichgewebstumoren, nicht ovarspezifisch****11. Maligne Lymphome, Leukämien und Plasmozytome****12. Unklassifizierbare Tumoren****13. Metastasen**

[6]

Weiter müssen die epithelialen Tumore nach ihrem Malignitätsgrad kategorisiert werden. Hinsichtlich der Dignität wird der Ovarialtumor als benigne und maligne eingeteilt. Daneben können solche Neoplasien entstehen, die ein niedrig malignes Potential aufweisen, also nicht-invasiv sind (carcinomas of low malignant potential, LMP-Tumore) auch Borderline-Tumore genannt. Charakteristisch für epitheliale Tumoren ist die schnelle intraabdominelle Metastasierung. Durch das Ausbleiben von Frühsymptomen werden sie erst im späten Stadium entdeckt und haben deshalb in der Regel eine ungünstige Prognose. Die Metastasierung erfolgt hauptsächlich in das Omentum majus, dem Diaphragma und der Leberserosa. Eine Ausdehnung in die Lymphbahnen hat einen Aszites zur Folge [7].

2.2.5 Histopathologische Klassifikation und Stadieneinteilung

Wie bereits erwähnt, haben wir für unsere Experimente Ovarialkarzinomgewebe verwendet. Diese Gewebe wurden vorher schon von Mitarbeitern des Pathologischen Instituts nach der FIGO-Klassifikation und dem Grading eingeteilt, so dass zum besseren Verständnis an dieser Stelle ein Überblick über die histopathologische Klassifikation und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms gegeben werden soll.

Die Stadieneinteilung erfolgt abhängig vom intraoperativen Befund und der darauffolgenden histologischen Bestätigung. Eine große Anzahl von Biopsien ist deshalb notwendig, auch aus scheinbar nicht befallenen Arealen des Peritoneums [61].

Nachfolgend die derzeit gebräuchlichen histopathologischen Klassifikations und Stadieneinteilungsformen:

Histopathologisches Grading gynäkologischer Tumoren nach [4]:

- GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- GB Tumoren von Borderline-Malignität
- G1 Gut differenziert
- G2 Mäßig differenziert
- G3 Schlecht differenziert oder undifferenziert

G1 und G2 können zusammengefasst auch als „low grade“ und das Stadium G3 als „high grade“ bezeichnet werden [9]. 1998 wurde von Silverberg [10] erstmals ein Gradingssystem mit gut definierten Kriterien vorgeschlagen. Spezielle Gradingssysteme sind bisher nur für Karzinome der Leber, der Mamma und des Corpus uteri gegeben. Die Kriterien zur Klassifikation von Ovarialkarzinomen können dabei unabhängig vom histologischen Typ angewendet werden. Hierbei werden Architektur, Kernpleomorphie und Mitosezahl analysiert und dementsprechend zu jedem Charakteristikum Punkte verteilt. Die 3 Punktwerte werden addiert und aus dem Gesamtscore ergibt sich somit der Differenzierungsgrad. Es ergibt sich eine Skala von maximal 9 Punkten (s. Tabelle 1 und 2).

Gradingssystem von Silverberg [10]:

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

Tab.6

Der Differenzierungsgrad ergibt sich aus der Summe der drei Punktwerte:

3 – 5 Punkte Gut differenziert (Grad 1)
6 – 7 Punkte Mäßig differenziert (Grad 2)
8 – 9 Punkte Schlecht differenziert (Grad 3)

Tab.7

Die gebräuchlichste Einteilung ist jedoch nachfolgende „**FIGO**-und **TNM**-Klassifikation“ nach [4]. Nach der FIGO-Klassifikation wurde auch das in dieser Arbeit verwendete Patientinnengut eingeteilt.

TNM	FIGO	Befundsituation
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T1a	Ia	Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	Ib	Tumor auf beide Ovarien begrenzt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars, keine malignen Zellen in Aszites
T1c	Ic	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien, mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung

T2	II	Tumor eines Ovars oder beider Ovarien, Ausdehnung auf das kleine Becken beschränkt
T2a	IIa	Befall von Uterus und/oder Tuben, keine malignen Zellen in Aszites
T2b	IIb	Befall anderer Beckengewebe, keine malignen Zellen in Aszites
T2c	IIc	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
T3	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIa	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIb	Makroskopische Peritonealmetastasen bis 2 cm Größe jenseits des Beckens
T3c	IIIc	Peritonealmetastasen größer als 2 cm jenseits des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen) (Leberparenchymmetastasen, zytologisch positiver Pleuraerguss, Einbruch in Blase oder Darm)
N		Regionäre Lymphknoten
NX		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1		Regionäre Lymphknotenmetastasen
M		Fernmetastasen
MX		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0		Keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

Tab. 8

[4] Stadieneinteilung nach dem TNM-System der UICC (International Union against Cancer) und FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique)

Überlebensraten in Abhängigkeit mit den Tumorstadien

Stadium	Stadium (%) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	5-Jahres Überlebensrate (%)
I	24	95
II	6	65
III	55	14-30
IV	15	0-20

Tab.9

2.2.6 Therapie

Die adäquate chirurgische Behandlung ist Voraussetzung bei der Primärtherapie. Je größer der Tumorrest nach chirurgischem Eingriff, desto schlechter die Prognose der Patientinnen mit Ovarialkarzinom [62]. Zusätzlich erfolgt eine Chemotherapie, deren Effektivität exponentiell mit der Reduktion der Tumorgröße zunimmt. Es gibt dabei vier Ansätze der Chemotherapie, die adjuvante (nach makroskopischer Resektion), die kurative (Tumorrest < 1cm), die neoadjuvante (primär, vor OP) und die palliative (zur Besserung der Lebensqualität). Durch eine Kombinations-Chemotherapie soll das Ziel einer Vollremission erreicht werden, die Voraussetzung für Heilung oder auch Lebenszeitverlängerung ist. Die Einführung von Cisplatin in Kombination mit den bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich verwendeten Alkylanzien stellte einen erheblichen Fortschritt in der Behandlung des Ovarialkarzinoms dar. Inzwischen wird Cisplatin aber zunehmend durch das weniger emetogene, nephrotoxische und neurotoxische Carboplatin ersetzt. Eine Kombination aus einer Platinverbindung und Paclitaxel erzielt bisher die höchste Rate an klinischer und histologischer Vollremission [63].

2.3 MTA1/ MTA2/ MTA3/ ER α / ER β / E-cadherin

Einige Proteine, die bei der Progression des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle spielen und vorwiegend an dieser Karzinomart untersucht wurden, scheinen beim Ovarialkarzinom noch für Unklarheiten zu sorgen. In der folgenden Studie wird auf die Metastasen-assoziierten Proteine- kurz MTAs eingegangen, die ursprünglich beim Mammakarzinom entdeckt und hier erstmals in Zusammenhang mit der Tumourprogression gebracht worden sind. Die MTA-Proteine wirken direkt oder indirekt auf das Zelladhäsionsmolekül E-cadherin und den Östrogenrezeptor. Deshalb sollen auch diese Proteine bezüglich Aufbau und Funktion in folgendem Abschnitt erläutert werden. Obwohl der MTA-Familie eine bedeutende Rolle beim Mammakarzinom zukommt, existieren bis heute keine Studien über die MTA1- und MTA3-Expression beim ebenfalls Östrogenrezeptor-exprimierenden Ovarialkarzinom. So war es unser Ziel, die Expression dieser Proteine in Abhängigkeit vom Tumorstadium beim Ovarialkarzinom zu untersuchen.

Die Proteine der MTA-Familie (Metastasen-assoziierte Proteine) sind in ihrer Funktion Transkriptionsregulatoren. MTA1 wurde ursprünglich beim Mammakarzinom [21] über die so genannte differentielle cDNA Subtraktionsmethode identifiziert und hier in Zusammenhang mit Metastasierung und verstärkter Migration gebracht. Auf Grund Sequenzhomologien sind zwischenzeitlich 2 weitere Mitglieder der MTA-Familie bekannt, MTA2 und MTA3. Die

MTA-Gene codieren für 6 Protein-Isoformen (MTA1/ MTA1s/ MTA-ZG29p/ MTA2/ MTA3/ MTAsL) [20]. Die MTA-Proteine spielen in der Tumorprogression eine nicht unbedeutende Rolle. Im Folgenden beziehe ich mich deshalb bei der Beschreibung der Proteine hauptsächlich auf das Mammakarzinom an dem schon einiges an Forschungsarbeit geleistet worden ist [93, 94], während sich die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit und die anschließende Diskussion auf das Ovarialkarzinom beziehen.

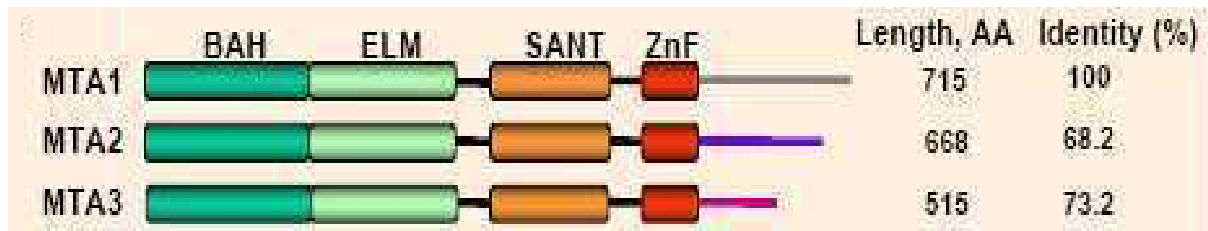


Abb.7

MTA1 wurde ursprünglich am Modell der Ratte identifiziert [21]. Dabei konnte beobachtet werden, dass die *MTA1* mRNA in den Zelllinien mit hoher Metastasen-Aktivität, im Vergleich zu den Zelllinien mit schwacher oder keiner Metastasen-Aktivität, stark exprimiert wurde. Auch in anderen Tumor-Zelllinien wurde *MTA1* als überexprimiert nachgewiesen [30] [86] (Magen-[87], Ovarial-, Lungen-[90], Oesophagus-[88], Prostata-[91], Pankreas-[89] und Colorektales- [87] Karzinom).

MTA1-Expression wurde auch in einer normalen Brustdrüsenepithel-Zelllinie mit langsamem Wachstum gefunden, jedoch nur zu einem Drittel bis die Hälfte im Vergleich zu Mamma-Adenokarzinom Zellen und atypischen Brustzellen mit schnellem Wachstum [30]. Nachdem Biopsien verschiedener epithelialer Tumorarten entnommen und untersucht worden waren, stellte sich heraus, dass Tumoren mit *MTA1*-Überexpression eine signifikant höhere Rate an invasivem Wachstum und Lymphknotenbefall aufwiesen und auch dazu tendierten, an vaskulärem Geschehen mitzuwirken. Beim Mamma-CA wird eine eindeutige Korrelation mit dem Lymphknotenbefall beschrieben [56].

Das *MTA1* Protein ist im Zellkern lokalisiert. Die Aminosäuresequenz enthält 3 Bereiche, die für die Lokalisation im Zellkern verantwortlich sind [23, 24] (siehe Abbildung, NLS (nuclear localization signals)). Es wird davon ausgegangen, dass die Hauptfunktion des Proteins mit dieser Lokalisation in Zusammenhang steht.

Das humane *MTA1*-Gen ist zu 88% identisch zu der *mta1*-Gen-Sequenz der Ratte und codiert für ein Protein mit 715 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 82kDa. Die Aminosäuresequenzen beider Spezies sind zu 96% identisch und zu 98% ähnlich [23, 24].

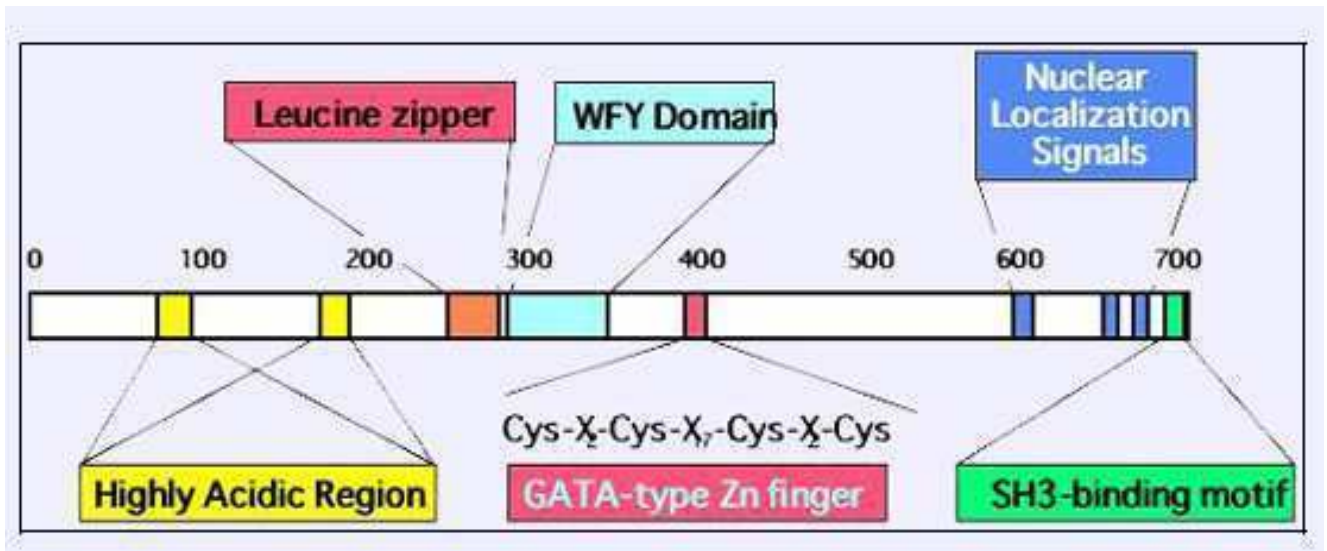


Abb.8

Das menschliche MTA1-Protein beinhaltet DNA-bindende-Motive, wie die Zinkfinger-Struktur Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys [25] (siehe Abbildung), die direkt an die DNA zu binden vermag und die Leucin-Zipper-Struktur [26], die eine Protein-Protein-Wechselwirkung eingeht und als Dimer dann in der Lage ist, an die DNA zu binden. Zusätzlich ist die Aminosäuresequenz reich an SPXX-Regionen, die bekannt dafür sind, an der Regulation von Genen und DNA-bindenden Proteinen beteiligt zu sein [27].

Nachdem also angenommen wurde, dass sich MTA1 laut Aminosäuresequenz im Zellkern befindet und dementsprechend auch dort seine Hauptaufgabe vermutet wird, wurde der Frage nachgegangen, ob das Protein mit anderen nukleären Proteinen interagiert. Interessanterweise hat sich herausgestellt, dass MTA1 in einen „nucleosome remodeling and histone deacetylase complex“, dem so genannten NURD- Komplex integriert ist [28, 29]. Dieser NURD-Komplex ist beteiligt am „chromatin-remodeling“ und beinhaltet noch das weitere Familienmitglied MTA 2. Das bedeutet, MTA-Proteine können durch ihre Histon-deacetylase-Aktivität als Element des NURD-Komplexes bestimmte Zielgene reprimieren. Die folgende Abbildung liefert die entsprechende Erklärung zur Funktion des NURD-Komplexes. Der grüne Pfeil beschreibt (siehe Abbildung) dabei eine Histon-Acetylierung die den Komplex aus Histon und DNA lockert und damit zum Stadium der Gen-Transkription führt, während der rote Pfeil repräsentativ für die Deacetylierung, in die unter anderem der NURD-Komplex involviert ist, steht. Beim Prozess der Deacetylierung wird eine Acetylgruppe vom Histon entfernt, worauf dieses noch positiver geladen vorliegt und damit die negativ geladene DNA fester binden kann. Der kompakte Komplex aus DNA und Histone befindet sich nun im Stadium der Gen-Repression, die Transkription bestimmter Zielgene wird unterdrückt.

deacetylierenden Weise die Transkription von SNAIL. Die E-cadherin-Expression, die abhängig ist von der SNAIL-Aktivität, kann somit durch Östrogene gesteigert werden.

Der Verlust von Östrogen und die blockierende Wirkung von MTA1 und MTA1s (kleine Splicevariante) auf die nukleäre Funktion des Östrogenrezeptors (ER α), unterbricht die Expression von MTA3. SNAIL wird damit hochreguliert und unterbindet folglich die E-cadherin Expression und auch die Funktion der Aromatase. Die Aromatase reguliert die Biosynthese des Oestrogens und ist abhängig von der direkten Wirkung des SNAIL-Proteins [22]. Die Hochregulation von SNAIL und die Unterdrückung der MTA3-Expression steigern den biologischen Zelltransformationsprozess „EMT“ (Epitheliale mesenchymale Transition). Auch im normalen, gesunden Gewebe existiert dieser Mechanismus, der die Interaktionen verschiedener gynäkologisch hochrelevanter Zielproteine untereinander beschreibt. Im gesunden Gewebe befindet sich der Mechanismus im Gleichgewicht während die Überexpression von MTA1, eine neoplastische Veränderung zur Folge haben kann.

Im gesunden Gewebe ist das MTA1-Protein in normalen Zellvorgängen integriert, zum Beispiel in der Zellproliferation [30].

MTA3 wurde, wie oben schon erwähnt, ursprünglich auch im Mammakarzinom entdeckt [92] und als drittes Mitglied der MTA-Familie identifiziert. Um das Protein MTA3 zu charakterisieren wurde mit der RT-PCR-Methode eine cDNA kloniert. Es konnten dabei zwei RNA-Spezien unterschieden werden. Eine RNA enthielt den Code für ein Protein mit 515 Aminosäuren, welches mit dem Namen MTA3 betitelt wurde. Die andere codierte für ein etwas längeres Protein mit 594 Aminosäuren, das MTA3L. Die beiden mRNAs unterscheiden sich hinsichtlich ihres 3' terminalen Exons und produzieren zwei höchst ähnliche Proteine mit einheitlichem Carboxylende. Eine Ähnlichkeit zwischen MTA3 und den beiden anderen Familienmitgliedern MTA1 und 2 liegt zu 80% vor. Alle drei enthalten verschiedene Sequenzmotive, die üblicherweise in Proteinen vorkommen, welche mit dem Chromatin in Wechselwirkung treten können.

MTA3 spielt beim Mammakarzinom in der Regulation von Wachstum und Differenzierung eine nicht unbedeutende Rolle. Es ist Teil des bereits schon oben beschriebenen NURD-Komplexes [28, 29] und hier stark ER abhängig. Es existieren nur wenige Studien die von der MTA3-Expression und Funktion berichten. Und davon wiederum bezieht sich keine einzige auf das Ovarial-CA.

Nachdem mit ER beim Mamma-CA ein möglicher Regulator für MTA3 gefunden war [22], wurden anschließend auch die von MTA3 regulierten Faktoren, also die jeweiligen Zielgene

nachgewiesen. Das wäre zum einen das SNAIL-Gen, als direktes Target und E-cadherin als indirektes Zielprotein [22]. E-cadherin ist als Zelladhäsionsmolekül im normalen gesunden Gewebe, größtenteils im Oberflächenepithel, verantwortlich für die Zell-Zell-Verbindungen. SNAIL [11] besitzt die Fähigkeit, die Epithelgewebe-Architektur zu zerstören, indem es die Expression von E-cadherin, einem Zelladhäsionsmolekül, hemmt, was einen Verlust der Zell-Zell-Verbindungen zur Folge hat. Das Protein baut Oberflächengewebe in Mesenchymgewebe um (EMT) und spielt damit eine wichtige Rolle hinsichtlich Dedifferenzierung, invasivem Wachstum und Metastasierung. MTA3 unterdrückt die SNAIL-Expression [22] und hat somit wahrscheinlich, trotz seiner Benennung, eine potentiell tumorsuppressive Funktion. Dass SNAIL als ein direktes Target von MTA3 gilt und so auch indirekt von ER reguliert, wurde unter anderem in einer Studie von Fujita [22] nachgewiesen. Hier wurde basierend auf Beobachtungen, dass sich Architekturveränderungen im Oberflächenepithel hauptsächlich in Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebs-Zelllinien finden lassen, einige Versuche zur Abhängigkeit von SNAIL zu MTA3, dem Östrogenrezeptor und E-cadherin durchgeführt. Das Fehlen von Steroiden hatte eine Abnahme von MTA3 zur Folge. Im Gegensatz dazu nahm die SNAIL-Expression, unter denselben Bedingungen, deutlich zu. Nach der Zugabe von Östrogen stieg die MTA3 Transkription, wie zu erwarten, innerhalb kürzester Zeit, während die SNAIL-Expression wiederum abfiel. Die E-cadherin-Kurve verlief nahezu parallel zur MTA3-Expressions-Kurve. Dadurch konnte die Aussage bekräftigt werden, dass durch Anwesenheit und Aktivierung des Östrogenrezeptors die MTA3-Expression erhöht wird, diese Erhöhung zu einem Abfall von SNAIL führt und damit eine gesteigerte E-cadherin Transkription vorliegt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MTA3 jedoch kein, wie eigentlich vermutet, direktes Zielgen des Östrogenrezeptors darstellt und auch SNAIL und E-cadherin „nur“ indirekt über MTA3 reguliert werden (siehe Abbildung).

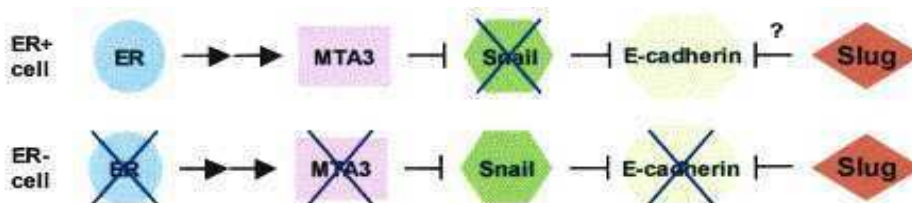


Abb.11

Die Funktion von MTA2 [92], das dritte und somit letzte Mitglied der MTA-Familie, ist noch weitestgehend unklar. Es wird vermutet, dass die Expression von diesem Protein mit der schnellen Zellteilung korreliert und mit dem Tumorsuppressorprotein p53 interagiert [31]. Die Expression von MTA2 ließ sich durchgehend in allen Stadien des Tumors und auch in

normalem gesundem Gewebe feststellen. Es wird davon ausgegangen, dass MTA2 mit dem Status der Proliferation und der Differenzierung assoziiert ist. Anders als bei den beiden anderen MTA-Mitgliedern wird dabei keine wirklich entscheidende Veränderung der Expression hinsichtlich des Tumorstadiums festgestellt [31].

Ein weiterer Faktor, der in der Progression des Ovarialkarzinoms integriert sein könnte, ist der *Östrogenrezeptor*.

Bis heute ist die Funktion des Östrogenrezeptors beim Ovarial-CA weitestgehend unklar. Als Prognosefaktor beim Mammakarzinom verwendet und deshalb für dessen Therapieansatz außerordentlich wichtig, scheinen beim Ovarial-CA noch viele Fragen unbeantwortet zu sein. Inwiefern er am Geschehen beteiligt ist und ob die Erhebung des Östrogenrezeptor-Status Auswirkungen und Erfolg hinsichtlich der Behandlung ergibt, wird in der Wissenschaft kontrovers diskutiert.

Der Oestrogenrezeptor (ER) ist ein nukleärer Hormonrezeptor und erhält hinsichtlich Wachstum und Differenzierung eine Schlüsselrolle. Es werden 2 Isoformen des Oestroengenrezeptors beschrieben, zum einen ER α , zum anderen ER β . Er wird unter anderem als Prognosefaktor verwendet und gilt als wichtiger Therapieansatz beim Mammakarzinom. Der ER ist ein liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, er kann somit nach Aktivierung durch Östrogen direkt an die DNA binden und damit eine Genexpression veranlassen. Die natürliche Aufgabe des Oestrogenrezeptors ist unter anderem die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane. Auch im Drüsengewebe der Mamma ist der ER aktiv und reguliert hier die Entwicklung und Differenzierung des Oberflächenepithels. Östradiol gilt als potentieller Tumorfaktor in vielen Mammakarzinom-Zelllinien. In 70% aller Brustkrebs-Fälle ist der Tumor ER positiv und Östrogen abhängig. Östrogen fördert das Wachstum indem es den Übergang der G1 Phase in die S-Phase stimuliert. Dieser Effekt kann mit Hilfe von Antiöstrogenen oder spezifischen ER-Modulatoren wie Tamoxifen unterdrückt werden. Es ist noch wenig bekannt, warum ER-negative Mammatumore aggressiver werden und auch ein hohes Metastasierungspotential besitzen [32].

Das Ovarium ist das Organ der Frau welches den meisten Vorrat an Östrogen vorweisen kann. Das Östrogen befindet sich hauptsächlich in den Granulosazellen. Hier werden Vorläuferstufen, die in der Theca entstehen, zu Östrogen umgewandelt. Das Östrogen beeinflusst Wachstum und Entwicklung der Ovarfollikel während des weiblichen Menstruationszyklus, indem die Proliferation von Granulosazellen in kleinen Follikeln stimuliert wird. Verschiedene Studien beschreiben die Möglichkeit, Östrogen könnte mit

verantwortlich sein für die Tumorprogression in der Postmenopause der Frau [33]. Heute gibt es nicht wenige Frauen, die sich einer Hormon-Ersatztherapie mit Östrogenen unterziehen. Klinische Fall-Kontrollstudien, Kohortenstudien und Metaanalysen haben sich mit dieser Problematik auseinandergesetzt. Während einige davon festgestellt haben, dass ein erhöhtes Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken dann vorliegt, wenn die Hormontherapie über länger andauernde Zeiträume hinweg genutzt wird [34], sind andere der Meinung keine Unterschiede entdecken zu können [35] oder vermuten sogar ein geringeres Risiko [36]. Kürzlich stellte eine umfangreiche prospektive Studie ein signifikant erhöhtes Risiko in Zusammenhang mit der Hormonersatztherapie fest. Im Gegensatz zu ER- α wurde ER- β bisher noch keine große Aufmerksamkeit zuteil [37]. Die Gene der beiden Liganden-abhängigen-Transkriptionsfaktoren liegen auf unterschiedlichen Chromosomen, ER- α auf 6q25.1 codierend für ein Protein mit 595 Aminosäuren und ER- β auf Chromosom 14q22-24 codierend für ein Protein mit 530 Aminosäuren [38]. ER- α und ER- β haben sich im Laufe der Evolution unterschiedlich entwickelt[39].

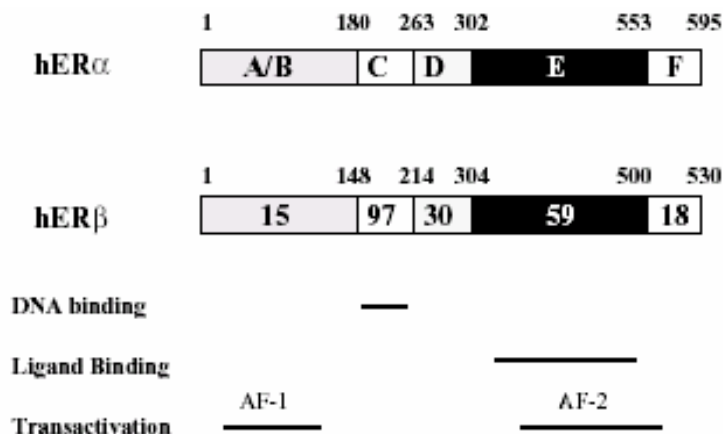


Abb. 12

Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der N-terminalen A/B und in der F-Domäne, hier sind die beiden Proteine nur zu 15 bis 18% identisch. Auch die E-Domänen, diejenigen, die für die Bindung von Liganden verantwortlich sind, weisen nicht mehr als 59%-ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf. Diese Gegebenheit lässt vermuten, dass beide Rezeptoren auch in ihrer Funktion unterschiedlich sind. Um diese Funktionen und die Notwendigkeit beider Proteine zu verstehen wurden Experimente mit knock-out-Mäusen durchgeführt. Diejenigen Mäuse, bei denen ER- α ausgeschaltet worden war, zeigten Infertilität und entwickelten multiple Ovarzysten [40]. Die Mäuse, die kein ER- β mehr besaßen, wiesen dagegen feinere Defizite in Fortpflanzungssystem auf, wie zum Beispiel eine Beschleunigung in der Follikelatresie oder schwächeren Empfindlichkeit gegenüber Gonadotropin [41]. Während die

ER- α mRNA vor allem im Uterus, in der Mamma, Leber, Herz und im Skelettmuskel präsent ist, wird ER- β signifikant in der Prostata und im Ovar exprimiert. ER- β wird im Epithel und in Stromazellen gefunden [42,43]. Beide Rezeptoren sind in Oberflächenepithel- und Granulosazelllinien vertreten. Dabei lässt sich ER- β in den Granulosazellen leichter nachweisen als ER- α welches verstärkt in den Thecazellen präsent ist [44]. So bekräftigt sich die Vermutung, dass die beiden Proteine eine unterschiedliche Funktion besitzen. Im Gegensatz zum Mammakarzinom hat der Östrogenrezeptor beim Ovarialkarzinom als prognostischer Faktor noch keine wirkliche Bedeutung bzw. ist man sich noch nicht im Klaren darüber, welchen Wert die Erhebung des Östrogenrezeptors-Status für die weitere Behandlung und Prognose des Tumors besitzt [45/46]. Während bei der Mamma über 50% der ER-positiven Karzinome mit Tamoxifen therapiert werden können, sind die Ergebnisse bei den ER-positiven Ovarialkarzinomen mit 15 bis 18 % eher bescheiden [53/54]. Die ER- α -Expression scheint auf niederem Level, ohne signifikante Änderungen [47, 48, 44], in allen Tumorarten beobachtbar zu sein. Ein Bericht von Cunat et al lässt jedoch annehmen, dass die ER- α -Expression verstärkt in malignen Ovar-Tumorzellen vorliegt [55]. In einer Studie von Lazennec wird dagegen verminderte Expression von ER- β in Ovarialkarzinomgewebe gegenüber normalem gesundem Gewebe beschrieben. Daneben existieren andere Studien, die wiederum von einer gleich bleibenden oder sogar ansteigenden ER- β -Expression ausgehen. Jedoch muss hierzu gesagt sein, dass auch in weiteren Karzinomarten wie beim Mamma- [49], Prostata- [50], Lungen- [51] sowie beim Colorectalen-Karzinom [52], ein Abfall der ER- β -Expression festgestellt werden konnte. Die Mechanismen für die verminderte ER- β -Expression sind noch unklar. In der besagten Studie von Lazennec wurde sogar nachgewiesen, dass eine Steigerung der ER- β -Expression in Ovarialkarzinomzellen die Proliferation um 50% reduzieren konnte [33] während derselbe Versuch mit ER- α kaum Effekte erzielte.

Eine weitere interessante Frage ist dann wohl, ob die beiden Rezeptoren möglicherweise Gegenspielerfunktionen aufweisen. Es wird deutlich, dass die Östrogenrezeptoren ein noch relativ ungeklärtes Thema bezüglich des Ovarialkarzinoms darstellen. In vielen verschiedenen Studien wird kontrovers darüber diskutiert und es scheint, als müsse in Zukunft noch einiges an Forschungsarbeit geleistet werden. Auch wir haben uns in der folgenden Studie damit auseinander gesetzt.

2.4 Zielsetzung

Zunächst haben wir uns mit dem Metastasen-assoziierten Protein MTA3 und dem Ovarialkarzinomgewebe beschäftigt. Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert noch keine Studie, die dieses Protein hinsichtlich seiner Expression bei der Progression des Ovarialkarzinoms beschreibt. Allgemein liegen nur wenige Studien über MTA3 vor und diese beziehen sich hauptsächlich auf das Mammakarzinom. Unsere Aufmerksamkeit galt außerdem einem weiteren MTA-Familienmitglied, dem MTA1-Protein, welches bisher, wie auch MTA3, vor allem in Mammakarzinom-Studien ausführlich beschrieben worden war. Beim Mammakarzinom scheint MTA1 mit Metastasierung und invasivem Potential des Tumors assoziiert zu sein, dagegen MTA3, trotz der Namensgebung, eine eher tumorsuppressive Funktion zu besitzen. Beide Proteine könnten nicht nur beim Mammakarzinom sondern auch bei der Progression des Ovarialkarzinoms eine wichtige Rolle spielen. Dementsprechend war es also unser Anliegen bzw. unsere Zielsetzung, die MTA3 und MTA1-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium beim Ovarialkarzinom darzustellen und anschließend darüber zu diskutieren.

Weiter haben wir uns zusätzlich mit der Expression von E-cadherin, ER- β und ER- α in Abhängigkeit vom Tumorstadium beim Ovarialkarzinom und deren Korrelation untereinander auseinandergesetzt. Es sollen damit Zielgene und Regulatoren identifiziert werden um, wenn vorhanden, einen „Pathway“, ähnlich dem beim Mammakarzinom, zu beschreiben. Immunhistochemisch haben wir untersucht, inwiefern Tumorgrading, Tumorstaging und die Überlebensdaten beim Ovarialkarzinom von der Expression dieser Proteine abhängig sind. Zusätzlich wurden vom Labor funktionelle Versuche zum Thema durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten **Materialien** aufgelistet:

Immunhistochemie	Bezugsquelle
0,1M Zitronensäure	Merck, Darmstadt
0,1M Na-Zitrat	Merck, Darmstadt
3,3-Diaminobenzidin in Chromogenlösung	DakoCytomation, Inc., California, USA
Aqua destillata	Noll, München
Ethanol 50% vergällt	Apotheke Innenstadt, Uni LMU Pettenkoferstraße
Ethanol 70% vergällt	Apotheke Innenstadt, Uni LMU Pettenkoferstraße
Ethanol 80% vergällt	Apotheke Innenstadt, Uni LMU Pettenkoferstraße
Ethanol 96% vergällt	Apotheke Innenstadt, Uni LMU Pettenkoferstraße
Ethanol absolut vergällt	Apotheke Innenstadt, Uni LMU Pettenkoferstraße
Imidazol-HCL Puffer	DakoCytomation, Inc., California, USA
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Saures Hämalaun (nach P. Mayer)	Apotheke Innenstadt, Uni München Pettenkoferstraße
Ultra V Block	Lab Vision Corporation, California, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., California, USA
Vitro Clud Einschlußmittel f. mikroskop. Technik	R. Langenbrinck, Emmendingen
Wasserstoffperoxidlösung 30%, reinst	Apotheke Innenstadt, Uni München Pettenkoferstraße
Xylol, reinst	J.T. Baker, Deventer, Holland

Zusätzlich für Immunfluoreszenz:	
Sekundärantikörper für MTA2 ; Ziege-Anti-Maus IgG Cy3 markiert (Anfangskonzentration = 1,6 mg/ml)	Jackson Immuno Research-USA, Dianova IHH
Sekundärantikörper für MTA1 und MTA3; Ziege-Anti-Kaninchen IgG Cy3 markiert (Anfangskonzentration = 1,6 mg/ml)	Jackson Immuno Research-USA, Dianova IHH
Mounting medium für Immunfluoreszenz Azeton	Vector Laboratories-Burlingane-USA Apothekenbedarf der LMU-München

Verwendete Antikörper:

Protein			Firma	Verdünnung
MTA1	Kaninchen	Polyklonal	Bethyl, Axxora Darmstadt	1:750
MTA2	Maus	Monoklonal	Sigma, München	1:500
MTA3	Kaninchen	Polyklonal	Calbiochem, Darmstadt	1:800
E-cadherin	Maus	Monoklonal	Calbiochem, Darmstadt	1:80
ER-α	Maus	Monoklonal	Immunotech	1:150
ER-β	Maus	Monoklonal	Serotec	1:600

Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser 24 x 60 mm spezial Erlenmeyerkolben 1000 ml Falconröhrchen Blue Max 15 + 50 ml Färbekammer (dunkel mit Deckel) Glasküvetten Laborwecker Mod TR118 Meßzylinder Plastibrand Minishaker MS1 (Vortex) Münchener Mappen Objektträger SuperFrost Plus 25x75x1,0 Objektträgerfärbegestell Pipettenspitzen, steril, 1000µl Pipettenspitzen, steril, 100µl Pipettenspitzen, steril, 10µl Pipettenspitzen, steril, 300µl Pipettenspitzen, steril, 5000µl Pipettierhelfer accu-jet pro Trockenschrank Untersuchungshandschuhe sempercare Variable Pipette Reference 100-1000µl Variable Pipette Reference 10-100µl Variable Pipette Reference 1-10µl Variable Pipette Reference 500-5000µl Vari-shaker #G935 Mikroskop Orthoplan 946828 Kamera 3ccd, c-mount Objektiv 2,5-fach Objektiv 10-fach	R. Langenbrinck, Teningen Schott, Mainz Becton Dickinson Labware, Schubert+Weiß, München Werkstatt, Univ. FK Innenstadt Hellma GmbH & Co KG, Müllheim Oregon Scientific, Inc., Oregon, USA Milan SA, Genf, Schweiz IKA-Works, Inc., North Carolina, USA Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig Hellma GmbH & Co KG, Müllheim Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Brand GmbH & Co KG, Wertheim Heraeus GmbH, Hanau Semperit, Wien, Österreich Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Dynatech Guernsey, GB Leitz, Wetzlar JVC Victor Company, Japan Leitz, Wetzlar Leitz, Wetzlar

Objektiv 25-fach	Leitz, Wetzlar
Objektiv 40-fach	Leitz, Wetzlar

3.2 Methoden

3.2.1 Patientinnenkollektiv

Die in der Immunhistochemie verwendeten Gewebeschnitte stammen von Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU-München Innenstadt, Maistraße. Diese waren im Zeitraum 1990 bis 2002 auf Grund maligner Neoplasien in Behandlung. Zu dem Zeitpunkt als die Gewebeproben entnommen worden sind hatten die Patientinnen ein Alter von 41 bis 83 Jahren.

Es handelt sich dabei um seröses Ovarialkarzinomgewebe von 115 Frauen.

Die jeweiligen Proben wurden intraoperativ gewonnen und durch Mitarbeiter des Pathologischen Instituts beurteilt also nach Tumorstaging und Tumorgrading eingeteilt. Die Tumore wurden daraufhin in Paraffin eingebettet und daraus wiederum Dünnschnittpräparate hergestellt.

3.2.2 Verarbeitung der Gewebeproben

3.2.2.1 Einbettung in Paraffin

Bei den von mir untersuchten Ovarialkarzinomgeweben handelt es sich um bereits asserviertes Gewebe aus dem Bestand der Universitäts-Frauenklinik München. Um eine Gewebedegeneration zu verhindern und später eine Antigenstruktur nachweisen zu können wurde das Gewebe sofort nach Entnahme von Mitarbeitern des Instituts mit 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert.

Das Prinzip der Fixation beruht auf der Bildung eines starren Gitternetztes. Dabei lagert sich Formaldehydmolekül an die Eiweißmoleküle an und es kommt zu einer Vernetzung der Eiweißmoleküle untereinander. Die Proteine werden dabei nahezu nicht denaturiert. Formalin sollte stets dunkel und kühl gelagert werden, um zu verhindern dass diese zur Ameisensäure

oxidiert. Die Fixationsdauer hängt dabei von der Größe des Gewebestücks ab und kann bis zu 48h in Anspruch nehmen.

Danach wurde das Fixationsmittel mit Leitungswasser gut herausgewaschen und anschließend eingebettet. Dabei wurden die Gewebeproben mit einem organischen Lösungsmittel, welches eine hohe Affinität zu Wasser besitzt, entwässert. Das Gewebe wurde nun 70%igem und absoluten Ethanolen ausgesetzt. Weitere Zugabe von Xylol. Xylol fungierte als Intermedium, also als Stoff, der sich sowohl mit Ethanol als auch mit Paraffin mischt, so dass auch die letzten Reste des Alkohols ausgewaschen wurden. In einem Automaten konnte nun das auf 60°C erhitzte flüssige Paraffin an die Stellen vordringen, an denen sich vorher Wasser bzw. der Alkohol befand. In Folge wurde das Gewebe mit flüssigem Paraffin in Blockform gegossen. Nachdem der Block abgekühlt war und aus der Form herausgelöst werden konnte wurde er noch im Eisfach gekühlt und im Anschluss mit Hilfe des Schlittenmikrotoms bearbeitet. Dabei wurden 2-3µm dicke Gewebsschnitte angefertigt und auf speziell für die Immunhistochemie beschichteten Objektträger („Superfrost Plus“) aufgezogen. Damit die Proben auch sicher am Träger haften empfiehlt es sich, die Präparate über Nacht bei ca. 56-58°C im Brutschrank aufzutrocknen. Jedoch sollte nie mit der Temperatur über 60°C gegangen werden, da sonst Antigenstrukturen zerstört werden können. Die Fixation, das Einbetten und Schneiden ist von Mitarbeitern des Instituts durchgeführt worden. Soll hier aber kurz beschrieben werden, um einen Überblick über die Aufbereitung und Qualität des untersuchten Materials zu geben. Alle darauf aufbauenden Arbeiten, wie Immunfärbungen, Bestimmung des IRS und die statistische Analyse der Daten wurden von mir im Rahmen dieser Doktorarbeit, nach Einarbeitung durch die Mitarbeiter, selber vorgenommen.

3.2.2.2 Immunhistochemische Aufarbeitung

Das Prinzip der Immunhistochemischen Färbung beruht auf der Tatsache, dass verschiedene zelltypische Moleküle als Antigene wirken und gegen diese Antigene Antikörper hergestellt werden können. Diese Antikörper sind an einen Marker gekoppelt und können dadurch die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen sichtbar machen.

Um mit der eigentlichen Färbung starten zu können muss das Paraffin aus dem Gewebe herausgelöst werden. Dies geschieht mit Hilfe von Xylol. Das heißt, der Objektträger mit Gewebeprobe, welcher sich in einer Färbeschaukel befindet, wird 15 min in einem Xylolbad

entparaffiniert. Anschließend entfernt ein 2-minütiges Eintauchen in 100%igem Ethanol die Xylolreste aus dem Schnitt.

Nun wird in einem 20-minütigem Vorgang mit 3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol die endogene Peroxidase blockiert (0,3ml 30%iges H₂O₂ + 97ml Methanol).

Die endogene Peroxidase befindet sich hauptsächlich in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten, weniger in Dünndarmgewebe und in Nervenzellen. Diese Peroxidase zu blockieren ist unumgänglich, da die später folgende Substrat-Chromogen-Reaktion nicht unterscheiden kann, ob sie vorher schon im Gewebe lokalisiert war oder nachträglich zugegeben wurde und es so zu falschen Ergebnissen führen könnte. Erfolgreich war die Blockierung dann, wenn die Erythrozyten nach der Färbung farblos erscheinen.

Jetzt wird die Schaukel zunächst zwei Minuten in 50%iges und anschließend in 70%iges Ethanol gestellt. Um den Alkohol wieder zu entfernen ist Aqua dest notwendig.

Die Antigendemaskierung erfolgt durch Hitzebehandlung. Das heißt, mit der anfänglichen Fixation zur Herstellung des Paraffinblockes können Epitope durch die Aldehydverbindungen maskiert sein. Zur Darstellung bestimmter Antigene ist dieser Vorgang der Demaskierung unumgänglich. Die Hitzebehandlung erfolgt im Schnellkochtopf mit Na-Citratpuffer, einer kalziumpräzipitierenden Lösung, durch fünfminütiges Kochen.

Nach dem Kochen wird der Schnitt in Leitungswasser gekühlt, mit Aqua dest gespült und zwei mal zwei Minuten in PBS gewaschen.

Im Anschluss erfolgt nun die Blockierung mit Hilfe des Ultra V Block Puffer. Dieser Vorgang dient der Sättigung von elektrostatischen Ladungen im Gewebe um unspezifische Bindungen von Immunglobulinen an Membranen oder Fettgewebe und damit eine unspezifische Anfärbung zu verhindern.

Nach 45 Minuten wird der Ultra V Block Puffer abgeschüttet und 200µl Primärantikörper auf jeden Schnitt aufgetragen (je nach Antikörper in unterschiedlichem Verhältnis mit Dako oder PBS verdünnt; MTA1/ MTA3/ ER- α / ER- β mit Dako; E-cadherin mit sterilem PBS). Was nun folgt ist eine Inkubationszeit bei 4°C.

Die Inkubationszeit für MTA3, MTA1 und ER- β beträgt die ganze folgende Nacht.

Die Inkubationszeit für E-cadherin und ER- α beträgt 60 Minuten.

Den darauf folgenden Tag bzw. 60 Minuten später werden die Präparate für 2 mal 2 Minuten in PBS gewaschen und der Sekundärantikörper aufgetragen - 30 Minuten. Dieser Sekundärantikörper ist ein biotinylierter, also mit Biotin markierter, so genannter Brückenantikörper, der den später zugegebenen ABC-Komplex binden soll (3 Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Anti-IgG + 10ml steriles PBS). Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut an Brückenantikörper koppeln lässt. Diese Brückenantikörper werden aus verschiedenen Tierspezies gewonnen (z.B. Maus, Kaninchen, Ziege usw.) und können biotinyliert gut eine Verbindung zum ABC-Komplex herstellen. Der ABC-Komplex sollte zwischenzeitlich angesetzt werden, da er vor Gebrauch 30 Minuten ruhen muss.

ABC = 4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10 ml steriles PBS

Die überschüssige Sekundärantikörper-Lösung wird nun mit PBS (2 mal 2 Minuten) herausgewaschen und es folgt das Auftragen des ABC-Komplexes – 30 Minuten. Die ABC-Methode basiert auf der Affinität von Avidin zu Biotin. Avidin ist ein tetrameres Glycoprotein und wird aus Hühnereiweiß gewonnen. Gentechnisch wurde jedoch auf Grund von teilweise unspezifischen Reaktionen ein reineres Produkt hergestellt, das Streptavidin. Der Komplex besteht also aus Streptavidin (wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert), welches vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, und Biotin. Der Komplex wird dabei so produziert, dass nur 3 Biotin-Moleküle an das Avidin gekoppelt werden und die 4. Bindungsstelle für den biotinylierten Sekundärantikörper zur Verfügung steht. Zusätzlich ist an den Komplex ein Enzym, nämlich in diesem Fall die Peroxidase gekoppelt, die für die Konjugation zuständig ist, also diesen Vorgang katalysiert. Die Peroxidase wird aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen und bildet zusammen mit dem Substratpuffer H₂O₂ als Katalysator mit dem jeweiligen Chromogen (DAB) ein farbiges Endprodukt.

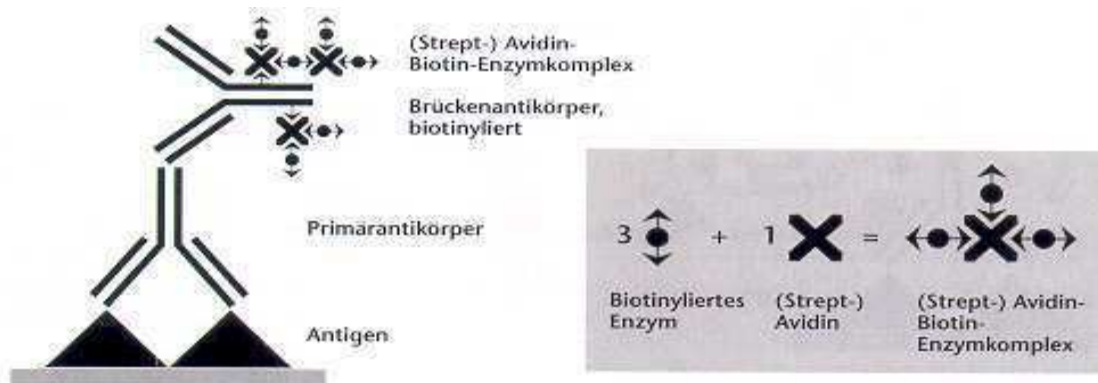


Abb.13

Nach der 30minütigen Einwirkzeit folgt wieder das Waschen mit PBS (2 mal 2 Minuten) und darauf die Substratfärbung mit DAB von Dako (3,3 Diaminobenzidin) je nach Substrat zwischen 8 und 10 Minuten.

Für MTA3/ ER- α und E-cadherin beträgt die Färbezeit zwischen 8t und 10 Minuten.

Für MTA1 zwei Minuten.

Und für ER- β beträgt sie 5 Minuten.

Die Färbelösung, die auf die Obekträger aufgetragen wird ist zusammengesetzt aus 1ml DAB Substratpuffer und einem Tropfen DAB Chromogen. Es bildet sich durch die Reaktion der Peroxidase, dem Substratpuffer und dem Chromogen ein brauner Farbkomplex. Um eine Überfärbung zu vermeiden, das heißt die Farbreaktion zu stoppen und eine aussagekräftige Färbung zu erhalten werden die Schnitte gleich nach dem Farbumschlag für 2 mal 2 Minuten in Aqua dest gegeben.

Anschließend erfolgt die Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer. Es handelt sich hier um einen basischen Farbstofflack in saurer Lösung. Der ph-Wert liegt bei 4,5. Bei diesem sauren ph-Wert besitzen ausschließlich die Kerne noch eine negative Ladung, weshalb auch nur diese angefärbt werden. Das Prinzip liegt darin, dass sich die basischen Farbstoffe an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNS im Kern anlagern. Nach 2 Minuten erfolgen das Auswaschen der Säurenreste und das Bläuen 5Minuten in Leitungswasser.

Schließlich erfolgt die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe, mit 70%igem, 96%igem und absolutem Alkohol. Die Aufhellung erfolgt in Xylol.

Es folgt die luftdichte Eindeckung mit Eukitt (einem gut klebenden Eischlussmittel). Für das Eindeckmittel gilt, es muss denselben Brechungsindex haben wie Glas, damit die Färbung nicht beeinflusst wird.

3.2.3 Kontrollen

Um zu überprüfen ob die Färbeergebnisse verlässlich sind und um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse auszuschließen, wurden bei den jeweiligen Versuchen bzw. Färbevorgängen stets Positivkontrollen eingesetzt. Falsch positiv würde bedeuten, es färbt sich Gewebe an, bei welchem mit dem speziellen Antigen nicht zu rechnen ist.

Dementsprechend bedeutet falsch negativ, dass sich das Gewebe nicht anfärbt obwohl sicherlich das nachzuweisende Antigen vorliegt.

Die Positivkontrollen wurden dabei mit derselben Vorgehensweise behandelt wie all die anderen Schnitte. Sie stellt ein Gewebepräparat dar, welches mit Sicherheit das zu bestimmende Antigen enthält, überprüft Funktion und Sensitivität des Antikörpers und damit die Verlässlichkeit der Versuche und Ergebnisse.

3.2.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Immunreaktive Scores (IRS) ohne Kenntnis der Tumorstadien und Überlebensdaten der Patientinnen. Das Prinzip des IRS ist, immunhistochemische Untersuchungsergebnisse einheitlich und somit vergleichbar zu machen. Nach Remmele und Stegner wurde diese Methode zum immunhistochemischen Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Mammakarzinomgewebe entwickelt. Er beinhaltet die **Färbeintensität (SI)** und den **Prozentsatz positiver Zellen (PP)** im Gewebepräparat.

Die Färbeintensität SI (Staining intensity) bewertet den vorliegenden Intensitätsgrad der Färbung von 0 bis 3:

0 = keine Färbereaktion

1 = schwache Färbereaktion

2 = mäßige Färbereaktion

3 = starke Färbereaktion

Der Prozentsatz positiver Zellen PP bewertet den Anteil positiver Karzinomzellen im Verhältnis zu den negativen Zellen:

0 = keine positiven Zellen

1 = weniger als 10% positive Zellen

2 = 10-50% positive Zellen

3 = 51-80% positive Zellen

4 = über 80% positive Zellen

Das Produkt von SI und PP ergibt den IRS, der von 0-12 Punkten reichen kann:

$$\mathbf{SI \times PP = IRS}$$

Damit kann die Bewertung, die am Mikroskop erhoben wurde in eine statistisch verwertbare Aussage umgeformt werden.

3.2.5 Nachweis von MTA1/ MTA2/ MTA3 mittels Immunfluoreszenz

Die Objektträger mit den Zelllinien werden für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton gestellt. Nach diesem Vorgang, der zur Fixierung dient, lässt man die Präparate bei Raumtemperatur trocknen. Anschließend wird für 3 mal 2 Minuten in PBS gewaschen. Die Proben sind jetzt für die eigentliche Färbung bereit.

Als nächstes erfolgt die Blockierung durch den Ultra V Block Puffer. Dieser dient der Sättigung elektrostatischer Bindungen, damit Immunglobuline sich nicht durch hydrophobe Bindungen unspezifisch an Membrane und Fettgewebe binden und verhindert damit ein unspezifisches Anfärben (siehe auch Kapitel Immunhistochemie). Die Blockierung dauert 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach Abklopfen des Ultra V Block Puffers kann der Primärantikörper aufgetragen werden.

MTA 1/ 2 und 3 werden jeweils im Verhältnis 1:500 mit dem Dako-Verdünnungsmedium verdünnt. Die Inkubationszeit beträgt 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubationszeit wird wieder für 3 mal 2 Minuten mit PBS gewaschen und es folgt das Auftragen des Sekundärantikörpers. Hier ist es wichtig möglichst im Dunkeln zu arbeiten, da die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Antikörper markiert sind im Sonnenlicht schnell zerfallen.

Für MTA 2 wird dabei ein Ziege-Anti-Maus IgG Cy3-markiert verwendet.

Für MTA 1 und 3 dagegen Ziege-Anti-Kaninchen IgG Cy3-markiert.

Alle 3 Antikörper werden jedoch mit derselben Verdünnung (1:500) eingesetzt und auch mit dem gleichen Medium, nämlich Dako, verdünnt. Die Einwirkzeit beträgt hier 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Schließlich wird wieder mit PBS gespült (3 mal 2 Minuten) und anschließend lässt man die Präparate im Dunkeln trocknen.

Das Eindecken erfolgt hier mit mounting medium for fluorescence welches DAPI enthält. DAPI stellt den Kernfärbestoff dar, welcher dem Hämalaun der Immunhistochemie gleichzusetzen ist (siehe auch Kapitel der Immunhistochemie).

Cy3-markiert = roter Farbstoff

Cy2-markiert = grüner Farbstoff

DAPI = blauer Farbstoff (Kernfärbung)

3.2.6 Statistik

Die Protein-Expression der verschiedenen Tumorstadien wurde, nach immunhistochemischer Analyse, die unter Verwendung des immuno-reactive-score erfolgte, anhand des Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen. Der Mann-Whitney-Test ist ein Rangsummen-Test für nichtparametrische Tests zur explorativen Datenanalyse.

Die Signifikanz der Unterschiede wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ beidseitig festgelegt, bei ($p<0,01$) als hoch signifikant und ($p<0,001$) als höchst signifikant definiert. Als nicht signifikant gelten Werte von ($p>0,05$).

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows® (Social Sciences computer software version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL).

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Analyse

Immunhistochemisch haben wir an 115 Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten die Proteinexpression von MTA3, MTA1, E-cadherin und den beiden Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β , hinsichtlich des Tumorgradings und Tumorstaging (FIGO), analysiert. Mit einem speziellen Statistikprogramm konnten wir dann die Korrelationen der Proteine untereinander berechnen.

Unter dem Mikroskop ließen sich die nachfolgenden Bilder beobachten. Es werden hier zunächst mehrere Ausschnitte von unterschiedlich differenziertem Ovarkarzinomgewebe, also verschiedene Tumorstadien und die jeweilige zugehörige MTA3-Expression, gezeigt. Wie in den folgenden Bildern (Abb.14, S.39) gut zu beobachten, hat die immunhistochemische Analyse ergeben, dass MTA3 im Zellkern lokalisiert ist und dort wohl auch seine Hauptfunktion besitzt.

MTA3

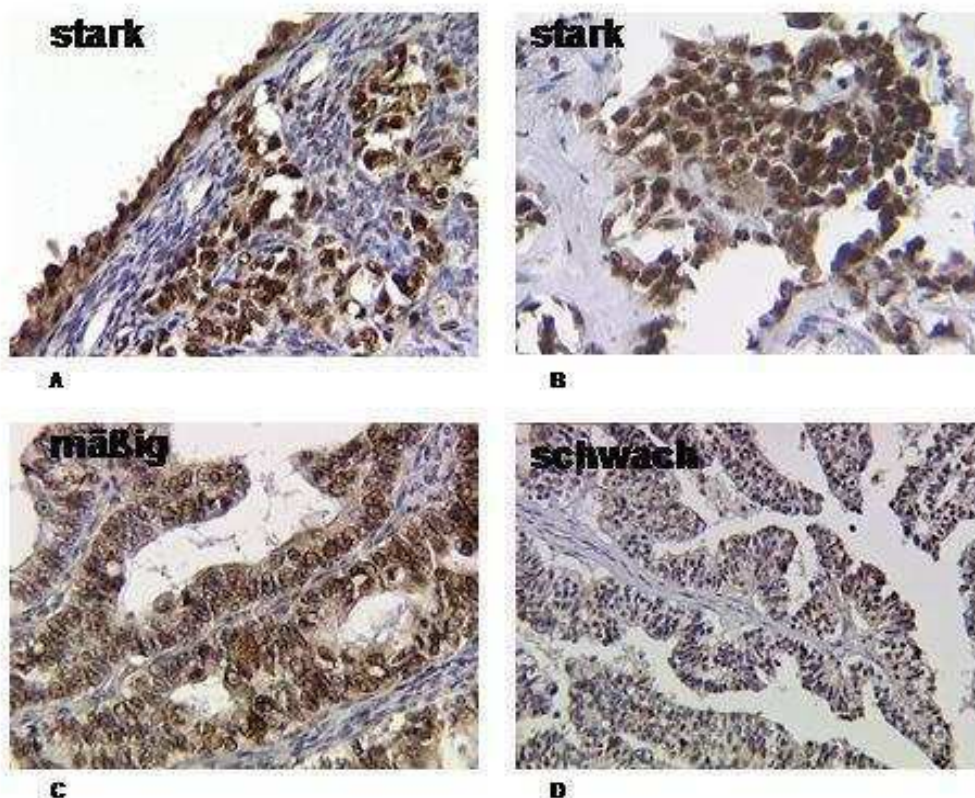


Abb.14

Abb.14 zeigt Ovarialkarzinomgewebe mit unterschiedlich starker MTA3-Expression. In Bild 1A/B scheint MTA3 eindeutig stärker exprimiert gegenüber Bild 1C mit mäßig starker und Bild 1D mit schwacher MTA3-Expression. Insgesamt konnten wir mit fortschreitender Entdifferenzierung eine schwächere MTA3-Färbung beobachten.

Eine MTA3-Expression findet sich auch im Oberflächenepithel (Abb.17, S.43) und in den Granulosazellen (Abb.17, S.43) der Follikel des normalen, gesunden Eierstockgewebes. Das Oberflächenepithel ist einschichtig und gilt, wie anfangs schon beschrieben, in 90% der Fälle als Ursprung einer malignen ovariellen Neoplasie [70]. Zusätzlich haben wir eine starke Färbung der Endosalpinx-Zellen (Abb.17, S.43) im normalen Ovar beobachten können.

Anhand der immunhistochemischen Analyse konnten wir auch die unterschiedliche MTA1-Expression in Korrelation zum Tumorstadium beobachten. Wie MTA3 zeigte auch MTA1 eine Kernfärbung (Abb.15, S.40). Im Gegensatz zu MTA3 wurde die Färbung allgemein stärker, je undifferenzierter der Tumor. Es folgen Beispielfotos mit starker (Abb.15, A/B), mäßiger (Abb.15 C) und schwacher (Abb.15 D) MTA1-Expression:

MTA1

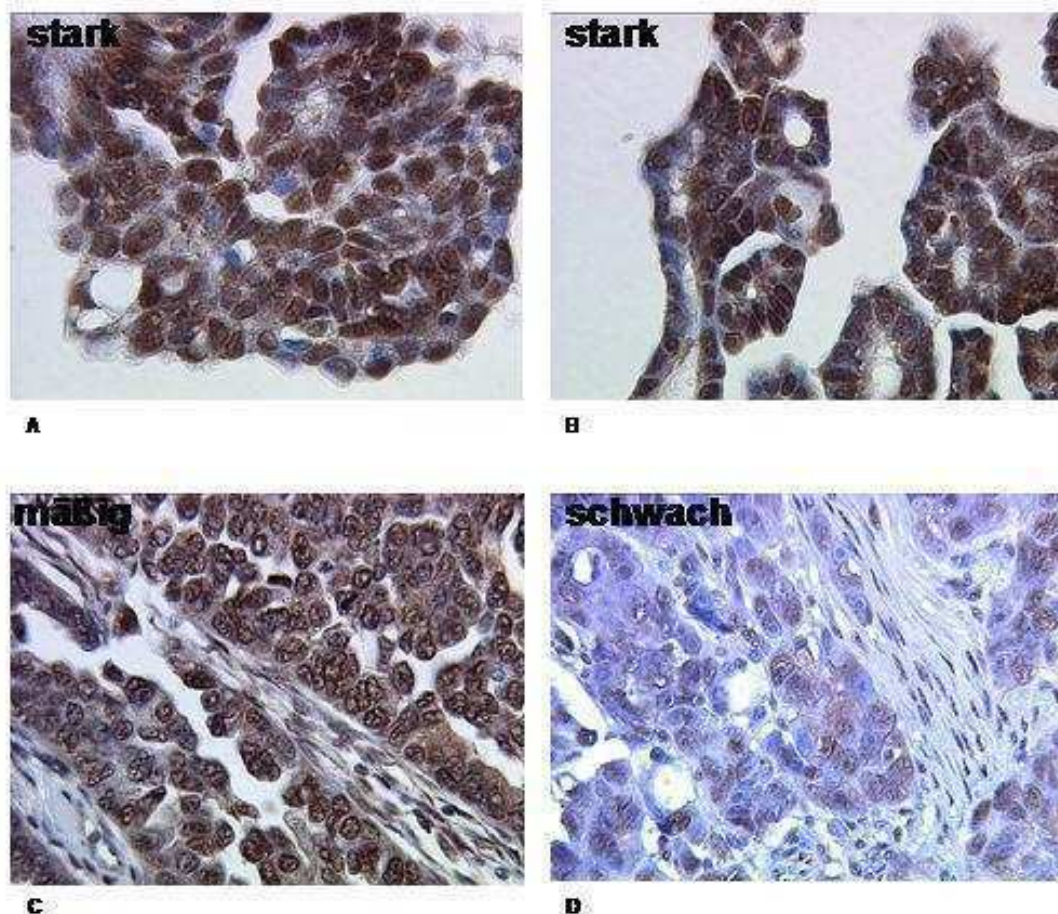


Abb.15

Die nachfolgenden Bilder (Abb.16, S.42) zeigen die Expression der beiden Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β sowie das Zelladhäsionsmolekül E-cadherin und das dritte MTA-Familienmitglied MTA2. Für jedes Protein haben wir zum einen eine Gewebeprobe mit starker Färbung (Abb.16 links, S.42) ausgewählt und zum anderen ein Tumorstadium mit schwacher Färbung (Abb.16 rechts, S.42). Bei ER- β zum Beispiel konnten wir feststellen, dass noch gut differenzierte Gewebeproben im Allgemeinen eine viel stärkere ER- β -Expression aufweisen als die schlecht differenzierten G3-Tumore, mit schwacher bis hin zu gar keiner ER- β -Expression. Auch beim zweiten Östrogenrezeptor, dem ER- α zeigte sich ähnliches. Auch dieses Protein lag im G1-Stadium stärker angefärbt vor als im G3-Stadium.

Die Ergebnisse unserer Beobachtungen zu E-cadherin -verantwortlich für die Zell-Zell-Verbindungen, korrelierten mit denen von MTA3 und den beiden Östrogenrezeptoren. Auch hier fiel die Protein-Expression von G1 nach G3 ab.

MTA2 zeigte in seiner Präsenz dagegen keine großen Veränderungen von G1 nach G3. Das Protein war durchgehend relativ stark vertreten und fand sich sogar in den Zellkernen von Fibroblasten (Abb.16 unten, S.42).

Es folgen Aufnahmen mit denselben Proteinen, zusätzlich mit MTA1 und MTA3 (Abb.17, S.43). Analysiert haben wir hier die Expression der genannten Proteine im normalen, gesunden Ovargewebe und dabei den Granulosazellen (Abb.17 mitte, S.43) und dem Oberflächenepithel (Abb.17 links, S.43) besondere Aufmerksamkeit zukommen lassen. Während dieser Versuche haben wir zusätzlich entdeckt, dass die Endosalpinx (Abb.17 rechts, S.43), jene Struktur, die das Ei nach der Ovulation in der Tuba weitertransportiert, bei allen hier verwendeten Proteinen eine starke Färbung aufweist.

MTA3 war hier im normalen Ovar durchweg stark exprimiert, ob in Granulosazellen, Oberflächenepithel oder in den Endosalpinx (Abb.17, S.43). Auch ER- α und ER- β konnten wir in jeder Struktur beobachten, insbesondere in den Östrogen-produzierenden Granulosazellen. E-cadherin war wie zu erwarten hauptsächlich im Oberflächenepithel nachzuweisen. In den Granulosazellen zeigte das Zelladhäsionsmolekül dagegen keine Präsenz.

MTA1 wird im normalen Ovargewebe eher schwach exprimiert (Abb.17, S.43). Granulosazellen, Oberflächenepithel und Endosalpinx ließen sich mit Hilfe des MTA1-Antikörpers anfärben.

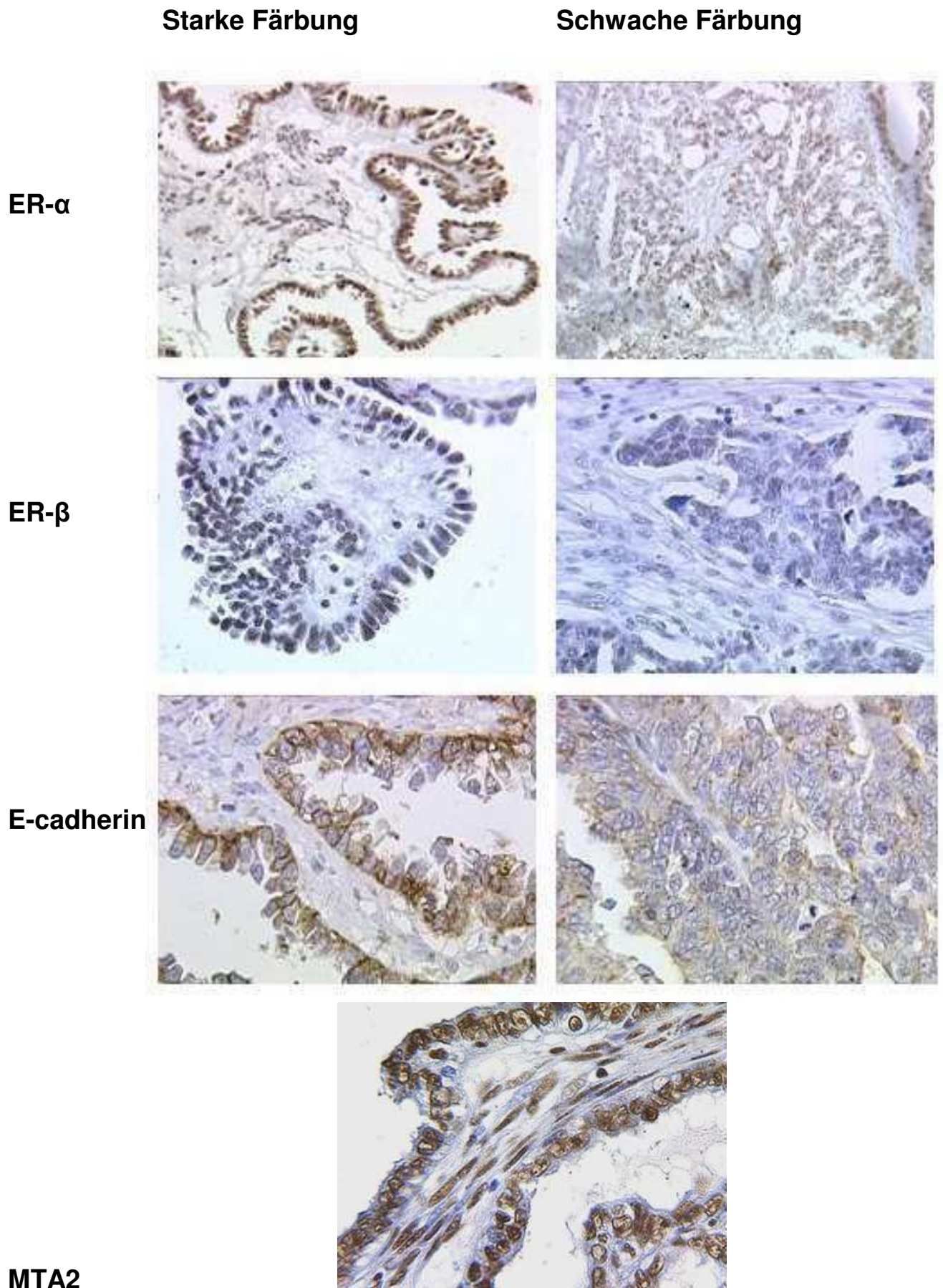


Abb.16

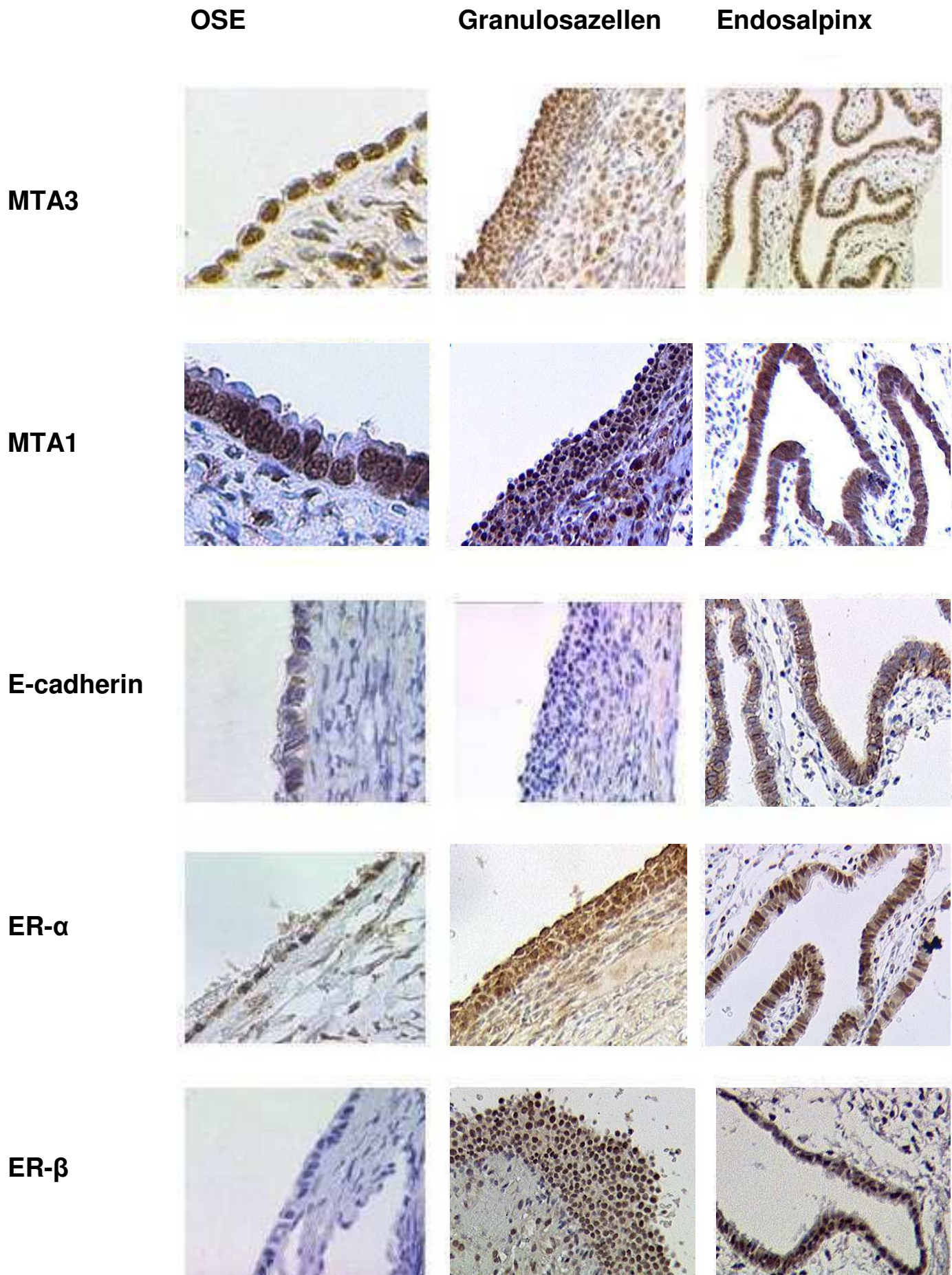


Abb.17

4.2 Diagrammauswertungen

Die 115 Gewebeschnitte wurden von uns wie oben beschrieben mit Hilfe des IRS-Scores ausgewertet, die Tumorstadien daraufhin sortiert und zum einen die Mittelwerte der Proteinexpression gegenüber dem „Grading“ und dem „Staging“ in Diagrammen dargestellt (Abb.18, S.45). Zum anderen haben wir zusätzlich die Ergebnisse von MTA1 und MTA3 hinsichtlich des Medians analysiert und mit Hilfe einer Boxplot-Graphik veranschaulicht (Abb.18, S.47). Mit der Anwendung eines speziellen Statistikprogramms (SPSS) hatten wir die Möglichkeit, eine Signifikanz bezüglich Anstieg oder Abfall der jeweiligen Proteinexpression, von Tumorstadium G1 nach G3 sowie von FIGO I nach FIGO III/IV nachweisen zu können.

Anhand des Mann-Whitney-Tests wurden die Mittelwerte aller von uns ausgewerteten Protein-Expressionen (beide Östrogenrezeptoren, MTA1 und MTA3 sowie E-cadherin), zwischen Differenzierungsgrad G1 und G2/G3 (Tab.10, S.44), sowie die verschiedenen FIGO-Stadien (Tab.11, S. 44) miteinander verglichen und folgende Ergebnisse berechnet:

	ERalpha	ERbeta	MTA1	MTA3	ECadherin
Mann-Whitney-U	793,500	883,500	450,000	840,000	962,000
Wilcoxon-W	4363,500	4453,500	750,000	4326,000	4532,000
Z	-3,037	-1,753	-4,257	-2,290	-1,209
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,002	,080	,000	,022	,227

a. Gruppenvariable: Grading123

Tab.10

	ERalpha	ERbeta	MTA1	MTA3	ECadherin
Mann-Whitney-U	881,000	730,500	603,000	852,000	869,000
Wilcoxon-W	5067,000	4825,500	834,000	1105,000	4874,000
Z	-,947	-1,645	-2,457	-,984	-,832
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,344	,100	,014	,325	,405

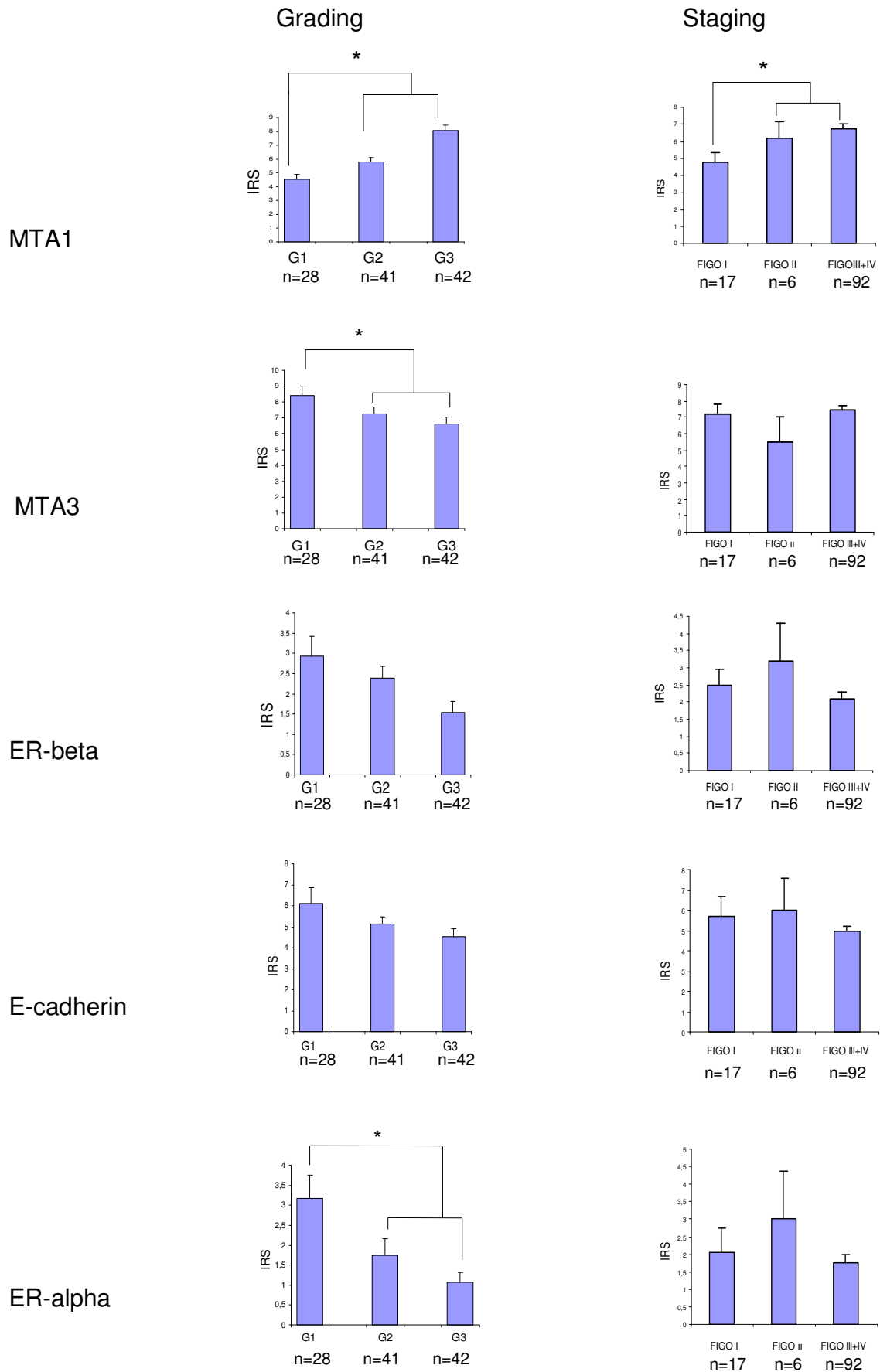
a. Gruppenvariable: FIGO1234

Tab.11

Dabei haben wir von G1 nach G2/G3 mit $p=0,000$ (Tab.10, S.44) eine deutliche Signifikanz in der MTA1-Hochregulation bei der Progression des Ovarialkarzinoms erhalten (Abb.18, S.45). Unter Verwendung der FIGO-Klassifikation zeigte sich von FIGO I/II nach FIGO III/IV eine Signifikanz von $p=0,014$ (Tab.11, S.44 und Abb.18, S.45). Die Expression von MTA3 hingegen nahm hinsichtlich des Tumorgradings signifikant von G1 nach G2/G3 ab ($p=0,022$) (Tab.10 und Abb.18, S.45). Auch ER- β , sowie das Zelladhäsionsmolekül E-cadherin, waren in fortschreitendem Tumorstadium weniger zu finden als im noch gut differenzierten Ovargewebe (Abb.18, S.45). Bezüglich der ER- α -Expression erhielten wir, G1 verglichen mit G2/G3, eine Signifikanz von $p=0,002$ (Tab.10, S.44 und Abb.18, S.45).

Im Folgenden wurden unsere Ergebnisse von mir in Diagrammen verarbeitet:

Abb.18



Wie bereits erwähnt, haben wir unsere Daten für MTA1 und MTA3 zusätzlich in einem Boxplot dargestellt.

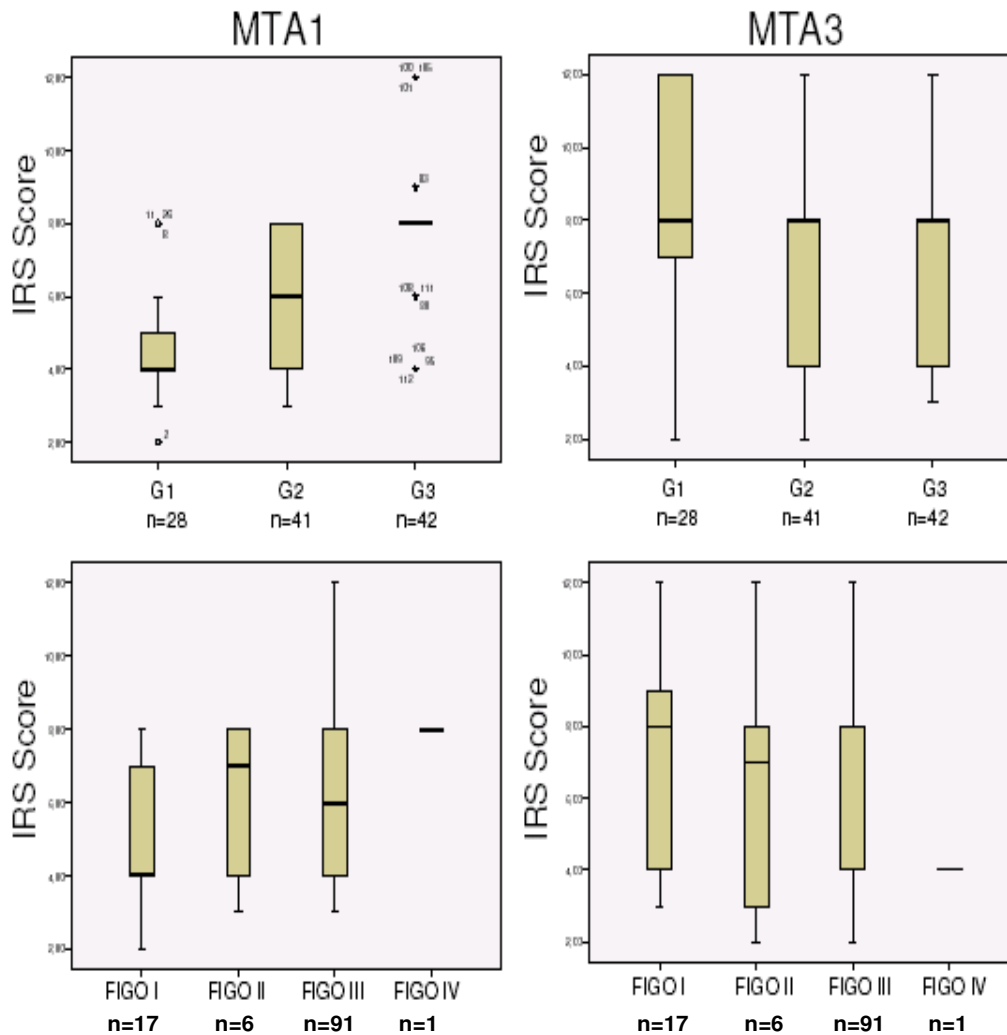


Abb.19

In einer Boxplot-Analyse wird das Maß der zentralen Tendenz, Streuung und Schiefe im Diagramm zusammengefasst. Als wichtiges Element ist der Median eingezeichnet, der durch seine Lage Aufschluss über die Schiefe der Datenverteilung gibt. Die 75. Perzentile wird durch die obere, die 25. Perzentile durch die untere Begrenzung des Rechtecks markiert, die dadurch entstehenden Flächen werden Quartile genannt. Das Rechteck enthält 50% der Messwerte und besteht aus den beiden Quartilen. Die Länge der Box, auch als Interquartilabstand bezeichnet, ist ein Maß für die Streuung der Werte. Die vertikalen Linien, Whisker genannt, entsprechen maximal dem 1,5fachen des Interquartilabstands. Der untere Whisker ergibt das 2,5% Quantil, das obere das 97,5% Quantil. Es befinden sich somit 95% aller beobachteten Werte innerhalb der Whiskergrenzen. Darüber oder darunter liegende

Werte werden als Ausreißer angegeben. Treten diese Ausreißer mehr als eineinhalb Boxplotlängen außerhalb auf, werden sie mit einem Kreis markiert, liegen sie mehr als drei Boxplotlängen außerhalb, so erfolgt die Markierung mit einem Stern.

Mit einem mittleren IRS-Wert von „4“ beim noch differenzierten Karzinom (G1) gegenüber einem mittleren IRS-Wert von „8“ beim schlecht differenzierten Karzinom (G3) (Abb.19 links oben, S.46) findet sich für MTA1 eine extrem hohe Signifikanz von $p=0,000$.

Es ist kaum Streuung vorhanden. Auch nach FIGO-Klassifikation liegt der Median von FIGO I bei $IRS=4$ während sich die Werte von FIGO III (Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen) um $IRS=6$ gruppieren (Abb.19 links unten, S. 46), was eine Signifikanz von $p=0,016$ ergibt.

Wird der MTA3-Boxplot betrachtet, lässt sich von G1 nach G2 oder G3 ein leichter Abfall der Protein-Expression feststellen (Abb.19 rechts oben, S.46). Hinsichtlich des Medians konnten wir aber weder nach dem Tumorstaging noch dem Tumorgrading eine statistisch signifikante Veränderung nachweisen.

4.3 Korrelationen

Nachdem die Abhängigkeit von MTA3/ MTA1/ ER und E-cadherin untereinander schon in mehreren Tumor-Studien nachgewiesen worden ist, haben wir mit nachfolgender Tabelle versucht, anhand unserer Ergebnisse und mit Hilfe des Spearman-Rho Korrelations-Koeffizient., die Korrelationen dieser Proteine beim Ovarialkarzinom aufzuschlüsseln. Eine Signifikanz ergibt sich mit $p < 0,05$.

	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
MTA1 vs. MTA3	0,087	0,38	106
MTA1 vs. ER- α	-0,130	0,182	107
MTA1 vs. ER- β	-0,273	<u>0,005*</u>	106
MTA1 vs. E-cadherin	-0,017	0,862	107

MTA3 vs. ER- α	0, 100	0, 298	111
MTA3 vs. ER- β	0, 113	0, 239	110
MTA3 vs. E-cadherin	0, 137	0, 155	110

ER- α vs. ER- β	0, 220	<u>0, 025*</u>	111
ER- α vs. E-cadherin	0, 066	0, 491	111

ER- β vs. E-cadherin	0, 212	<u>0, 026*</u>	110
----------------------------	--------	-----------------------	-----

Tab.12

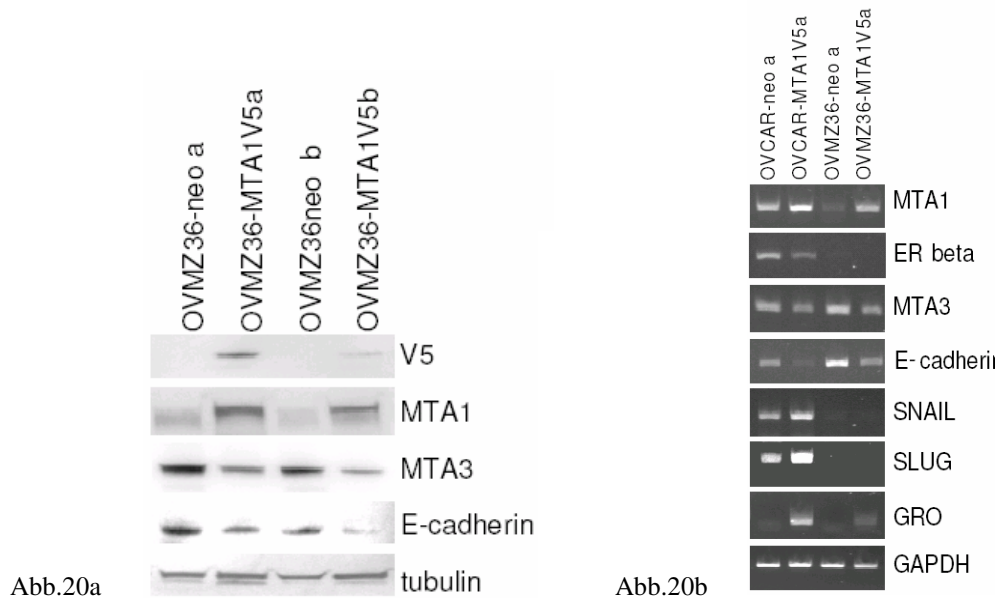
Mit obiger Tabelle (Tab.12) konnten wir interessante Signifikanzen feststellen. Zwischen MTA1 und ER- β scheint mit $r=-0,273$ und $p=0,005$ eine eindeutig signifikante und statistisch sehr relevante negative Korrelation vorzuliegen. Weiter haben wir eine positive Korrelation zwischen ER- β und E-cadherin ($r=0,212$; $p=0,026$) sowie zwischen ER- β und ER- α ($r=0,220$; $p=0,025$) gefunden. Die übrigen Proteine scheinen untereinander keine statistisch signifikante Korrelation zu besitzen.

4.4 Ergänzende Experimente

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten eine auffallende Regulation der MTA1 Expression beim Ovarialkarzinom und eine bislang noch nicht beschriebene negative Regulation des ER- β durch MTA1. Um zu zeigen, dass MTA1 beim Ovarialkarzinom tatsächlich ein direkter Repressor des ER- β ist, wurde parallel zu den von mir vorgenommenen immunhistochemischen Untersuchungen in der molekularbiologischen Abteilung der Frauenklinik die MTA1 cDNA in einen eukaryontischen Expressionsvektor mit zusätzlichem V5-Epitop kloniert und mit diesem Expressionsplasmid aus der OVMZ-36 Ovarialkarzinomzelllinie mehrere MTA1-überexprimierende Zellklone generiert. Die Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR3 wurde hinzugefügt. Diese molekularbiologischen Arbeiten wurden primär von Mitarbeitern des Instituts vorgenommen. Die MTA1-überexprimierenden Zellklone sollen jedoch hier kurz vorgestellt werden, weil diese wiederum Grundlage weiterer von mir vorgenommener immunzytologischer Arbeiten waren

(s.u.), als auch durch die Bestätigung der immunhistochemischen Ergebnisse wichtige Grundlagen für die Diskussion der hier erzielten immunhistologischen Ergebnisse sind.

Abb.20a zeigt anhand eines Western Blots (von Mitarbeitern durchgeführt), dass MTA1-V5 überexprimierende Zellklone eine verminderte MTA3 und E-cadherin Expression gegenüber den Kontroll-Zellklonen (neo) aufweisen. Von diesen Zellklonen wurden anschließend von mir immunhistochemische Färbungen vorgenommen, insbesondere auch weil einige der für die Immunhistochemie verwendete Antikörper (ER- β) sich nicht für Western Blot Analysen eigneten. Zusätzlich wurden hierbei auch noch die Antikörper für SNAIL und GRO verwendet, die bei den Paraffinschnitten, wie auch im Western Blot nicht geeignet war.



Über die RT-PCR (Abb.20b, S.49) sollte sich herausstellen, ob und wenn ja, welchen reprimierenden Transkriptionsmechanismen die Proteine unterliegen und welche Beziehung sie zueinander haben.

Auch hier wieder eine Abnahme der ER- β -Expression in der MTA1-überexprimierenden OVCAR3-Zelllinie, sowie kaum MTA3-Expression und wenig bis keine E-cadherin-Expression in beiden MTA1-überexprimierenden Zellklonen.

Gleichzeitig konnten die Transkriptionsfaktoren SNAIL und SLUG [11], bei denen angenommen wird, dass sie die E-cadherin-Expression unterdrücken und SNAIL selbst von MTA3 gehemmt wird [22], in den MTA1-überexprimierenden OVCAR3-Zellklonen, im Vergleich zu den Neomycin-resistenten Zellen, verstärkt nachgewiesen werden.

Wie auch bei der Immunfluoreszenz später zu beobachten, wird auch in der RT-PCR ein Anstieg des Angiogenese-fördernden Zytokins „GRO“ sichtbar. Diese zusätzlichen zell- und molekularbiologischen Untersuchungen bestätigen die in der IHC beobachteten Ergebnisse auf zellulärer Ebene. Vor allem die erstmal mittels der IHC beschriebene negative Korrelation zwischen MTA1 und Er- β .

4.5 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der folgenden Immunfluoreszenzen (Abb.21, S.51) ließen sich die Ergebnisse, die wir anhand der immunhistochemischen Methode erhalten hatten, bekräftigen. In den OVMZ36- MTA1 V5 Zellklonen liegt das MTA1-Protein deutlich überexprimiert vor, während gleichzeitig die MTA3-Expression und vor allem die ER- β -Expression verstärkt abnimmt.

Zusätzlich konnte in den MTA1 überexprimierenden Zellklonen gegenüber der Kontrollgruppen ein signifikanter Anstieg von GRO (growth-regulated oncogene), einem Zytokin mit stark onkogenem und angiogenem Potential beobachtet werden (Abb.21 unten, S.51). Ursprünglich wurde dieser Faktor in Melanoma-Zelllinien entdeckt [57].

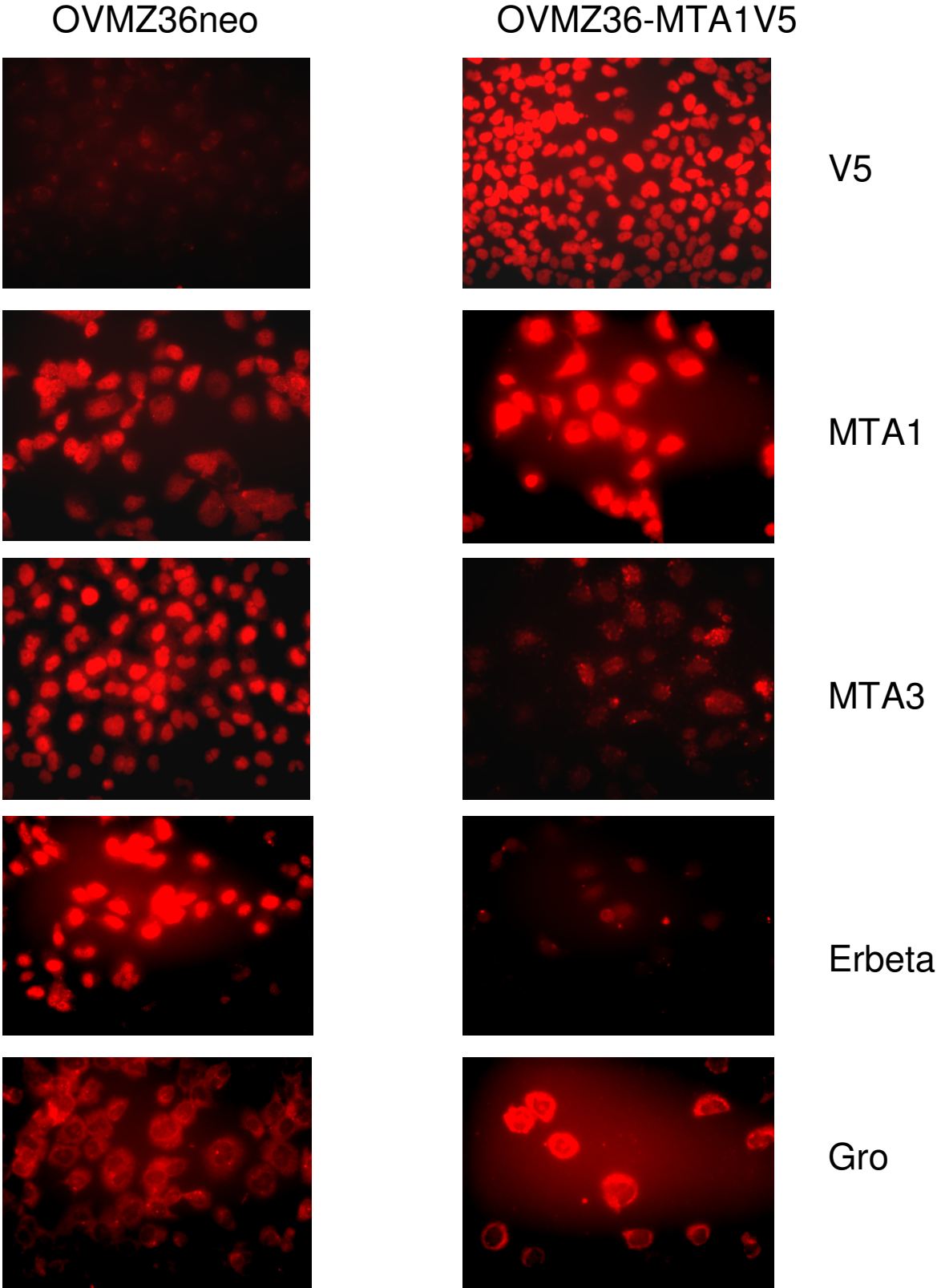


Abb.21

5 Diskussion

Anhand der immunhistochemischen Analyse hat sich zunächst die Annahme bestätigt, dass die MTA-Proteine, neben ihrer Funktion bei der Progression des Mammakarzinoms, auch bei der Progression des Ovarialkarzinoms von Bedeutung sind. Sie sind in der Zelle nukleär lokalisiert und werden auch im Oberflächenepithel des normalen Ovargewebes exprimiert, unterliegen, wie von mir gezeigt, im Verlauf der Tumorprogression jedoch eindeutig einer weiteren Regulation. Zusätzlich haben wir Proteine untersucht (wie ER- α , ER- β und E-cadherin), die scheinbar in direktem oder indirektem Zusammenhang mit den MTA-Proteinen stehen [22]. Wir konnten zeigen, dass MTA1, MTA3, sowie beide Östrogenrezeptoren auch in den Granulosazellen und der Endosalpinx präsent sind.

Unser ursprüngliches Ziel war es, die MTA3-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium beim Ovarialkarzinom zu untersuchen. Was wir anhand der mikroskopischen Analyse der serösen Ovarialkarzinompräparate feststellen konnten war folgendes: Im Oberflächenepithel des normalen Ovargewebes wird MTA3 scheinbar stark exprimiert, während das Tumorgewebe bei fortschreitender Entdifferenzierung weniger starke Färbungen aufwies, teilweise ging die MTA3-Expression auch verloren (Abb.14, S.39). Hinsichtlich der Mittelwerte konnten wir von G1 nach G2/G3, mit $p=0,022$ (Tab.10, S.44) eine statistisch signifikante Abnahme der MTA3-Expression zeigen. Prinzipiell wird auch bei den Medianen eine Abnahme der MTA3-Expression beobachtet, wenn auch weniger bedeutende Veränderungen als die zuvor berechneten signifikant abnehmenden Mittelwerte. Wir gehen davon aus, dass MTA3 auf Grund der schwächeren Expression beim fortschreitenden Ovarialkarzinom, entgegen seiner Namengebung, die letztendlich nur auf Genverwandtschaft beruht, eine eher tumorsuppressive Funktion besitzt. Somit könnte das Protein beim Ovarialkarzinom eine ähnliche Funktion aufweisen, wie in Studien zum Mammakarzinom schon beschrieben [31, 22]. Die zusätzlich durchgeführte Immunfluoreszenz (Abb.21, S.50), sowie die Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene zeigten, dass das MTA3 Protein in den MTA1-überexprimierenden Zellklonen, gegenüber den Zellkontrollklonen vermindert exprimiert wird.

Deutlich stärker als bei MTA3 beobachtet, scheint MTA1 bei der Progression des Ovarialkarzinoms eine noch viel größere Rolle zu spielen. Nach immunhistochemischer Analyse und Bewertung mit dem IRS, ließ sich ein statistisch signifikanter Anstieg von MTA1 bei zunehmendem Staging (FIGO; $p=0,014$) (Tab.11, S.44) und fortschreitender

Entdifferenzierung (Grading; $p=0,000$) (Tab.10, S.44) des Ovarialkarzinoms nachweisen. Mikroskopisch konnten wir ein eher schwach angefärbtes Oberflächenepithel im normalen, gesunden Ovargewebe feststellen (Abb.15, S.40), während MTA1 bei fortschreitendem malignem Tumorstadium verstärkt exprimiert vorliegt (Abb.15, S.40). Im Gegensatz zu den eher geringen Veränderungen der MTA3-Expression konnte bei der MTA1-Expression auch eine hohe Signifikanz bezüglich der Median-Werte nach FIGO ($p=0,016$) und Grading ($p=0,000$) nachgewiesen werden. Es scheint so, als ob die MTA1-Expression auch hier beim Ovarialkarzinom, wie vorher schon beim Mammakarzinom [31, 93, 94] und einigen weiteren Karzinomarten [87-91] beschrieben, eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielt.

Weiter haben wir uns mit den Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β beschäftigt, die bis zum heutigen Zeitpunkt ein kontrovers diskutiertes und noch relativ ungeklärtes Thema bezüglich des Ovarialkarzinoms darstellen. Die immunhistochemische Analyse ergab eine starke Anfärbung der Granulosazellen im normalen Ovargewebe bezüglich beider Östrogenrezeptoren (Abb.17, S.43). In den Granulosazellen des Ovars wird die Vorstufe von Östrogen, die in den Thecazellen produziert wird, in Östrogen umgewandelt [33, 44]. Wir konnten hinsichtlich FIGO-Klassifikation und Grading einen Abfall der ER- β -Expression beobachten sowie mit $p=0,002$ eine signifikante Deregulierung ER- α s von G1 nach G2/G3 (Tab.10, S. 44). Damit können wir uns einer Studie von Lazennec [33] anschließen, in der bereits eine verminderte ER- β -Expression in Ovarialkarzinomgewebe gegenüber normalem gesundem Gewebe beschrieben wurde. Sowie vielen weiteren Studien verschiedenster Karzinomarten [49, 50, 51, 52], in denen eine verminderte ER- β -Expression nachgewiesen worden war. Die Mechanismen hierfür sind bisher aber noch unklar. Einem Bericht von Cunat et al zufolge [55], soll in malignen Tumorzellen des Ovars eine verstärkte ER- α -Expression vorliegen, was wir mit unserer Studie jedoch nicht bestätigen konnten. Nachdem sich sogar eine positive Korrelation zwischen ER- α und ER- β (Tab.12, S.48) feststellen ließ, hatte sich die Frage einer Gegenspielerfunktion der Östrogenrezeptoren für uns vorerst erübrigt.

Mit E-cadherin als Zelladhäsionsmolekül, hatten wir einen weiteren Faktor gewählt, der mit in die Tumorprogression involviert ist, bezüglich der Metastasierung eine wichtige Rolle spielt und mit MTA1 und oder MTA3 scheinbar direkt oder indirekt interagiert [30, 86]. Im Oberflächenepithel des normalen Ovargewebes erhielten wir eine eher schwächere Anfärbung der Zellzwischenräume (Abb.17, S.43) [s. auch 70]. Die E-cadherin-Expression zeigte sich im Stadium des schlecht differenzierten Tumorgewebes gegenüber dem noch gut differenzierten Stadium jedoch als stark vermindert (s.Abb.18, S.45). Somit zeigte sich also auch hier eine

Deregulierung des Proteins bei fortschreitendem Karzinom, ähnlich dem Prinzip, welches bisher in der Fujita-Studie schon beim Mammakarzinom beschrieben worden war [22]. Zwischen ER- β und dem Zelladhäsionsmolekül E-cadherin konnten wir zusätzlich eine positive Korrelation feststellen (Tab.12, S.48).

Weitere Korrelationen. Statistisch hoch signifikant erwies sich die negative Korrelation von ER- β zu MTA1 mit $p=0,005$ (Tab.12, S.47). Damit konnten wir erstmalig mit Immunhistochemischen Daten, bekräftigt durch ergänzende zellbiologische Untersuchungen (s.,„Ergänzende Experimente“, S.48) zeigen, dass MTA1 eine reprimierende Wirkung auf den ER- β hat. Bei Durchführung einer RT-PCR (Abb.20b, S.49) durch die Labormitarbeiter, wurde die ER- β -RNA in den MTA1-überexprimierenden Zellklonen, gegenüber den Kontrollzellklonen, vermindert exprimiert. Dieses Ergebnis konnte anhand einer Immunfluoreszenz (Abb.21, S.51) von mir bestätigt werden. MTA1 wurde von uns somit als ein direkter Repressor des ER- β s identifiziert. Diese Gegebenheiten bestärkt die Vermutung, ER- β könnte beim Ovarialkarzinom eine eher tumorsuppressive Aktivität bezüglich der Tumorprogression besitzen [33].

Die Durchführung der ergänzenden molekularbiologischen Untersuchungen (Abb.20a und b, S.49) verdeutlichen die immunhistochemischen Ergebnisse. In den MTA1-überexprimierenden Zellklonen wird neben ER- β und MTA3 auch E-cadherin vermindert exprimiert. Das heißt, liegt MTA1 überexprimiert vor, so wird die ER- β -Expression weniger, nimmt ER- β ab so wird auch E-cadherin vermindert exprimiert. Was damit aber natürlich noch nicht geklärt ist, ob ER- β und oder MTA1 direkt oder indirekt E-cadherin beeinflussen können und wenn indirekt, welche Ziel-Proteine dazwischen liegen.

Zusammenfassend gesagt, konnten wir laut der Immunhistochemischen Daten also einen statistisch signifikanten Anstieg von MTA1 hinsichtlich der FIGO-Klassifikation und des Gradings nachweisen, einen signifikanten Abfall von ER- α und MTA3 sowie eine verminderte Expression von E-cadherin und ER- β in Abhängigkeit vom fortschreitenden Tumorstadium. Wir erhielten eine negative Korrelation von MTA1 und ER- β , eine positive Korrelation zwischen ER- β und E-cadherin und nochmals eine positive Korrelation zwischen den beiden Östrogenrezeptoren. Die ergänzenden Experimente verdeutlichten diese Ergebnisse und zeigen, dass bei einer Überexpression vom Metastasen-assoziierten-Protein 1 die Proteine MTA3, ER- β , ER- α und E-cadherin vermindert exprimiert vorliegen (s.Abb.21 Immunfluoreszenz, S.51; molekularbiologische Untersuchungen Abb.20a und b, S.49).

Ein weiterer Faktor der in den ergänzenden Experimenten zur Sprache kommt, in dieser Studie bisher aber eher nur am Rande erwähnt wurde, ist der E-cadherin-Repressor SNAIL [95]. Auch SNAIL stellt ein wichtiges Mitglied des oben beschriebenen Pathways dar (Abb.19, S.21). Er wird von MTA3 inhibiert [22] womit seine eigentlich hemmende Wirkung auf die E-cadherin-Expression unterdrückt wird. Liegt MTA1 jedoch überexprimiert vor, wird die inhibierende Funktion MTA3s aufgehoben, SNAIL damit hochreguliert E-cadherin entsprechend vermindert exprimiert und folglich die Metastasierungsaktivität erhöht [22]. SNAIL konnte aufgrund eines für die Immunhistochemie mangelnden Antikörpers nicht untersucht werden und war nur in der PCR nachweisbar (Abb.20b, S.49). Als einen weiteren möglichen E-cadherin-Repressor beim Mammakarzinom, war der Transkriptionsrepressor SLUG [95] bekannt. So wurde experimentell die Expression der mRNA von SLUG und SNAIL bei MTA1 überexprimierenden Zellklonen und bei der Kontrollgruppe nachgewiesen. Während nur eine geringe Menge an SNAIL und SLUG in der Kontrollgruppe vorhanden war, zeigte vor allem SLUG eine signifikante Hochregulation in den MTA1 überexprimierenden bzw. MTA3-reduzierten Zellklonen (Abb.20b, S.49).

Weiter konnte in den MTA1 überexprimierenden Zellklonen gegenüber der Kontrollgruppen ein signifikanter Anstieg von GRO (growth-regulated oncogene), einem Zytokin mit stark onkogenem und angiogenem Potential beobachtet werden (s.Abb.21-Immunfluoreszenz S.51/ RT-PCR s.Abb.20a, S.49). Ursprünglich wurde dieser Faktor in Melanoma-Zelllinien entdeckt [57]. Die vermehrte GRO-Expression wurde hier erstmals in Zusammenhang mit Tumorgenese und Angiogenese gebracht [58]. Aber auch im Colon- [58/59] und Mundhöhlenkarzinom [60] scheint der Anstieg von GRO eine wichtige Rolle in der Tumorprogression zu spielen.

Das bedeutet, MTA1 ist stark involviert in der Regulation verschiedener Zielgene bei der Progression des Ovarialkarzinoms. MTA1 konnten wir mit Hilfe der zusätzlich durchgeführten funktionellen Versuche als einen wichtigen Faktor identifizieren, der dafür verantwortlich ist, dass MTA3, ER- β und damit indirekt E-cadherin reprimiert werden.

Wir können nun davon ausgehen, dass die beobachtete MTA1 Überexpression beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom gleichzeitig zu mehreren tumorfördernden Prozessen führt:

1. Verstärkung des onkogenen Potentials durch Repression des ER- β , von dem nach letztem Stand der Forschung beim Ovarialkarzinom eine eher tumorsuppressive Funktion angenommen wird.

2. Verstärkung des onkogenem Potentials sowie der Neoangionese durch Überexpression von GRO.
3. Erleichterung von Invasion und Metastasierung von Ovarialkarzinom-Zellen durch Erniedrigung der E-cadherin-Expression.

MTA1 stellt somit einen bedeutenden Faktor bei der Progression des Ovarialkarzinoms dar.

Eine Runterregulation oder Ausschaltung von MTA1 im Ovarialkarzinom würde somit einen interessanten therapeutischen Ansatz darstellen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, veröffentlicht in der Zeitschrift „Cancer Biology and Therapy“ im September 2008 [84] und in dieser bereits von anderen Wissenschaftlern diskutiert [85], können und sollten dazu beitragen, verstärkt nach einem solchen Ansatz zu suchen bzw. Grundlagen dafür zu legen.

6 Zusammenfassung

Die Metastasen assoziierten Proteine MTA1, MTA2 und MTA3 sind in ihrer Funktion Transkriptionsrepressoren und können damit die Transkription bestimmter Zielgene unterdrücken. Obwohl den Metastasen-assoziierten Proteinen eine wichtige Rolle beim Mammakarzinom zukommt, lagen für das ebenfalls Östrogenrezeptor-exprimierende Ovarialkarzinom bis dato keine Studien über die MTA3 bzw. kaum Studien über die MTA1-Expression vor. Laut der immunhistochemischen Daten wird MTA1 beim fortschreitenden Ovarialkarzinom bezüglich Tumorstaging und Tumorgrading statistisch hoch signifikant hochreguliert während MTA3, ER- β , ER- α und E-cadherin runterreguliert werden. MTA1 konnte von uns als ein sehr bedeutender Faktor in der Progression des Ovarialkarzinoms identifiziert werden und wurde deshalb Hintergrund weiterer Experimente, die auf molekularbiologischer Ebene von Mitarbeitern des Labors durchgeführt worden sind. Die negative Korrelation zwischen MTA1 und ER- β erwies sich mit $p=0,005$ (Tab.12, S.47) als statistisch hoch signifikant. Damit konnten wir erstmalig mit Immunhistochemischen Daten, bekräftigt durch ergänzende zellbiologische Untersuchungen (s. "ergänzende Ergebnisse" S.48 ff) zeigen, dass MTA1 eine reprimierende Wirkung auf den ER- β hat. Zusätzlich erhielten wir eine positive Korrelation zwischen ER- β und E-cadherin sowie zwischen den beiden Östrogenrezeptoren. Jedes genannte Protein lässt sich im normalen Oberflächenepithel finden und teilweise auch in Granulosazellen und Endosalpinx (s.Abb.17, S.43). Eine Basisexpression dieser Proteine ist damit offensichtlich für viele Zelltypen essentiell, vor allem da diese Proteine an der Regulation von Zelladhäsionsproteinen, Zytokinen etc. beteiligt sind.

Anhand der molekularbiologischen Untersuchungen ließen sich die immunhistochemischen Ergebnisse festigen. Mit Hilfe einer Immunfluoreszenz und der PCR konnten wir nachweisen, dass in MTA1-überexprimierenden Zellklonen die Proteine MTA3, ER- β , ER- α und E-cadherin vermindert exprimiert vorliegen. Gleichzeitig werden die tumorfördernden Proteine SNAIL, SLUG und GRO verstärkt exprimiert. Durch die Reprimierung von ER- β , der Überexpression von GRO und der Erniedrigung der E-cadherin Expression wird das onkogene Potential verstärkt und die Invasion und Metastasierung erleichtert.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Lippert, H. (2000) Lehrbuch Anatomie. 368-378.
- [2] Scully RE, Sobin LH (1999) World Health Organisation (WHO). International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Ovarian Tumours. Springer, Berlin Heidelberg
- [3] Scully RE, Young RH, Clement Ph B (1998) Atlas of tumor Pathology: Tumors of ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament. AFIP, Washington D.C.
- [4] Wittekind Ch, M.H.J., Bootz F (2002) TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage Springer, Berlin Heidelberg
- [5] Shimizu, Y., Kamoi, S., Amada, S., Akiyama, F. and Silverberg, S.G. (1998) Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. Cancer 82, 893-901.
- [6] Mayr, D. and Diebold, J. (2000) Grading of ovarian carcinomas. Int J Gynecol Pathol 19, 348-53.
- [7] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, e.V. (2006) Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 5.
- [8] National Cancer Institute (2003) SEER Cancer Statistics Review
- [9] Wagner G, Hermanek P, Wittekind Ch, Sinn HP (2002) Organspezifische Tumordokumentation – Prinzipien und Verschlüsselungsanweisungen für Klinik und Praxis. 2. Aufl. Online-Version: Deutsche Krebsgesellschaft, Frankfurt (Main).
www.krebsgesellschaft.de

- [10] Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG (1998) Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: Testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and followup. *Cancer* 82: 893–901
- [11] Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62:1613-8.
- [12] Hiddemann, Huber, Bartram; *Die Onkologie Teil 2*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004
- [13] Fathalla MF. Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;2(7716):163.
- [14] Jordan SJ, Whiteman DC, Purdie DM, Green AC, Webb PM; Does smoking increase risk of ovarian cancer? *Gynecol Oncol.* 2006 Dezember; 103 (3): 1122-9. Epub 2006 September 26.
- [15] Nicoletta Colombo, Toon Van Gorp, Gabriella Parma, Frederic Amant, Gemma Gatta, Cristiana Sessa, Ignace Vergote. Ovarian cancer; *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 60 (2006) 159-179
- [16] Gerber, Janni, Friese; *Gynäkologische Onkologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2006
- [17] Osterholzer HO, Streibel EJ, Nicosia SV. Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod.* 1985 August; 33 (1): 247-58.
- [18] Hartge P, Whittemore AS, Itnyre J, Mc Gowan L, Cramer D. Rates and risks of ovarian cancer in subgroups of white women in the United States. The Collaborative Ovarian Cancer Group. *Obstet Gynecol.* 1994 November; 84 (5): 760-4.

- [19] Harald Meden; Ovarialkarzinom, aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis; Walter de Gruyter Berlin, New York 1996
- [20] Wang, R., and Kumar, R. (2003). In the Identities of Membrane Steroid Receptors (Boston: Kluwer Academic Publishers), pp.119-124
- [21] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses. *J Biol Chem* 1994; 269: 22958-63
- [22] Fujita N, Jaye DL, Kajita M, Geigerman C, Moreno CS, Wade PA. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2):207-19.
- [25] Martin DI, Orkin SH. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev*. 1990 Nov;4(11):1086-98.
- [26] Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*. 1989 Nov 17;246(4932):931-6. Review.
- [27] SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins. *J Mol Biol*. 1989 May 5;207(1):61-84.
- [28] Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Cote J, Wang W. Related Articles, NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*. 1998 Dec;2(6):851-61.
- [29] Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D. Related Articles, The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*. 1998 Oct 16;95(2):279-89.

- [30] Nicolson GL, Nawa A, Toh Y, Taniguchi S, Nishimori K, Moustafa A. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell invasion, proliferation and nuclear regulation. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(1):19-24. Review.
- [31] Hao Zhang, L. Clifton Stephens, and Rakesh Kumar
Metastasis Tumor Antigen Family Proteins during Breast Cancer Progression and Metastasis in a Reliable Mouse Model for Human Breast Cancer
- [32] Cell 142, Another Tie that binds the MTA family to breast cancer
- [33] Gwendel Lacenec; Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian cancer; *Cancer Letters* 231 (2006) 151-157
- [34] M. Gambacciani, P. Monteleone, A. Sacco, A.R. Genazzani, Hormone replacement therapy and endometrial, ovarian and colorectal, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*17 (2003) 139-147
- [35] N.G. Hildreth, J.L. Kelsey, V.A. LiVolsi, D.B. Fischer, T.R. Holford, E.D. Mostow, et al., An epidemiologic study of epithelial carcinoma of the ovary, *Am. J. Epidemiol.*114 (1981) 398-405
- [36] H.P. Schneider, M. Birkhauser, Does HRT modify risk of gynecological cancers?, *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.*40 (suppl 1) (1995) 40-53
- [37] S. Mosselman, J. Polman, R. Dijkema, ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor, *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*392 (1996) 49-53
- [38] L.P. Menasce, G.R. White, C.J. Harrison, J.M. Boyle, Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple-post-FISH banding technique, *Genomics* 17 (1993) 263-265
- [39] S.T. Kelley, V.G. Thackray, Phylogenetic analysis reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms, *J. Mol. Evol.*49 (1999) 609-614.

- [40] J.F. Couse, K.S. Korach, Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?, *Endocr. Rev.* 20 (1999) 358-417
- [41] D.W. Schomberg, J.F. Couse, A. Mukherjee, D.B. Lubahn, M. Sar, K.E. Mayo, K.S. Korach, Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult, *Endocrinology* 140 (1999) 2733-2744.
- [42] S.G. Hillier, R.A. Anderson, A.R. Williams, M. Tetsuka, Expression of oestrogen receptor alpha and beta in cultured human ovarian surface epithelial cells, *Mol. Hum. Reprod.* 4 (1998) 811-815.
- [43] K. M. Lau, S.C. Mok, S. M. Ho, Expression of human estrogen-alpha and beta, progesteron receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 5722-5727
- [44] A.W. Brandenberger, M.K. Tee, R.B. Jaffe, Estrogen receptor alpha (ER- α) and beta (ER- β) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER- β in neoplastic tissues, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 1025-1028
- [45] J.L. Perez-Gracia, E.M. Carrasco, Tamoxifen therapy for ovarian cancer in the adjuvant an advanced settings; systematicc review of the literature and implications for future research, *Gynecol. Oncol.* 84 (2002) 201-209.
- [46] B.R. Rao, B.J. Slotman, Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer, *Endocr. Rev.* 12 (1991) 14-26.
- [47] M. Fujimura, T. Hidaka, K. Kataoka, Y. Yamakawa, S. Akada, A. Teranishi, S. Saito, Absence of estrogen receptor-alpha expression in human ovarian clear cell adenocarcinoma compared with ovarian serous, endometrioid, and mucinous adenocarcinoma, *Am. J. Surg. Pathol.* 25 (2001) 667-672.

- [48] P. Pujol, J.M. Rey, P.Nirde, P. Roger, M. Gastaldi, F. Laffargue et al., Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis, *Cancer Res.* 58 (1998) 5367-5373
- [49] P.Roger, M.E. Sahla, S. Makela, J.A. Gustafsson, P. Baldet, H. Rochefort, Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors, *Cancer Res.* 61 (2001) 2537-2541j
- [50] L.G. Horvath, S.M. Henshall, C.S. Lee, D.R. Head, D.I. Quinn, S. Makela, et al, Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer, *Cancer Res.* 61 (2001) 5331-5335
- [51] L.P. Stabile, A.L.G. Davis, C.T. Gubish, T.M. Hopkins, J.D. Luketich, N. Christie, et al., Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor α and β and show biological responses to estrogen, *Cancer Res.* 62 (2002) 2141-2150
- [52] E.F. Foley, A.A. Jazaeri, M.A. Shupnik, O. Jazaeri, L.W. Rice, Selective loss of estrogen receptor in malignant human colon, *Cancer Res.* 60 (200) 245-248
- [53] J. Kurebayashi, Endocrine-resistant breast cancer: underlying mechanisms and strategies for overcoming resistance, *Breast Cancer* 10 (2003) 112-119.
- [54] K.D. Hatch, J.B. Beecham, J.A. Blessing, W.T. Creasman, Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. A Gynecologic Oncology Group study of second-line therapy in 105 patients, *Cancer* 68 (1991) 269-271.
- [55] S. Cuna, P. Hoffmann, and P. Pujol, Estrogens and epithelial ovarian cancer, *Gynecologic Oncology* 94 (2004) 25-32
- [56] Roepman P, de Jager A, Groot Koerkamp MJ, Kummer JA, Slootweg PJ, Holstege FC.

- Maintenance of head and neck tumor gene expression profiles upon lymph node metastasis. *Cancer Res.* 2006;66:11110-4
- [57] Richmond A, Balentien E, Thomas HG, Flaggs G, Barton DE, Spiess J, Bordoni R, Francke U, Derynck R. Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to beta-thromboglobulin. *EMBO J.* 1988;7:2025-33
- [58] Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N, Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukoc Biol.* 2000;67:53-62
- [59] Wen Y, Giardina SF, Hamming D, Greenman J, Zachariah E, Bacolod MD, Liu H, Shia J, Amenta PS, Barany F, Paty P, Gerald W, Notterman D. GROalpha is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and down-regulates fibulin-1. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5951-9.
- [60] Shintani S, Ishikawa T, Nonaka T, Li C, Nakashiro K, Wong DT, Hamakawa H. Growthregulated oncogene-1 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human oral cancer. *Oncology.* 2004;66:316-22
- [61] Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung; J.Diebold, P.Dettmar, J.Nährig; MANUAL Maligne Ovarialtumoren; 2007 by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München
- [62] Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ (2002) Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: A meta-analysis. *J Clin Oncol* 20(5): 1248-1259
- [63] Systemische Primätherapie; A. Burges, W. Janni, C.Kümper, L.Lutz, P.E. Petrides, St. Pildner von Steinburg, M. Schwoerer, S. Sintz, K. Späthe, H. Beyreuther, Ch. Neuhofer; 2007 by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München

- [64] Nicosia SV, Saunders BO, Acevedo-Duncan ME, Setrakian S., Degregorio R 1991;
Biopathology of ovarian mesothelium. In: Familiari G, Makabe S, Motta PM (eds)
Ulltrastructure of the Ovary.
Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp 287-310
- [65] Van Blerkom J, Motta PM (eds) 1979;
The ovary prior to ovulation.
In: The Cellular Basis of Mammalian Reproduction. Urban & scharzenberg,
Baltimore, pp 5-51
- [66] Nicosia SV, Johnson JH 1984;
Surface morphology of ovarian mesothelium (surface epithelium) and of other pelvic
and extrapelvic mesothelial sites in the rabbit. *Int J Gynecol Pathol* 3:249-260
- [67] Nicosia SV, Nicosia RF 1988 Neoplasms of the ovarian mesothelium. In: Azar HA
(ed) *Path of Human Neoplasms*. Raven Press, New York, pp 435-486
- [68] Herbst AL 1994 The epidemiology of ovarian ccarcinoma and the current status of
tumor markers to detect disease. *Am J Obstet Gynecol* 170:1099-1105
- [69] Auersperg N, Edelson MI, Mok SC, Johnson SW, Hamilton TC
1998 The biology of ovarian cancer. *Semin Oncol* 25:281-304
- [70] Auersperg N., Alice S.T. Wong, Kyung-Chul Choi, Sung Keun Kang, Peter C.K.
Leung; *Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology*.
Department of Obstetrics and Gynaecology, British Columbia Women`s Hospital,
University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, V6H 3V5, Canada
- [71] Jacobs I, Bast Jr RC 1989 The CA 125 tumor-associated antigen: a review of the
literature. *Hum Reprod* 4:1-12

- [72] Kabawat SE, Bast Jr RC, Bhan AK, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB 1983 Tissue distribution of coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC-125. *Int J Gynecol Pathol* 2:275-85
- [73] Siemens CH, Auersperg N 1988 Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture. *J Cell Physiol* 134:347-356
- [74] Blaustein A, Lee H 1979 Surface cells of the ovary and pelvic peritoneum: a histochemical and ultrastructure comparison. *Gynecol Oncol* 8:34-43
- [75] Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG, Kruk PA 1994 Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest* 71:510-518
- [76] Zhang S, Zhang HS, Cordon-Cardo C, Ragupathi G, Livingston PO 1998 Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: protein antigens. *Clin Cancer Res* 4:2669-2676
- [77] Kruk PA, Uitto VJ, Firth JD, Dedhar S, Auersperg N 1994 Reciprocal interactions between human ovarian surface epithelial cells and adjacent extracellular matrix. *Exp Cell Res* 215:97-108
- [78] Cruet S, Salamanca C, Staedel C, Auersperg N 1999 $\alpha v\beta 3$ /Vitronectin expression by normal ovarian surface epithelial cells: role in cell adhesion and cell proliferation. *Gynecol Oncol* 75:254-260
- [79] Sunfeldt K, Piontkewitz Y, Ivarsson K, Nilsson O, Hellberg P, Brannstrom M, Janson P-O, Enerback S, Hedin L 1997 E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and the normal ovary. *Int J Cancer* 74:275-280
- [80] Davies BR, Worsley SD, Ponder BA 1998 Expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancers. *Histopathology* 32:69-80

- [81] Wong AST, Maines-Bandiera SL, Rosen B, Wheelock MJ, Johnson KR, Leung PCK, Roskelley CD, Auersperg N 1999 Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *Int J Cancer* 81:180-188
- [82] Maines Bandiera SL, Auersperg N 1997 Increases E-cadherin expression in ovarian surface epithelium : an early step in metaplasia and dysplasia ? *Int J Gynecol Pathol* 16:250-255
- [83] Osterholzer H, Streibel EJ, Nicosia SV 1985 Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* 33:247-258
- [84] Dannenmann C, Shabani N, Friese K, Jeschke U, Mylonas I, Brüning A. The metastasis-associated gene MTA1 is upregulated in advanced ovarian cancer, represses ERbeta, and enhances expression of oncogenic cytokine GRO. September 2008, Pages: 1462 – 1469
- [85] Murakami M, Kaul R, Robertson ES. MTA1 expression is linked to ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* 2008 Sep 30;7(9).
- [86] Manavathi B, Singh K, Kumar R. MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology. *Nucl Recept Signal* 2007; 5:10.
- [87] Toh Y, Oki E, Oda S, Tokunaga E, Ohno S, Maehara Y, Nicolson GL, Sugimachi K. Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis. *Int J Cancer.* 1997 Aug 22;74(4):459-63
- [88] Toh Y, Kuwano H, Mori M, Nicolson GL, Sugimachi K. Overexpression of metastasis-associated MTA1 mRNA in invasive oesophageal carcinomas. *Br J Cancer.* 1999 Apr;79(11-12):1723-6.

- [89] Iguchi H, Imura G, Toh Y, Ogata Y. Expression of MTA1, a metastasis-associated gene with histone deacetylase activity in pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 2000 Jun;16(6):1211-4.
- [90] Sasaki H, Moriyama S, Nakashima Y, Kobayashi Y, Yukiue H, Kaji M, Fukai I, Kiriya M, Yamakawa Y, Fujii Y. Expression of the MTA1 mRNA in advanced lung cancer. *Lung Cancer.* 2002 Feb;35(2):149-54.
- [91] Hofer MD, Kuefer R, Varambally S, Li H, Ma J, Shapiro GI, Gschwend JE, Hautmann RE, Sanda MG, Giehl K, Menke A, Chinnaiyan AM, Rubin MA. The role of metastasis-associated protein 1 in prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2004 Feb 1;64(3):825-9.
- [92] Simpson A, Uitto J, Rodeck U, Mahoney MG. Differential expression and subcellular distribution of the mouse metastasis-associated proteins Mta1 and Mta3. *Gene.* 2001 Jul 25;273(1):29-39.
- [93] Jang KS, Paik SS, Chung H, Oh YH, Kong G. MTA1 overexpression correlates significantly with tumor grade and angiogenesis in human breast cancers. *Cancer Sci.* 2006 May;97(5):374-9.
- [94] Tong D, Heinze G, Schremmer M, Schuster E, Czerwenka K, Leodolter S, Zeillinger R. Expression of the human MTA1 gene in breast cell lines and in breast cancer tissues. *Oncol Res.* 2007;16(10):465-70.
- [95] Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Tropé CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer.* 2005 Apr 15;103(8):1631-43.

Abbildungen

Abb.1, Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane, Kiechle, Gynäkologie und Geburtshilfe, Elsevier GmbH, www.studentconsult.de (S.2)

Abb. 2, Schafsovar; www.wikipedia.de (S.2)

Abb.3, Das Ovar; Welsch-Histoatlas, Urban und Fischer, 1.Auflage 2003 (S.4)

Abb.4, Follikelreifung + Ovulation; www.wikipedia.de (S.5)

Abb.5, Histologische Ausschnitte von Eileiter und Endosalpinx; Welsch-Histoatlas, Urban und Fischer, 1.Auflage 2003 (S.5)

Abb.6, Nelly Auersperg, Alice S. T. Wong, Kyung-chul Choi, Sung Keun Kang, and Peter C. K. Leung

Department of Obstetrics and Gynaecology, British Columbia Women's Hospital, University of British

Columbia, Vancouver, British Columbia, V6H 3V5, Canada

Ovarian surface epithelium: Biology, Endocrinology and Pathology, Fig.1

(S.12)

Abb.7 Bramanandam Manavathi and Rakesh Kumar[†], The Metastasis Tumor Antigens- an Emerging Family of Multifaceted Master Coregulators* (S.19)

Abb.8

Abb.9 P.J. Barnes, I.M. Adcock and K. Ito, REVIEW, Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases (S.21)

Abb. 10/11, Nasoyuki Fujiita, David L. Jaye, Masahiro Kajita, Cissy Geigerman, Carlos S. Moreno, and Paul A. Wade

Emory University School of Medicine

Department of Pathology and Laboratory Medicine

MTA3, a Mi-2/NuRD Complex Subunit, Regulates an Invasive Growth pathway in Breast Cancer (Fig.1 A, S.21; Fig.5 E, S.23)

Abb.12, Gwendal Lazennec ; cancer letters 231 (2006) 151-157; Mini review; Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis
Fig.1 (S.25)

Tabellen

Tab. 1/2/4/5/6/7/8, Tabellen- Inzidenz an malignem Ovarialkarzinom zu erkranken + Altersverteilung bei Diagnosestellung; Tumorzentrum München (S.8/9)

Tab. 3/9, Tabelle- Risiko bei Familienanamnese; Gerber, Janni, Friese; Gynäkologische Onkologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2006 (S.8)

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben. Für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. med. Klaus Friese, Chefarzt der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt der LMU München. Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Ansgar Brüning danken, für die Betreuung dieser Arbeit sowie seiner unermüdlich tatkräftigen Unterstützung. Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Udo Jeschke bedanken, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und stets ein offenes Ohr für alle Probleme hatte.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Medizinisch Technischen Assistentinnen, insbesondere bei Frau Christina Kuhn, Frau Sandra Schulze und Frau Susanne Kunze für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft, die Einführung in neue Methoden und die stetige Unterstützung bei jeglicher Fragestellung.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden danken, ohne deren Unterstützung und Hilfe diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

München, 14.Oktober 2008

Christine Dannenmann