

# Identifizierung von Zielgenen für die Therapie und Diagnose von Ovarkarzinomen

---

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilian-Universität München  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften



vorgelegt von  
Nicole Isabel Euer  
aus München

Department Biologie II, Institut für Anthropologie und Humangenetik

2005

Diese Arbeit wurde am Forschungszentrum Penzberg der Roche Diagnostics GmbH unter Anleitung von Prof. U. H. Weidle durchgeführt.

Eingereicht am: 10.12.2004

Erstgutachterin: Prof. Dr. E. H. Weiß

Zweitgutachterin: PD Dr. B. Kempkes

Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.2005

---

I. Einleitung .....	1
<b>1. Das Ovarkarzinom</b> .....	1
<b>1.1 Klinische Bedeutung des Ovarkarzinoms (Epidemiologie und Ätiologie)</b> .....	1
<b>1.2 Pathogenese und Histologie</b> .....	2
1.2.1 Histologische Einteilung der Ovarkarzinome .....	3
1.2.2 Histologischer Differenzierungsgrad.....	4
<b>1.3 Familiäres Ovarkarzinom</b> .....	4
1.3.1 Mamma-/Ovarkarzinom-Syndrom .....	4
1.3.2 Lynch-Syndrom.....	6
<b>2. Diagnostik</b> .....	7
<b>2.1 Klinische Merkmale</b> .....	7
<b>2.2 Stadieneinteilung</b> .....	8
<b>2.3 Tumormarker</b> .....	9
<b>3. Therapie</b> .....	10
<b>3.1 Therapie nach Stadienunterteilung</b> .....	10
3.1.1 Frühe Tumorstadien (FIGO I und II).....	10
3.1.2 Fortgeschrittene Tumorstadien (FIGO III und IV).....	10
<b>3.2 Therapieansätze</b> .....	11
3.2.1 Chemotherapie.....	11
3.2.2 Strahlentherapie .....	12
3.2.3 Hormontherapie .....	12
3.2.4 Gentherapie.....	13
3.2.5 Immuntherapie.....	15
<b>4. Tumorprogression</b> .....	17
<b>4.1 Zelladhäsions-Moleküle</b> .....	17
4.1.1 CD44.....	18
4.1.2 Integrine.....	18
4.1.3 Cadherine.....	18
<b>4.2 Invasion</b> .....	20
4.2.1 Das Plasminogen(PA)-Aktivatorsystem.....	20
4.2.2 Matrix-Metalloproteinasen (MMP) .....	21
<b>4.3 Angiogenese</b> .....	22

---

<b>5. Methoden zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene</b> .....	24
<b>6. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	26
<b>II. Material und Methoden</b> .....	27
<b>1. Material und Bezugsquellen</b> .....	27
<b>1.1 Verwendete Kulturen und Gewebe</b> .....	27
1.1.1 Humane Zelllinien .....	27
1.1.2 Humane Gewebeschnitte .....	28
1.1.3 <i>E. coli</i> -Stämme .....	28
<b>1.2 Oligonukleotide</b> .....	28
<b>1.3 RNA-, DNA- und Proteinstandards</b> .....	29
<b>1.4 Vektor</b> .....	29
<b>1.5 Antikörper</b> .....	30
1.5.1 Primäre Antikörper .....	30
1.5.2 Sekundäre Antikörper .....	30
<b>1.6 Arrays</b> .....	31
1.6.1 Affymetrix-Arrays .....	31
1.6.2 Gewebe-Array .....	31
<b>1.7 Reaktionssysteme</b> .....	31
<b>1.8 Enzyme</b> .....	31
<b>1.9 Nukleinsäuren</b> .....	32
<b>1.10 Chemikalien und biochemische Reagenzien</b> .....	32
<b>1.11 Verbrauchsmaterialien</b> .....	33
<b>1.12 Puffer und Lösungen</b> .....	34
<b>1.13 Medien</b> .....	36
1.13.1 Zellkultur humaner Zellen .....	36
1.13.2 <i>E. coli</i> -Medien .....	36
<b>2. Methoden</b> .....	37
<b>2.1 Zellbiologische Methoden</b> .....	37
2.1.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	37
2.1.1.1 Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> .....	37
2.1.1.2 Transformation .....	37

---

2.1.1.3 Plasmid-Minipräparationen.....	37
2.1.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....	38
2.1.2.1 Auftauen von Kryokulturen .....	38
2.1.2.2 Einfrieren von Zellen .....	38
2.1.2.3 Kultivierung der Zelllinien .....	38
2.1.2.4 Subkultivierung.....	38
2.1.2.5 Zellernte .....	39
2.1.2.6 Herstellung stabiler Transfektanten .....	39
2.1.2.7 Invasions- und Motilitätstest.....	40
2.1.2.8 Adhäsionstest .....	40
2.1.2.8.1 Beschichtung der Platten.....	40
2.1.2.8.2 Durchführung des Adhäsionstests.....	41
<b>2.2 Arbeiten mit RNA .....</b>	<b>41</b>
2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA .....	41
2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	42
2.2.3 Northernanalyse.....	42
2.2.3.1 Northerntransfer .....	42
2.2.3.2 Radioaktive Markierung von RNA .....	43
2.2.3.3 Northernblot-Hybridisierung .....	43
2.2.3.4 „Strippen“ von radioaktiv markierten Northernblots.....	43
2.2.4 DNase-Verdau .....	43
2.2.5 RT-PCR (Erststrang cDNA-Synthese).....	44
2.2.6 PCR basierend auf dem LightCycler System .....	44
2.2.6.1 Prinzip der PCR basierend auf dem LightCycler System.....	44
2.2.6.2 Semiquantitative Analyse von PCR-Produkten .....	44
2.2.6.3 Normalisierung .....	45
2.2.6.4 Schmelzkurvenanalyse.....	46
2.2.6.5 Durchführung.....	46
<b>2.3 Affymetrix Genchip Technologie.....</b>	<b>47</b>
2.3.1 Erststrang-Synthese von cDNA.....	47
2.3.2 Synthese biotinylierter cRNA ( <i>in vitro</i> Transkription, IVT).....	47
2.3.3 Hybridisierung und Waschen der Genchips .....	47
2.3.4 Beschreibung der Affymetrix Genchips.....	48

2.3.5 Scannen der Genchips .....	48
2.3.6 Bestimmung des „ <i>Absolute Call</i> “ .....	49
2.3.7 Auswertung der Ergebnisse (RACE-A) .....	49
2.3.8 Cluster-Analyse .....	50
<b>2.4 Arbeiten mit DNA</b> .....	50
2.4.1 Gelelektrophorese (Sambrock et al., 1989) .....	50
2.4.2 Restriktionsspaltung .....	50
2.4.3 Gelelution .....	50
2.4.4 PCR.....	51
2.4.5 Ligation.....	51
<b>2.5 Arbeiten mit Proteinen</b> .....	51
2.5.1 Isolierung von Proteinlysat.....	51
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	51
2.5.3 NuPAGE Gelelektrophorese .....	52
2.5.4 Westernblot.....	52
2.5.5 Antikörper-Nachweis (Immundekoration) .....	52
2.5.6 Immunzytochemie .....	53
2.5.7 Durchflusszytometrie (FACS, <i>Fluorescence Activated Cell Scanner</i> ) .....	53
<b>2.6 Arbeiten mit Paraffinschnitten</b> .....	54
2.6.1 Herstellung von Paraffinschnitten .....	54
2.6.2 Immunhistochemie mit Paraffinschnitten (IHC) .....	54
2.6.3 Hämalaun/Eosin-Färbung ( H&E-Färbung) .....	55
<b>III. Ergebnisse</b> .....	56
<b>1. Identifizierung Ovartumor-assoziiertes Gene</b> .....	56
<b>1.1 Genexpressionsanalyse von Ovartumor-Zelllinien mit der Affymetrix Genchip Technologie</b> .....	56
<b>1.2 Cluster-Analyse</b> .....	60
<b>1.3 Bestätigung der Affymetrix-Ergebnisse durch semiquantitative RT-PCR</b> ....	62
<b>1.3 Bestätigung der deregulierten Kandidatengene mittels Northernanalyse</b> .....	67
<b>1.4 Expressionsanalyse der Kandidatengene in Ovartumorgewebe</b> .....	68
<b>1.5 Expressionsstudien auf Proteinebene</b> .....	70
1.5.1 Spezifischer Nachweis des L1CAM-Proteins .....	70

---

1.5.2 Nachweis von L1CAM durch Immunzytochemie.....	72
1.5.3 Expression von L1CAM in Tumor- bzw. Normalgewebe des Ovars.....	73
<b>2. Untersuchungen zur Funktion von L1CAM in Ovarkarzinom-Zellen anhand stabiler Transfektanten.....</b>	<b>79</b>
<b>2.1 Herstellung und Verifizierung stabiler Transfektanten von L1CAM.....</b>	<b>79</b>
2.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors.....	79
2.1.2 Isoform L1CAM $_{\Delta 2,27}$ .....	80
2.1.3 Herstellung und Selektion stabiler L1CAM $_{\Delta 2,27}$ -Transfektanten .....	82
<b>2.2 Versuche zur Funktion der Isoform L1CAM<math>_{\Delta 2,27}</math> .....</b>	<b>85</b>
2.2.1 Bestimmung der Zelladhäsion an Substrate der extrazellulären Matrix.....	85
2.2.2 Invasionstest .....	87
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>89</b>
<b>1. Zelllinien-System .....</b>	<b>90</b>
<b>2. Identifizierung Tumor-assoziiertes Gene .....</b>	<b>91</b>
2.1 Bekannte sezernierte Ovarkarzinom-Antigene.....	92
2.2 Bekannte membranständige Ovarkarzinom-Antigene.....	94
2.3 Ausgewählte Kandidatengene .....	96
2.4 mRNA-Expression der Kandidatengene in Tumorgewebeproben des Ovars	98
2.5 Studien zur Expression des L1CAM-Moleküls .....	98
<b>3. <i>In vitro</i> Untersuchungen zum Einfluß der ektopisch exprimierten Isoform L1CAM<math>_{\Delta 2,27}</math> auf Ovar tumor-Zellen .....</b>	<b>101</b>
3.1 Einfluß stabiler L1CAM $_{\Delta 2,27}$ -Expression auf die Adhäsionsfähigkeit.....	102
3.2 Einfluß stabiler L1CAM-Expression auf die Invasionsfähigkeit.....	103
<b>4. Ausblick .....</b>	<b>104</b>
<b>V. Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>VII. Anhang .....</b>	<b>128</b>

---

<b><u>Danksagung</u></b> .....	128
<b><u>Abkürzungen</u></b> .....	129
<b><u>Lebenslauf</u></b> .....	131
<b><u>Veröffentlichungen</u></b> .....	132
<b><u>Liste deregulierter Gene aus der Affymetrix-Analyse</u></b> .....	133



# I. Einleitung

## 1. Das Ovarkarzinom

### 1.1 Klinische Bedeutung des Ovarkarzinoms (Epidemiologie und Ätiologie)

Das Ovarkarzinom ist die fünfthäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen der Frau und die häufigste Todesursache gynäkologischer Krankheiten in Nordamerika und Europa. Aus diesen Gründen kommt dieser Erkrankung eine besondere Bedeutung zu, obwohl Ovarkarzinome mit 7.900 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland deutlich seltener auftreten als beispielsweise Mammakarzinome. Nach dem Bronchialkarzinom hat das Ovarkarzinom die zweitschlechteste Prognose, einerseits bedingt durch eine meist schnelle Zellteilung (Proliferation), andererseits durch die erst spät, meist im fortgeschrittenen Stadium in Erscheinung tretenden Symptome. Bei etwa 75 % der Frauen hat sich der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnose bereits über das kleine Becken hinaus ausgedehnt. Die Fünfjahres-Überlebensrate bei einer Diagnose im fortgeschrittenen Stadium liegt zwischen 20 und 40 % (Ries et al., 2000).

Etwa 90 % der Neuerkrankungen sind sporadische Karzinome, die restlichen Ovarkarzinome sind hereditär bedingt. Die Erkrankung entsteht überwiegend nach der Menopause, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 66,3 Jahren liegt (Schildkraut und Thompson, 1988).

Risikofaktoren sind Nullipara, frühe Menarche, späte Menopause und fortgeschrittenes Alter, während eine Suppression der Menses, die Einnahme oraler Kontrazeptiva, Schwangerschaft und Laktation die Gefahr einer solchen Erkrankung senken. Für die Entstehung epithelialer Ovartumoren ist anscheinend der sich ständig wiederholende Eisprung von Bedeutung, da die Erkrankung häufiger bei Frauen auftritt, die nie schwanger waren bzw. nie Medikamente nahmen, die den Eisprung unterdrücken (Cannistra, 1993).

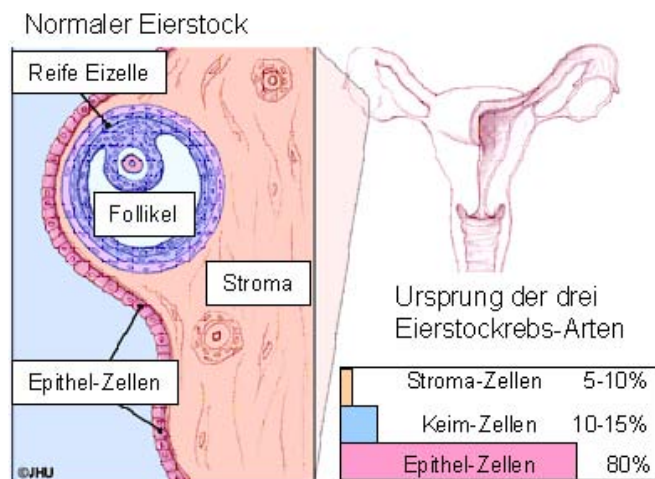
Wichtige Risikofaktoren beim Ovarkarzinom finden sich in der Familienanamnese. Das Risiko einer Frau, in ihrem Leben einen epithelialen Ovar tumor zu entwickeln, beträgt ca. 1,4 %, wird aber beim Vorhandensein einer positiven Familienanamnese auf 15 – 60 % geschätzt (Antoniou et al., 2003; Boyd, 2003). Zwei oder mehr Verwandte ersten Grades mit diagnostiziertem Eierstock- oder Brustkrebs bedeuten ein zehnfach erhöhtes Risiko. Zwei familiäre Syndrome, die mit einem erhöhten Risiko einhergehen, sind das Mamma-/Ovarkarzinom-Syndrom mit Mutationen entweder im BRCA1-Gens oder im BRCA2-Gens (Miki et al., 1994) und das Lynch-Syndrom mit

Mutationen des MSH II-Gens bzw. des MLH I-Gens (Lynch und Lynch, 2002; s. Kap. I.1.3.2, S. 6).

## 1.2 Pathogenese und Histologie

Der Eierstock (lat. Ovar) ist ein paariges weibliches Organ, welches im kleinen Becken rechts und links von der Gebärmutter liegt, vom Bauchfell gehalten wird und mit der Gebärmutter über das Eierstockband verbunden ist. Der mandelförmige Eierstock ist ca. 5 – 8 Gramm schwer, 25 – 50 mm Lang und 15 – 50 mm dick. Man kann eine außen gelegene ca. 2 Millimeter dicke Rinde und das innen liegende Mark unterscheiden.

Das Ovar setzt sich aus drei verschiedenen Zelltypen zusammen; den Keimzellen, den Stromazellen und den epithelialen Zellen, welche die Oberfläche des Ovars einschichtig bedecken.



**Abbildung 1: Ursprung der Eierstockkrebs-Arten, ihre histologische Herkunft und Verteilung in Prozent (nach Johns Hopkins Pathology).**

Von keinem anderen Organ nimmt eine derartige Vielfalt histogenetisch verschiedener Tumoren seinen Ausgang wie vom Ovar. Man unterscheidet drei Eierstockkrebsarten, je nach dem, von welchem Zelltyp sich der Tumor ableitet. Keimzelltumoren, wie z. B. Dysgerminome oder Teratome, entwickeln sich aus den Oozyten und treten vor allem bei jungen Frauen vor dem 20. Lebensjahr auf. Stromazelltumoren, wie z. B. Thekome oder Granulosazelltumoren, kommen in jedem Alter vor, jedoch etwas häufiger in der Postmenopause. Beide treten jedoch relativ selten auf (s. Abb. 1, oben). Die Karzinome entwickeln sich aus den epithelialen Zellen des Ovars.

### 1.2.1 Histologische Einteilung der Ovarkarzinome

Die epithelialen Tumoren des Eierstocks sind mit 80 – 90 % die statistisch bedeutsamste Gruppe unter den bösartigen Tumoren (Malignome) des Ovars (Auersperg et al., 1999; Lloyd und Yin, 2001). In dieser Gruppe existieren verschiedene Subtypen, basierend auf ihren histologischen Merkmalen. Vom Coelomepithel (Mesothel) und vom darunter liegenden Stroma nehmen die epithelial-stromalen Tumoren ihren Ausgang, die Abkömmlinge des Müller'schen Ganges nachbilden. Die serösen Tumoren ähneln dem Tubenepithel, die muzinösen Tumoren dem endozervikalen Epithel und die endometrioiden Tumoren dem Epithel des Endometriums. Klinische Merkmale und Häufigkeit dieser Tumoren sind in Tabelle 1 dargestellt.

<b>Histologie</b>	<b>Klinische Merkmale</b>
<b>Seröses Karzinom</b> Häufigkeit: 50 %	Hoch differenzierte seröse Karzinome sind überwiegend papillär, während niedrig differenzierte seröse Karzinome v.a. solide gebaut sind. Makroskopisch bestehen sie aus einer oder mehreren Zysten, die mit serösem Inhalt gefüllt sind.
<b>Endometrioides Karzinom</b> Häufigkeit: 10 - 25 %	Diese ähneln histologisch einem Endometriumkarzinom und zeigen eine bessere Prognose als die anderen Karzinomtypen. Bei 15 % der Patienten findet man ein gleichzeitiges Auftreten eines Endometriumkarzinoms als Zweitumor.
<b>Muzinöses Karzinom</b> Häufigkeit: 10 - 15 %	Muzinöse Karzinome treten meist unilateral auf, erreichen oft beträchtliche Größe und sind meist aus zahlreichen Zysten mit schleimigem Inhalt aufgebaut.
<b>Klarzelliges Karzinom</b> Häufigkeit: 5 %	Weist ein klares Zytoplasma auf (zurückzuführen auf den Glykogen-Gehalt des Zytoplasmas). Es zeigt die geringste Chemotherapie-Sensibilität aller epithelialen Ovarkarzinome.
<b>Brennertumoren</b> Häufigkeit <1 %	Die seltenen Brennertumoren sind meist gutartig. Histologisch sind sie aus fibrösem Stroma aufgebaut, in das Nester eines Platten- oder Übergangsepithels eingelagert sind.
<b>Undifferenzierte Karzinome</b> Häufigkeit: 5 – 10 %	In diese Gruppe werden jene Tumoren eingeordnet, deren weitgehende Entartung (Anaplasie) eine histogenetische Zuordnung nicht mehr zulässt.

**Tabelle 1: Subtypen epithelialer Ovarkarzinome, ihre Charakteristika und Häufigkeit.**

Eine Besonderheit der epithelialen Ovarialtumoren sind die Borderline-Tumoren, bei denen es sich um Tumoren mit niedriger maligner Potenz handelt. Sie werden hinsichtlich ihrer Dignität (Krankheitswert) und Prognose zwischen den benignen Tumoren und den Karzinomen eingeordnet (Crispens, 2003). Kennzeichen sind eine gesteigerte Proliferation verbunden mit zellulären Atypien, vermehrtem Mitosegehalt und Störung der Architektur. Im Unterschied zu den Karzinomen fehlt ihnen aber in den meisten Fällen ein invasives Wachstum. Absiedelungen von Borderline-Tumorzellen im Bauchraum, die bei 30 – 40 % der Fälle vorkommen, können in ca. 10 % auch invasives Wachstum zeigen (Bell et al., 1988).

### 1.2.2 Histologischer Differenzierungsgrad

Der histologische Differenzierungsgrad (*Grading*) stellt einen vom Stadium unabhängigen Prognosefaktor dar. Nach den Richtlinien der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) werden vier Stufen unterschieden. Tumoren mit dem Differenzierungsgrad G1 sind hoch differenziert, G2 bedeutet eine mäßige Differenzierung, und niedrig differenzierte und undifferenzierte Ovarialkarzinome werden meist in eine Gruppe zusammengefasst (G3/G4). Bei den serösen, muzinösen und endometrioiden Karzinomen wird die Kernatypie und –polymorphie bei der Bestimmung des Differenzierungsgrades berücksichtigt, wobei klarzellige Karzinome und Brennertumoren in erster Linie nach ihren Kernveränderungen eingestuft werden.

## 1.3 Familiäres Ovarialkarzinom

Eine Familien-Anamnese beim Ovarialkarzinom ist der wichtigste und am besten untersuchte Risikofaktor für die Entwicklung dieser Krankheit. Bei bis zu 10 % der Patientinnen findet man eine positive Familienanamnese als Hinweis auf eine genetische Prädisposition zu Eierstockkrebs, aber auch zu Brust- oder in geringerem Maß zu Darm- bzw. Gebärmutterkrebs. Es gibt derzeit drei bekannte Arten von vererblichen Eierstockkrebs-Syndromen, wobei das Mamma-/Ovarialkarzinom-Syndrom und das Lynch-Syndrom relativ gut untersucht sind, das vererbliche Seiten-spezifische Ovarialkarzinom aber noch kaum erforscht ist.

### 1.3.1 Mamma-/Ovarialkarzinom-Syndrom

Mutationen in den BRCA1- und BRCA2-Genen sind für ca. 90 % der Krebsfälle bei Frauen mit familiärer Ovarialkarzinom-Prädisposition verantwortlich. Das Risiko, im Lauf des Lebens an Eierstockkrebs zu erkranken, liegt für Trägerinnen von Mutationen in diesen Genen bei 60 – 70 % (Antoniou et al., 2003). Ihre ubiquitär exprimierten Protein-Produkte spielen eine Rolle in so fundamentalen Prozessen wie DNA-Reparatur und -Rekombination, Zellzyklus-Kontrolle und Transkription (Welch und King, 2001).

Eine defekte Kopie von BRCA1 oder BRCA2 in der Keimbahn reicht für die Prädisposition zu Eierstock- und Brustkrebs aus. Durch den Verlust des zweiten intakten Allels (LOH, Verlust der Heterozygotie) konvertiert die Epithelzelle zur phänotypisch malignen Zelle. Die BRCA-Gene stellen also das klassische Paradigma von Tumorsuppressorgenen dar (Nathanson et al., 2001). Selten kommen somatische Mutationen in sporadischen Krebsfällen vor. Zwischen dem Phänotyp von Trägern der BRCA1-Mutation bzw. der BRCA2-Mutation gibt es einige wichtige Unterschiede. BRCA1-Mutationen sind oft mit einem früh auftretenden Mammakarzinom verbunden. Das Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms im Verlauf des Lebens liegt bei 50 bis 80 % (Nkondjock und Ghadirian, 2004). Auch scheint bei Trägern der BRCA1-Mutation ein gering höheres Risiko für ein kolorektales Karzinom und ein Prostatakarzinom zu bestehen. Das Risiko, im Laufe des Lebens ein Ovarkarzinom zu entwickeln, liegt bei Trägerinnen der BRCA1-Mutation zwischen 16 – 40 % (Struewing et al., 1997; Burke et al., 1997b). Außerdem können Patienten mit der BRCA1-Mutation primäre peritoneale seröse Karzinome entwickeln, die histologisch den Ovarkarzinomen entsprechen und vermutlich eine maligne Transformation peritonealer mesothelialer Oberflächenzellen darstellen (Tobacman et al., 1982). Muzinöse bzw. Borderline-Tumoren treten im Zusammenhang mit BRCA-Genmutationen nicht auf (Werness et al., 2004).

Mutationen von BRCA2 führen dagegen seltener zu einem früh auftretenden Mammakarzinom; das Risiko, im Laufe des Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken, ist jedoch ähnlich hoch (Krainer et al., 1997). Mutationen von BRCA2 erhöhen das Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms bei Männern und möglicherweise auch die Entwicklung von Pankreaskarzinomen. Die Häufigkeit von Ovarkarzinomen bei Mutationen von BRCA2 liegt bei 10 % (Burke et al., 1997a).

BRCA1 und BRCA2 kodieren für nukleäre Proteine, die in vielen verschiedenen Geweben während der S- und G2-Phase des Zellzyklus exprimiert werden. Beide Proteine sind verantwortlich für die Integrität des Genoms. BRCA2 bindet direkt an RAD51, das eukaryotische Homolog zum bakteriellen RecA, das für die Doppelstrangbruch-Reparatur durch homologe Rekombination verantwortlich ist (Sharan et al., 1997; Wong et al., 1997). Auch BRCA1 wird für eine effiziente homologe Rekombination benötigt, aber eine direkte Kontrolle der RAD51-Aktivität erscheint unwahrscheinlich (Scully et al., 1997). Die genaue Wirkungsweise von BRCA1 und BRCA2 bei der Aufrechterhaltung der chromosomalen Struktur ist noch nicht vollständig geklärt. Bis jetzt ist noch unbekannt, warum die mit BRCA-Genen assoziierte Krebsprädisposition sich vor allem in epithelialen Geweben von Mamma, Ovar oder Prostata manifestiert. Eine der Hypothesen besagt, dass hormonelle Einflüsse für die Gewebespezifität verantwortlich sein könnten, da BRCA1 die Aktivierung des Östrogenrezeptors sowohl in Ligand-abhängiger als auch Ligand-unabhängiger Weise inhibieren kann (Zheng et al., 2001). Es gibt aber viele weitere zum Teil

widersprüchliche Hypothesen, die sich mit dieser Thematik beschäftigen (Venkitaraman, 2001), was auch an den unterschiedlichen Arten der Mutationen im Gen liegen kann (Zheng et al., 2001).

### 1.3.2 Lynch-Syndrom

Das Lynch-Syndrom (auch Syndrom hereditärer nicht-polypöser Kolonkarzinome, HNPCC) ist gekennzeichnet durch eine familiäre Prädisposition zu Kolonkarzinomen, aber auch zu Ovar- und Endometriumkarzinomen (Dunlop et al., 1997; Aarnio et al., 1999). Die Patientinnen sind oft jünger als 50 Jahre (Rustgi et al., 1994). Das Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken, liegt für Männer mit Mutationen in den verantwortlichen Genen mit über 70 % deutlich höher als das von Frauen, welches zwischen 25 und 50 % liegt, verglichen mit 3 % in der Normalbevölkerung (Watson und Lynch, 2000; Vasen et al., 2001). In diesem Vergleich haben Frauen von HNPCC-Familien zusätzlich ein bis zu neunmal höheres Risiko, Eierstockkrebs zu entwickeln (Brown et al., 2001). Wenn ein Ovarkarzinom im Rahmen eines HNPCC-Syndroms diagnostiziert wird, findet sich in der Regel in der Familienanamnese eine Häufung von Kolonkarzinomen, nicht aber von Ovarkarzinomen.

Die genetische Prädisposition beruht auf einer Keimlinienmutation der Gene MSH2, MLH1, und seltener von PMS1, PMS2 oder MSH6 (Lynch und Lynch, 2002; Nicolaides et al., 1994). Die Protein-Produkte dieser Gene erfüllen wichtige Aufgaben bei der Fehlpaarungs-Reparatur der DNA (Rustgi et al., 1994).

Durch das HNPCC-Syndrom verursachte Ovarkarzinome unterscheiden sich von anders bedingten dadurch, dass sie deutlich früher auftreten. HNPCC-Patientinnen mit Eierstockkrebs haben außerdem häufiger gleichzeitig Gebärmutterkrebs und werden öfter in früheren Stadien diagnostiziert. Letzteres könnte bedingt sein durch regelmäßige prophylaktische Untersuchungen und Operationen im Rahmen einer umfangreicheren Krebsvorsorge dieser Risikopatienten (Watson et al., 2001). Wie häufig und ab welchem Alter sich HNPCC-Patienten regelmäßigen medizinischen Kontrollen unterziehen sollten, ist Gegenstand einiger laufender Studien und ist unter anderem abhängig von umfangreichen statistischen Daten zum Krankheitsverlauf (Rijcken et al., 2003).

## 2. Diagnostik

### 2.1 Klinische Merkmale

Wie schon zuvor erwähnt ist in ca. 75 % der Fälle das Ovarkarzinom bereits zum Zeitpunkt der Diagnose in einem fortgeschrittenen Zustand (Ries et al., 2000). Hauptursache hierfür ist die Symptomfreiheit im Frühstadium der Erkrankung, in dem der Tumor auf das kleine Becken beschränkt ist, so dass eine Diagnose sehr schwierig ist. In einigen Fällen führen Zyklus anomalies jüngerer Frauen und postmenopausale Blutungsstörungen älterer Frauen zur Diagnose eines Ovarkarzinoms. Nur in seltenen Fällen kann ein Tumor bei einer Routineuntersuchung ertastet werden.

Frauen mit fortgeschrittenem Ovarkarzinom bemerken oft als ersten Hinweis eine Zunahme des Leibesumfangs und eine Tendenz zu Verstopfung (Meteorismus). Diese Symptome sind Folge eines malignen Aszites, der sich in den Bauchraum ergießt. In diesem Erguss von Lymphflüssigkeit befinden sich Zellen, die sich vom primären Tumor gelöst und in der Peritonealhöhle ausgebreitet haben, woraus diffus verteilte Tumorknoten im großen Netz, an der Unterseite des Zwerchfells und auf der serösen Haut der Bauchhöhle und des Darms resultieren können. Große Tumorknoten in der Bauchhöhle können durch Kompression des Magens zu früh einsetzendem Sättigungsgefühl und dadurch zu Gewichtsverlust führen. Ein solcher Gewichtsverlust wird jedoch häufig durch die gleichzeitige Bildung des Aszites ausgeglichen. Die unspezifische Natur der durch Aszites und peritoneale Metastasierung hervorgerufenen abdominellen Beschwerden führt in vielen Fällen zu einer Fehldiagnose; oft wird erst nach einer vergeblichen gastrointestinalen Untersuchung die korrekte Diagnose eines Ovarkarzinoms gestellt.

Zur Untersuchung der Organe des kleinen Beckens hat sich die transvaginale sonographische Methode als sehr spezifisch und sensitiv erwiesen (Karlan, 1997). Ist die Diagnose durch eine solche Untersuchung bestätigt, erfolgt zur weiteren histologischen Diagnose eine explorative Laparotomie. Dabei wird das Tumorstadium erfasst und der Tumor möglichst vollständig entfernt. Die histologische Diagnosesicherung hat den Vorteil gegenüber der zytologischen Untersuchung bei Aszitespunktion, dass zwischen einem Primärtumor und einem metastatischen Befall der Ovarien unterschieden werden kann. Da Ovarkarzinome im Frühstadium potentiell heilbar sind, ist die operative Exploration bei Patientinnen, die nur eine Raumforderung des kleinen Beckens zeigen, besonders wichtig. Bei Tumoren im fortgeschrittenen Stadium ist es oft sinnvoller, die Risiken einer Operation gerade bei älteren Patientinnen zu vermeiden und direkt mit einer Chemotherapie zu beginnen, zumal der Nutzen einer operativen Tumorreduktion im fortgeschrittenen Stadium (FIGO IV; s. Tab. 2, S. 8) umstritten ist.

## 2.2 Stadieneinteilung

Das System der Stadieneinteilung beim Ovarkarzinom wurde durch die FIGO (Internationale Föderation für Gynäkologie und Geburtshilfe) entwickelt. In folgender Tabelle sind die Kriterien für die einzelnen Stadien dargestellt.

<b>FIGO I</b>	<b>Erkrankung auf den Eierstock begrenzt</b>
Stadium IA	Beschränkt auf einen Eierstock; Kapsel intakt, keine Tumorrupitur, Peritoneallavage negativ, kein maligner Aszites;
Stadium IB	Tumor auf beide Eierstöcke beschränkt, sonst wie Stadium IA
Stadium IC	Tumor an der Oberfläche der Eierstöcke, Tumorrupitur, maligne Zellen in der Peritoneallavage, oder maligner Aszites
<b>FIGO II</b>	<b>Erkrankung im Becken ausgebreitet</b>
Stadium IIA	Befall der Gebärmutter oder der Eileiter
Stadium IIB	Befall anderer Organe des kleinen Beckens (Blase, Scheide, Enddarm)
Stadium IIC	Stadien IIA oder IIB mit malignen Zellen im Aszites oder der Peritoneallavage
<b>FIGO III</b>	<b>Peritonealkarzinose bzw. Lymphknotenmetastasen</b>
Stadium IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des kleinen Beckens
Stadium IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen unter 2 cm Größe
Stadium IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen über 2 cm Größe oder Befall retroperitonealer Lymphknoten
<b>FIGO IV</b>	<b>Fernmetastasen, am häufigsten Bauchfell, selten Leber oder Milz</b>

**Tabelle 2: Pathologische FIGO-Stadieneinteilung der Ovarkarzinome und ihre Kriterien.**



### 2.3 Tumormarker

Tumormarker (TM) sind körpereigene Substanzen, deren Auftreten bzw. erhöhte Konzentration in Körperflüssigkeiten (humorale TM) bzw. in Zellen (zelluläre TM) Rückschlüsse auf das Vorliegen, den Verlauf oder die Prognose einer Tumorerkrankung ermöglicht.

Der einzige momentan klinisch relevante Tumormarker für epitheliale Ovarialtumoren CA125 ist aufgrund seiner zu niedrigen Sensitivität und Spezifität für den generellen Einsatz in der Erstdiagnose ungeeignet (Jacobs und Bast, 1989). Der CA125-Wert sollte aber vor Beginn jeder Therapie bestimmt werden, da er sich gut zur Beurteilung des Ansprechens des Tumors auf die Chemotherapie und zur Früherfassung eines Rezidivs eignet (Makar et al., 1992). Wenn bei den Patientinnen bei der Diagnose ein erhöhter CA125-Wert festgestellt werden kann, spiegelt der Verlauf dieses Wertes den Krankheitsverlauf in über 70 % der Fälle wieder (Tuxen et al., 1995).

CA125, ein von Ovarialtumoren gebildetes Glykoprotein auf der Zelloberfläche, ist bei ca. 80 % der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) über die Norm erhöht. Im frühen Stadium (FIGO I) findet sich jedoch nur in 50 % der Fälle ein erhöhter CA125-Wert (Jacob und Bast, 1989). In der Postmenopause ist CA125 von höherer Aussagekraft als in der Prämenopause. Endometriose, genitale und peritoneale Infektionen, Uterus myomatosus, Schwangerschaft oder Lebererkrankungen können ebenfalls erhöhte CA125-Werte verursachen (Meden und Fattahi-Meibodi, 1998).

Weitere Tumormarker, welche derzeit untersucht werden, sind CA 72-4 und CA 19-9, die bei CA125-negativen Ovarialkarzinomen und speziell bei muzinöser Histologie eine höhere Sensitivität aufweisen (Stenman et al., 1995).

### 3. Therapie

#### 3.1 Therapie nach Stadienunterteilung

##### 3.1.1 Frühe Tumorstadien (FIGO I und II)

Bei lokal begrenztem Befall werden in der Regel beide Eierstöcke, die Gebärmutter und das Netz, also ein Teil des Bauchfells, operativ entfernt. Bei Patientinnen mit prognostisch günstigen Faktoren wie einem Ovarkarzinom im Stadium FIGO IA/IB mit einem guten oder mäßig guten Differenzierungsgrad (G1/G2) ohne Tumoradhäsion oder Tumorruptur ist eine postoperative (adjuvante) Chemotherapie in der Regel nicht sinnvoll; die Fünfjahres-Überlebensrate liegt bei diesen Patientinnen auch ohne jede weitere Nachbehandlung bei 90 - 95 % (Young et al., 1990).

Patientinnen mit Risikofaktoren wie Befall der Kapsel des Eierstocks, Tumorruptur, Nachweis von Tumorzellen in der peritonealen Lavageflüssigkeit, eine undifferenzierte Histologie (G3) bzw. ein Tumorstadium FIGO II, welche mit einer Rezidivrate zwischen 20 und 40 % verbunden ist, erhalten in der Regel eine adjuvante Chemotherapie (Bolis et al., 1995). Die Fünfjahres-Überlebensrate von Patientinnen mit frühem Stadium und prognostisch ungünstigen Faktoren liegt nach adjuvanter Chemotherapie bei etwa 80 % (Young et al., 1990; Young et al., 2003).

##### 3.1.2 Fortgeschrittene Tumorstadien (FIGO III und IV)

Während sich das Schicksal von Patientinnen mit frühem Stadium des Ovarkarzinoms durch bessere Diagnostik, ausgedehnte Operation und adjuvante Therapiemaßnahmen im letzten Jahrzehnt sehr verbessert hat, ist die Fünfjahres-Überlebensrate für die Patientinnen fortgeschrittener Stadien trotz aggressiver Chemotherapie nur wenig angestiegen.

Bei etwa 75 % der Patientinnen wird bei der explorativen Laparotomie ein fortgeschrittener Tumor vorgefunden. Da sich die Prognose des Ovartumors linear mit der Menge des zurückgelassenen Tumors verschlechtert, sollte auf jeden Fall versucht werden, so zu operieren, dass kein Resttumor verbleibt bzw. der kleinste zurückbleibende Tumor nicht mehr als 1 –2 cm im Durchmesser beträgt (Munkarah et al., 1997; Liu et al., 1997). Außerdem sollten alle pelvinen (lat. Pelvis: Becken) und paraaortalen Lymphknoten systematisch entfernt werden, da schon im Stadium FIGO III mit etwa 60 – 80 % positiver Lymphknoten in allen Abschnitten zu rechnen ist (Burghardt et al., 1984). Eine ausgedehnte Lymphadenektomie ist nicht erforderlich, wenn größere Tumorreste aus technischen Gründen zurückbleiben müssen.

Verbleiben Tumorreste im Abdomen, ist eine postoperative Chemotherapie erforderlich, die abhängig ist vom genauen Tumorstadium und von der verbleibenden Tumormasse. Diese führt bei 10 bis 30 % der betroffenen Frauen zu langem krankheitsfreiem Überleben. Aber auch bei einem optimal rezesierten Tumor werden die Patientinnen in der Regel einer adjuvanten Chemotherapie unterzogen (Almadrones, 2003).

## 3.2 Therapieansätze

### 3.2.1 Chemotherapie

Die Chemotherapie sollte möglichst bald nach der Operation begonnen werden, idealerweise innerhalb der ersten zwei Wochen und wird in sechs Zyklen im Abstand von je drei Wochen gegeben. Epitheliale Ovarialtumoren reagieren in der Regel relativ empfindlich auf Chemotherapeutika.

Am wirksamsten sind platinhaltige Substanzen (z. B. Carboplatin), die in Kombination mit anderen Substanzen gegeben werden. Früher erfolgte die Kombination mit Cyclophosphamid oder Antrazyklinen, heute werden Taxane (z. B. Paclitaxel) empfohlen. Die Kombination von Paclitaxel und Carboplatin gilt seit Jahren als Standardtherapie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom im Stadium FIGO II-IV (McGuire et al., 1996; Piccart et al., 2000). Das mit Paclitaxel verwandte Docetaxel, welches gerade in einer umfassenden Studie (*Scottish Randomised Trial in Ovarian Cancer*; SCOTROC) getestet wird, scheint noch effektiver und gerade in Bezug auf die Neurotoxizität verträglicher zu sein. Allerdings zeigte sich kein Vorteil gegenüber Paclitaxel in Bezug auf die mittlere Überlebensdauer (Vasey, 2003).

Die zytotoxische Wirkung von Platinverbindungen beruht auf der Schädigung der DNA durch die Ausbildung von Molekülbrücken innerhalb und zwischen ihrer Einzelstränge. Taxane sind Krebsmedikamente, welche die Teilung von Krebszellen hemmen bzw. stoppen sollen, indem sie während der Ausbildung der mitotischen Spindel bei der Zellteilung an Tubulin binden und dieses dadurch stabilisieren. Die Mitosespindel kann sich nicht wieder auflösen, die Zelle wird in der M-Phase des Zellzyklus arretiert und stirbt anschließend durch Apoptose ab (Strobel et al., 1996).

### 3.2.2 Strahlentherapie

Die Strahlensensibilität des Ovarkarzinoms, also die Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen, ist bekannt. Vor der Einführung platinhaltiger Chemotherapien waren Chemotherapie und Strahlentherapie in etwa gleich wirksam. Heute haben neue Chemotherapie-Schemata die Strahlentherapie etwas in den Hintergrund gedrängt. Bei Vorliegen von Kontraindikationen für die Chemotherapie oder bei Ablehnung der Chemotherapie durch die Patientin kommt die Strahlentherapie aber weiterhin zum Einsatz. Treten nach intensiver Polychemotherapie Rezidive auf, so ist die Strahlentherapie die einzig verbleibende Therapiemöglichkeit.

Nach einer Operation umfasst die Strahlentherapie eine Bestrahlung der gesamten Bauchhöhle vom Zwerchfell bis zum Beckenboden, wobei in verschiedenen Gebieten auch verschiedene Strahlendosen unter Berücksichtigung von Risikoorganen appliziert werden (Tewari und DiSaia, 2002).

### 3.2.3 Hormontherapie

Generell nimmt die Hormontherapie bei der Bekämpfung von Tumoren des Eierstocks nur eine untergeordnete Rolle ein. Bei platinresistenten Ovarkarzinomen stellen die nebenwirkungsarmen endokrinen Therapien aber eine wichtige therapeutische Option dar. Auch wenn deren objektive Ansprechraten in einem Bereich unter 20 % liegen und wahrscheinlich sogar etwas geringer sind als die von Chemotherapien bei Rezidiven, so ist deren Toxizität deutlich geringer und die Lebensqualität wird dadurch gesteigert (Pritchard, 2003).

<b>Antiöstrogene</b>	Tamoxifen
<b>GnRH-Analoga</b>	Leuprorelin, Goserelin
<b>Gestagene</b>	Medroxyprogesteronacetat, Megestrolacetat

**Tabelle 3: Hormonell aktive Substanzen beim Ovarkarzinom.**

Im Gewebe von Ovarkarzinomen findet man in etwa 60 % der Fälle Östrogen- und in ca. 50 % Gestagenrezeptoren (Rao und Slotman, 1991). Bei Patientinnen mit frühen Rezidiven wird geprüft, inwieweit durch Hormontherapien, z. B. mit Tamoxifen, Medroxyprogesteronacetat oder GnRH-Analoga, Erfolge zu erzielen sind. Angesichts des günstigen Nebenwirkungsprofils sind insbesondere Patientinnen mit schlechtem Allgemeinzustand und platinrefraktärem Karzinom für eine solche Therapie geeignet. In der GOG (*Gynecology Oncology Group*)-Studie konnte an einem

platinrefraktären Kollektiv in 13 % der Fälle ein objektives Ansprechen nachgewiesen werden. 38 % der Patientinnen zeigten außerdem ein stationäres Tumorverhalten, das über mehrere Monate anhielt (Markman et al., 1996). Für GnRH-Analoga wurden in frühen Studien Remissionsraten bis zu 17 % beschrieben (Emons et al., 1992). Androgene haben sich in der Rezidivsituation als unwirksam erwiesen. Die Ansprechraten von Anti-Androgenen liegen bei weniger als 10 % (van der Vange et al., 1995).

### 3.2.4 Gentherapie

Für die Behandlung von Ovarkarzinomen wird die Gentherapie mehr und mehr als viertes therapeutisches Konzept nach Operation, Chemo- und Strahlentherapie angesehen. Solche Ansätze basieren auf dem beträchtlichen Fortschritt in der Erforschung der molekularen Grundlagen des Ovarkarzinoms. Mögliche Zielgene sind Zellzyklus-Regulatoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Komponenten von Signalübertragungswegen und Gefäßbildung.

Eierstockkrebs ist ein geeignetes Modell für die Gentherapie, da diese intraperitoneal angewendet werden kann und auf diese Weise Lokalisierungsprobleme, welche bei systemischer Anwendung auftreten, vermieden werden können. Die Einführung eines Transgens in betroffene Zellen kann einen Genverlust wiederherstellen (Gensubstitution), eine neue Genfunktion einbringen (Genaddition) oder eine Genfunktion unterdrücken (Geninhibierung). In zytotoxischen Ansätzen wird versucht, Gene zu transferieren, die für Enzyme kodieren, welche inaktive Vorstufen von Medikamenten in zytotoxische Agenzien umwandeln.

Das Tumorsuppressorgen p53 ist das häufigste Zielgen für präklinische und klinische Gentherapie-Studien bei Ovarkarzinomen (Barnes und Pustilnik, 2001). Der Verlust von Wildtyp-p53 ist der häufigste bekannte Defekt bei soliden Karzinomen und kann in mehr als der Hälfte aller epithelialen Ovartumoren festgestellt werden. In einer viel versprechenden klinischen Gentherapie-Studie wurde den Patienten, bei denen p53-Mutationen nachgewiesen werden konnten, Wildtyp-p53 in einem adenoviralen Vektor intraperitoneal in Kombination mit einer Standard-Chemotherapie verabreicht (Wen et al., 1999; Buller et al., 2002). Eine erste Zwischenanalyse zeigte aber, dass dadurch die therapeutische Effektivität nicht verbessert werden konnte. Die Gründe dafür sind vielfältig. Das adenovirale Vektor-System und seine intraperitoneale Anwendung könnte aber das Hauptproblem darstellen (Buller et al., 2002). Der entscheidende Schritt ist das Eindringen des Vektors in die Zielzelle, das über eine Anheftung an den Cosackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) auf der Oberfläche der Zielzelle und anschließende Internalisierung über Integrine ( $\alpha\beta3$  und  $\alpha\beta5$ ) vermittelt wird. Ein Mangel in einer oder beiden dieser Molekülklassen verleiht Resistenz gegenüber adenoviralen Vektoren (Hasenburg et al., 2002). Deutliche Unterschiede in der Expression dieser Rezeptoren wurden bei Tumorzellen des Ovars

aufgrund relativ großer Heterogenität innerhalb des Tumors immunohistochemisch nachgewiesen, so dass eine negative Selektion während der Adenovirus-basierenden Therapie auftreten kann. Undifferenzierten Ovarkarzinomen fehlt die  $\alpha v\beta 3$ -Integrin-Expression völlig (Zeimet et al., 2002). Ein Hauptproblem bei der Gentherapie ist also nach wie vor der Mechanismus der Genübertragung in die Zielzellen und erst in zweiter Linie das geeignete Zielgen.

Viele Ansätze mit viralen und nicht-viralen Transportsystemen wurden getestet, um durch die Einführung von spezifischen Genen den malignen Phänotyp der Krebszellen zu verändern. Adenoviren sind momentan die effektivsten Vektoren hinsichtlich des Prozentsatzes der transfizierten Tumorzellen und des Genexpressionsspiegels (Vorbürger und Hunt, 2002). Retroviren, die sich in die DNA der Zielzelle integrieren und so zu einer chronischen Infektion führen, haben den Nachteil, dass sie nur in proliferierende Zellen eindringen und anschließend das Transgen translatieren können (Miller et al., 1990; Verma und Somia, 1997). Lentiviren, wie z. B. der HI-Virus, haben dagegen den Vorteil, dass sie sowohl proliferierende als auch nicht proliferierende Zellen befallen. Herpes-Viren können bis zu 30 kb exogener DNA in die Zielzellen befördern, haben also in dieser Hinsicht zu einer Transportkapazität von 5 – 8 kb der zuvor erwähnten Vektoren einen deutlichen Vorteil, sind aber komplex hinsichtlich ihres Andockmechanismus an die Zielzellen, bei dem viele virale Proteine benötigt werden (Vorbürger und Hunt, 2002). Zu den nicht viralen Transportmechanismen gehört z. B. der Gentransfer mittels kationischer Liposomen.

Die Entwicklung von gewebespezifischen Promotoren hat die Spezifität der adenoviralen Transduktion, der am häufigsten verwendeten Methode, deutlich erhöht. Klinische Testverfahren in der Phase I (Zielgene p53, BRCA1, Her2/neu, Bcl-2, MDR, E1A, und HSV-TK Gene) wurden durchgeführt, um die Sicherheit der verschiedenen Strategien zu testen. In weiteren Studien wird die Effektivität dieser Behandlungen evaluiert. Außerdem sollen neue Studien die Kombination von Gentherapie und zytostatischen Behandlungsweisen untersuchen, da präklinische Studien chemosensitivierende Effekte von einigen Zielgenen aufgezeigt haben. Das wachsende Wissen über den genetischen Hintergrund von Ovarkarzinomen wird wahrscheinlich viele Zielgene für neue Gentherapie-Ansätze liefern.

### 3.2.5 Immuntherapie

Die Immuntherapie rückt bei der Behandlung des Ovarkarzinoms mit zunehmendem Verständnis des Zusammenspiels zahlreicher Faktoren bei der Immunantwort und den speziellen immunologischen Bedingungen in der Bauchhöhle, in welche die Krebszellen besonders häufig metastasieren, immer mehr in den Vordergrund klinischer Studien. Um die Standardtherapie sinnvoll zu ergänzen, sind mehrere Ansätze denkbar.

Die passiven humoralen Immuntherapien sind vor allem bei minimaler Resterkrankung als effektives Adjuvans sinnvoll. Eine Möglichkeit ist der Einsatz von therapeutischen monoklonalen Antikörpern. Mit dieser Therapie-Methode wurde ein Durchbruch beim rezidierten Non-Hodgkin-Lymphom mit einem Antikörper erreicht, welcher gegen das CD20-Antigen gerichtet ist und zu Ansprechraten von bis zu 50 % führt. Anti-Her2-Antikörper (Trastuzumab/Herceptin) erwiesen sich als effektive Therapie beim fortgeschrittenen Mammakarzinom sowie beim Ovarkarzinom, auch wenn hier die Ansprechraten deutlich niedriger sind (GOG, *Gynecologic Oncology Group*, 2000). In anderen Ansätzen wird die Spezifität der Antikörper als Vehikel eingesetzt, um konjugierte Toxine, Zytostatika oder radioaktive Substanzen gezielt zu den Tumorzellen zu befördern. In einer klinischen Studie zeigte der getestete, mit Yttrium-90 (<sup>90</sup>Y) radioaktiv markierte Antikörper gegen HMFG1, ein Epitop des polymorphen epithelialen Mucin, das von 90 % der Ovarkarzinome exprimiert wird, gute Tolerierbarkeit bei peritonealer Anwendung (Hird et al., 1993). Außerdem zeigte sich ein Erfolg hinsichtlich einer verlängerten Überlebenszeit von Patientinnen mit minimaler Resterkrankung bei einer Anwendung nach vorausgegangener Chemotherapie (Nicholson et al., 1998).

Eine neuere Therapiestrategie ist die aktive zelluläre Immuntherapie, die auf der gezielten Rekrutierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) zu Tumorzellen mittels bispezifischer Antikörper basiert. Dabei handelt es sich um Hybridmoleküle, die zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen besitzen. Sie können entweder durch chemische Verknüpfung von zwei monovalenten Fab-Antikörperfragmenten oder Fusion zweier Hybridome zu einem Hybrid-Hybridom oder Quadrom, welches bispezifische Antikörper sezerniert, erhalten werden. Durch diese zwei unterschiedlichen Bindungsstellen wird ihnen die duale Erkennungseigenschaft verliehen, zytotoxische T-Zellen am Tumor zu rekrutieren, um diesen zu zerstören. Ein Beispiel dafür ist der bispezifische Antikörper HEA125xCD3, der zum einen mit dem Oberflächenprotein Ep-CAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), welcher auf praktisch allen Karzinom-Zellen exprimiert wird, interagiert und zum anderen an das CD3-Antigen auf T-Zellen bindet. Mit sehr geringen Mengen dieses Antikörpers können zytotoxische Lymphozyten auf die Tumorzellen von Patientinnen gelenkt werden. Erste Ergebnisse einer Pilotstudie zeigten, dass die Patientinnen durch den Einsatz dieses bispezifischen Antikörpers einen deutlichen Gewinn an Lebensqualität

erhielten (Moldenhauer et al., 1999).

Ein zentrales Problem bei der therapeutischen Anwendung von herkömmlichen sowie bispezifischen Antikörpern ist die meist unzureichende Penetration der großen Moleküle (150 kD) in das Tumorgewebe, speziell bei soliden und wenig vaskularisierten Tumoren. Außerdem ist die Produktion und Aufreinigung von Hybrid-Hybridomantikörpern sehr aufwendig und kostenintensiv. Daher wird seit einigen Jahren versucht, rekombinante Antikörper herzustellen. Die zur Antigenbindung notwendige kleinste Einheit eines Antikörpers ist das F<sub>v</sub>-Fragment, welches aus je einer VH und VL Domäne besteht. Diese sind über eine Peptidbrücke verbunden und werden als sog. „*Single Chain*“ Antikörper (30 kD) bezeichnet. Solche Ansätze sind aber noch in der experimentellen Phase.

Eine weitere Variante besteht in einer Immunmodulation durch eine intraperitoneale Applikation von Zytokinen (Zytokin-Therapie). Interferon alpha und gamma wurden in klinischen Studien als wirksam gegen Ovarkarzinome eingestuft (Berek et al., 1999; Pujade-Lauraine et al., 1996; Windbichler et al., 2000). Interferone zeigen neben einem antiproliferativen Effekt auch eine antiangiogene Wirkung (Berek et al., 2003). Aktuelle Studien zeigen, dass Interferone bei biologisch optimaler Dosierung die Expression von MMP-2, MMP-9, bFGF, VEGF, IL-8 hemmen können und dadurch Apoptose in Tumor-Endothelzellen hervorrufen können und so die Angiogenese vermindern (Bast et al., 2000). Die geringe Toleranz schubweise verabreichter, hoher Dosen von Interferonen in frühen klinischen Studien führte zu der Entwicklung von pegylierten Interferonen, welche die Erhaltung von niedrigen Spiegeln dieser Substanzen bei weniger häufiger Verabreichung ermöglichen (Grace et al., 2001).

Eine weitere Option ist die allgemeine Immunstimulation (u. a. Mistellektin), welche vielfach als unspezifisches Adjuvans eingesetzt wird. Diese muss aber, da keine spezifische Immunantwort gegen Tumorzellen hervorgerufen wird, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit kritisch beurteilt werden.



## 4. Tumorprogression

Epithelialer Eierstockkrebs ist eine aggressive Erkrankung. Da die Progression oft asymptomatisch verläuft, wird die Diagnose meist erst in fortgeschrittenen Stadien mit peritonealer Dissemination und Fernmetastasen gestellt. Zum Diagnosezeitpunkt hat sich bei 75 % der Patientinnen der Krebs über die Ovarien und in 60 % über das Becken hinaus verbreitet (Ries et al., 2000).

Beim Ovarkarzinom werden Krebszellen vom Karzinoma in situ abgeschert und gelangen so in die peritoneale Flüssigkeit. Bei über 65 % der Patientinnen bildet sich durch verstärkte Produktion der Peritoneal-Flüssigkeit und lymphatische Stauung ein maligner Erguss im Bauchraum (Aszites), in dem sich die abgelösten Tumorzellen anreichern. Diese Zellen können sich an das einschichtige Mesothel anlagern, welches die Bauchhöhle auskleidet. Anschließend migrieren die Tumorzellen durch die mesotheliale Zellschicht, durchbrechen die darunterliegende Basalmembran und wachsen invasiv durch die assoziierte extrazelluläre Matrix (EZM) in lokale Organe. Metastasen werden am häufigsten in der Bauchhöhle, Gebärmutter, Bauchnetz, Darmoberfläche und an den retroperitonealen Lymphknoten gefunden. In geringerem Umfang metastasiert diese Tumorart über die Blutbahn (hämatogen) oder das Lymphsystem (lymphogen) in Lunge, Gehirn oder Knochen. Dieser vielschichtige Prozess der Adhäsion, Migration und Invasion von Krebszellen führt oft zum Tod der Patienten. Die Heilung von fortgeschrittenen Ovarkarzinomen ist sehr schwierig, da es meist nicht möglich ist die Tumorzellen auf der Oberfläche des Peritoneums vollständig zu entfernen und sich Chemotherapie-Resistenz entwickeln kann.

### 4.1 Zelladhäsions-Moleküle

Obwohl ein früher Schritt der Metastasierung die Ablösung der Ovarkarzinomzellen vom Primärtumor und darauf folgende Adhäsion an die mesothelialen Zellen des Bauchnetzes und die assoziierte EZM beinhaltet, haben sich nur wenige Studien auf diese Interaktion fokussiert. Einige Familien von Adhäsionsmolekülen, welche in Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen involviert sind, werden in anderen Systemen beschrieben. Oberflächen-Adhäsionsmoleküle werden aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten in fünf Klassen eingeteilt, bestehend aus den Proteoglykanen, Integrinen, Cadherinen, Selektinen und der Immunglobulin-Superfamilie. In Bezug auf Ovarkarzinome wurden bisher vor allem das Proteoglykan CD44, Integrine und E-Cadherin ausführlich untersucht.

#### 4.1.1 CD44

Die CD44-Proteoglykane gehören zur Familie der Hyaladherine und werden von einer großen Vielfalt von Zelltypen exprimiert, einschließlich epithelialer und hämatopoietischer Zellen, und spielen eine Rolle bei der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion. Bedingt durch alternatives Spleißen und differentielle Glykosylierung gibt es viele Varianten von CD44 in verschiedenen Größen. Die 150-160 kD CD44-Isoform wird in epithelialen und mesenchymalen Zellen gefunden und scheint als Hauptrezeptor für Hyaluronat zu dienen, während beispielsweise die 85 kD CD44-Isoform die prädominante Form in Leukozyten ist und vermutlich für die gezielte Rekrutierung (*Homing*) zu lymphatischen Organen und Entzündungsherden verantwortlich ist. Die Interaktion zwischen CD44 und Hyaluronat könnte Tumorwachstum und Metastasierung verstärken (Zeng et al., 1998). Andere Studien haben aber gezeigt, dass die Invasivität bestimmter Tumoren mit einer Inhibierung der CD44-Expression einhergeht (Salmi et al., 1993) und das Hyaluronat nicht an der Tumorprogression beteiligt zu sein scheint (Sherman et al., 1996).

#### 4.1.2 Integrine

Integrine bilden eine ubiquitär exprimierte Familie von Zelladhäsions-Rezeptoren, bestehend aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, die nicht-kovalent mit einer  $\beta$ -Untereinheit assoziiert ist. Diese beiden Untereinheiten vermitteln die Bindung von Zellen an spezifische Bestandteile der EZM, an Zelladhäsionsmoleküle sowie an Komponenten des Blutgerinnungs- und Komplementsystems. Es gibt mindestens 16  $\alpha$ -Untereinheiten und acht  $\beta$ -Untereinheiten. Bisher sind 22 verschiedene Kombinationen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bekannt. Integrin-vermittelte Signalweiterleitung kann Zellproliferation, Genexpression, Differenzierung und Apoptose regulieren. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Integrine bei der Invasion und Metastasierung einer Vielzahl von Krebsarten beteiligt sind (Dedhar et al., 1993).

#### 4.1.3 Cadherine

Die Cadherine gehören zur Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Adhäsionsmoleküle, welche mit einer Transmembrandomäne in der Membran verankert sind und in der Regel homotypische Proteinbindungen eingehen. Epitheliales Cadherin (E-Cadherin) ist das am häufigsten vorkommende Cadherin in epithelialen Zellen. Das reife Protein entsteht durch proteolytische Spaltung eines Vorläuferproteins und hat eine Größe von 120 kD (Shore und Nelson, 1991). Der zytoplasmatische Teil des Proteins ist hochkonserviert und bildet Komplexe mit Cateninen aus, welche den Zell-Zell-Kontakt stabilisieren, indem sie via Aktin an das Zytoskelett binden (Gumbiner, 1996). Neben E-Cadherin zählen das neuronale (N-) Cadherin und das plazentale (P-) Cadherin zu den klassischen Cadherinen.

Der E-Cadherin-Komplex liegt bei den meisten Krebsarten verändert vor. Die höchsten Expressionsspiegel findet man in den meisten Organen im Epithelgewebe; in differenzierten Karzinomen ist dieser deutlich geringer. In undifferenzierten und invasiven Tumorzellen ist E-Cadherin kaum mehr nachweisbar oder mutiert. Verringerte E-Cadherin-Expression korreliert mit geringer histologischer Differenzierung, erhöhtem Risiko lokaler Invasion und Metastasierung sowie einer schlechten Prognose, wodurch E-Cadherin in die Kategorie der Tumorsuppressoren eingereiht wird (Birchmeier et al., 1991; Okegawa et al., 2002). In den Zellen des Oberflächen-Epithels (OSE) des Ovars findet sich im Gegensatz zu den meisten anderen epithelialen Geweben keine oder eine sehr geringe E-Cadherin-Expression (Maines-Bandiera und Auersperg, 1997). Dies kann möglicherweise durch die Histologie dieses Gewebes erklärt werden, da Zellen mesothelialen Ursprungs kein E-Cadherin, sondern N-Cadherin exprimieren (Schofield et al., 1997). In Ovarkarzinomen wird E-Cadherin jedoch stark exprimiert, was durch den frühen Wechsel vom mesenchymalen Oberflächen-Epithel zum epithelialen Tumor bedingt sein könnte und dadurch, dass die epithelialen Charakteristiken erhalten bleiben (Sundfeldt, 2003). Eine wechselnde Aktivierung und Inhibierung der E-Cadherin-Expression könnte einen Proliferationsvorteil für die Tumorzellen bedeuten und wiederholte Invasion fördern (Sundfeldt, 2003).

Mitglieder verschiedener Familien von Adhäsionsmolekülen scheinen eine wichtige Rolle bei der Progression des Ovarkarzinoms einzunehmen. Bedingt durch die Komplexität der Krankheit ist es sehr wahrscheinlich, dass erst die Identifizierung von bislang in diesem Kontext noch unbekanntem Adhäsionsmolekülen Vorgänge wie Adhäsion, Migration, Invasion, Wachstum, Proliferation und Apoptose und ihre Zuordnung zu bestimmten Stadien der Tumorprogression zum Verständnis dieser Vorgänge verhelfen werden.

## 4.2 Invasion

Bösartige Tumorzellen sind in der Lage, die Grenzen von Organen zu durchbrechen und in Blut- und Lymphgefäße einzudringen. Das erfordert die Degradation von Proteinen der Basalmembran, welche Organe und Gefäße umgibt, sowie Abbau der extrazellulären Matrix (EZM). Diese Abbauprozesse werden anscheinend vorwiegend durch verschiedene proteolytische Systeme der Tumorzellen vermittelt, welche mit der Oberfläche dieser Zellen assoziiert sind (Stack et al., 1998). Die verschiedenen Proteasen unterscheiden sich im Mechanismus der Peptidbindung, bezüglich ihrer Lokalisierung und ihrer Substrate. Anhand dieser Kriterien werden sie in die Klassen der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Cysteinproteinasen, Aspartatproteasen und Serinproteasen eingeteilt. Besonders gut untersucht sind bislang die MMPs (s. Kap. I.4.2.2, S. 21) und die Serinproteasen (s. unten).

### 4.2.1 Das Plasminogen(PA)-Aktivatorsystem

Das PA-System besteht aus mehreren Komponenten. Die Plasminogen-Aktivatoren (PAs) stellen eine Klasse von Serin-Proteasen dar, welche effizient die Hydrolyse des Arg<sup>560</sup>-Val<sup>561</sup> Bindung von Plasminogen katalysieren, und so diese inaktive Vorstufe in das katalytisch aktive Plasmin umwandeln. Es existieren zwei physiologische PAs, die *urinary-type* PA (uPA oder Urokinase) und die Gewebetyp-spezifische PA (tPA, *tissue-type* PA). Das aktive Plasmin ist eine Serinprotease mit breitem Spektrum, welche eine große Anzahl von EZM-Komponenten wie Fibronectin, Laminin und Vitronectin degradieren kann. Außerdem ist es in der Lage, weitere Zymogene in ihre aktive Form umzuwandeln und so proteolytische Kaskaden zu initiieren, die ihrerseits die EZM abbauen. Ein uPA-spezifischer Rezeptor (uPAR) wurde auf vielen normalen und neoplastischen Zellen identifiziert (Andreason et al., 1997). Eine Kolokalisierung von uPAR und Plasminogen erleichtert eine perizelluläre Plasminogen-Aktivierung. Außerdem gibt es verschiedene PA-Inhibitoren (PAIs), von denen PAI-1 abundant exprimiert wird. PAI-1 inhibiert sowohl lösliches als auch Rezeptor-gebundenes uPA durch Bildung kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplexe. uPAR ist ein Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-verankerter Zelloberflächen-Rezeptor, der die Aktivierung von perizellulärem Plasminogen reguliert, indem er die Enzymaktivität am invasiven Pol der migrierenden Zellen fokussiert (Conese und Blasi, 1995b). Zusätzlich ist uPAR auch an der Inhibierung der uPA-Aktivität durch Internalisierung des uPA/uPAR/PAI-1-Komplexes beteiligt. Internalisiertes uPA wird degradiert und der freie Rezeptor gelangt wieder zur Zelloberfläche (Conese und Blasi, 1995a; Mondino et al., 1999). PAI-1 inhibiert nicht nur uPA, sondern moduliert auch die adhäsiven Eigenschaften der Tumorzellen an die EZM-Komponente Vitronectin (Stefansson und Lawrence, 1996). So ist PAI-1 auch an der Regulierung von Adhäsion und Ablösung beteiligt, welche für migrierende Zellen entscheidend sind (Lauffenburger, 1996).

Die Expression von PAI-1 ist mit Tumorinvasion und Metastasierung assoziiert (Bajou et al., 1998; Andreasen et al., 2000) und ist ein Marker für eine schlechte Prognose für Brust-, Eierstock-, Speiseröhren-, Magen-, Darm- und Leberkrebs (Schmitt et al., 1997). Im Gegensatz dazu korrelieren hohe Spiegel an PAI-2 im Tumorgewebe mit einer guten Prognose für Brustkrebs-Patientinnen (Foekens et al., 2000). Hohe Expression von uPA und uPAR ist wiederum mit einer schlechten Prognose in verschiedenen Krebsarten verbunden (Schmitt et al., 1997; Reuning et al., 1998; Fisher et al., 2000). Zudem korreliert die uPA-Expression mit dem klinischen Tumorstadium. So zeigen Patientinnen mit fortgeschrittenem FIGO III-Tumor einen vierfach höheren uPA-Gehalt in Tumorgewebe-Homogenaten, verglichen mit Proben von nicht-metastasierenden Tumoren (FIGO I/II; Kuhn et al., 1994).

Die Inhibierung der uPA/uPAR-Interaktion ist ein mögliches Angriffsziel für molekulare Krebstherapie. Im Gegensatz zur herkömmlichen Chemotherapie richtet sich dieser Ansatz direkt gegen Komponenten des uPA-Systems, um die Verbreitung von Tumorzellen und Metastasierung zu verhindern (Sperl et al., 2001).

#### 4.2.2 Matrix-Metalloproteinasen (MMP)

MMP nehmen eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen ein. Sie stellen eine Familie von Zink-abhängigen Metalloendopeptidasen dar, welche im Gegensatz zum uPA-System in der Lage sind, verschiedene Komponenten der EZM wie Elastin, Gelatin und vor allem Kollagene zu degradieren. Aufgrund ihrer Substratspezifität und Proteinstruktur werden die Mitglieder der MMP in die Untergruppen der Gelatinasen, Kollagenasen, Stromelysine, Membran-gebundene MMP (MT-MMPs) und andere MMP eingeteilt. Wie uPA und Plasmin werden die meisten MMP als enzymatisch inaktive Zymogene synthetisiert und sezerniert. Zusätzlich wird ihre Aktivität unter normalen physiologischen Bedingungen durch die Familie der TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen*, Gewebe-Inhibitoren der MMP) reguliert. Diese bilden einen nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex und unterbinden so die katalytische Aktivität ihrer Zielprotease (Massova et al., 1998; Woessner, 1999).

Eine Vielzahl von MMP wie MMP-1 (Kollagenase-1), MMP-2 (Gelatinase A), MMP-7 (Matrilysin), MMP-9 (Gelatinase B), MMP-13 (Kollagenase-3) und MMP-14 (MT1-MMP) wurden mit Ovarkarzinomen in Verbindung gebracht (Ghosh et al., 2002). Besonders intensiv wurden MMP-2 und MMP-9 untersucht, welche bei der Proteolyse der Komponenten der Basalmembran Kollagen Typ IV und Laminin-1 involviert sind. Die Analyse einer Anzahl von Ovartumorzelllinien zeigte eine abundante Expression von beiden MMP, während diese in normalem Ovar epithel in nicht nachweisbaren Mengen produziert wurden (Moser et al., 1994). Außerdem korreliert die MMP-Sekretion mit der Fähigkeit der Tumorzellen, native sub-endotheliale EZM

abzubauen und die Basalmembran zu durchdringen (Young et al., 1996). Eine Quantifizierung des MMP-2-Spiegels in Patientenserum zeigte erhöhte Expression bei Patienten mit serösen FIGO III-klassifizierten Zystadenokarzinomen verglichen mit Borderline Tumoren und Zystadenomen; dieser Befund indiziert MMP-2 als diagnostischen Serummarker (Garzetti et al., 1996; De Nictolis et al., 1996). Signifikante Erhöhung von MMP-9-Expression wurde in serösen und muzinösen Ovarkarzinomen im Vergleich zu gutartigen und Borderline-Tumoren beschrieben (Huang et al., 2000).

Mit zunehmenden experimentellen Beweisen für die kritische Rolle von MMP in der Progression von Ovarkarzinomen sind Inhibitoren der MMP ein attraktives Ziel für eine neue Klasse von Anti-Krebs-Agenzien geworden. Zwei synthetische Inhibitoren, Batimastat (BB-94) und Marimastat (BB-2516), inhibieren ein breites Spektrum von MMP und wurden besonders intensiv in Xenograft-Modellen und klinischen Studien auf ihre mögliche therapeutische Wirkung getestet (Rasmussen und McCann, 1997); weitere MMP-Inhibitoren wie AG 3340, MMI 270B und BAY 12-9566 werden derzeit in verschiedenen Entwicklungsstadien getestet. Weiterführende klinische Studien werden die therapeutische Wirksamkeit dieser Stoffklasse ermitteln.

### 4.3 Angiogenese

Solide Tumoren bzw. Metastasen können nur über einen kritischen Durchmesser von 1 – 2 mm hinauswachsen, wenn sie die Bildung neuer Blutgefäße induzieren können, um so die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Die Angiogenese ist also ein entscheidender Faktor in der Progression solider Tumoren und Metastasen (Kerbel et al., 1998; Sharma et al., 2001). Die Tumorzellen sezernieren Modulatoren, die den angiogenen Prozess initiieren. Der sogenannte „*Angiogenic Switch*“, die Aneignung des angiogenen Phänotyps, resultiert aus einem Ungleichgewicht von Gefäß-stimulierenden und -inhibierenden Faktoren.

Mehrere Wachstumsfaktoren und Zytokine sind in die Bildung neuer Blutgefäße durch Stimulierung des endothelialen Zellwachstums und der Migration involviert. Eine Schlüsselrolle wird dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) zugeschrieben. Dieses potente endotheliale Mitogen ist in einer Reihe von epithelialen Tumoren wie z. B. Brust-, Blasen-, Gebärmutter-, Gebärmutterhals- und Eierstock-Karzinomen überexprimiert (Dobbs et al., 1997; Dvorak et al., 1995; Senger et al., 1993; Toi et al., 1994; Olson et al., 1994; Brown et al., 1993; Emoto et al., 1999). Neben seiner Fähigkeit als Endothelzell-Mitogen verstärkt VEGF die vaskuläre Permeabilität, wodurch die Bildung von Aszites gefördert werden könnte (Nagy et al., 1995). Der Verlust von Wildtyp-p53 scheint die Angiogenese zu fördern, indem VEGF-Expression induziert wird und die Expression von Thrombospondin-1 (TSP-1), einem Angiogenese-inhibierenden EZM-Molekül, unterdrückt wird (Dameron et al., 1994). Die

genetische Expression von TSP-1 wird durch direkte Interaktion mit p53 aktiviert und wird zusätzlich durch zwei Mitglieder der Ras-Familie, K-ras und H-ras, reguliert (Larcher et al., 1996; Okada et al., 1998).

Weitere entscheidende Funktionen bei der Angiogenese haben Wachstumsfaktoren wie z. B. TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*), bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) und Angiopoietin-1, aber auch Zytokine wie Interleukine (IL), die sowohl stimulierende (IL-8, IL-6) als auch inhibitorische Einflüsse (IL-10, IL-12) auf die Gefäßbildung haben können, sowie MMPs (MMP-2, MMP-9) und Interferone (Brown et al., 2000). Die Komplexität der Angiogenese wird mit jedem neu entdeckten Faktor deutlicher und das Interesse an antiangiogenen Substanzen für therapeutische Zwecke wächst stetig. Die große Auswahl an molekularen Angriffszielen in der gefäßbildenden Kaskade und an Wirkstoffen, welche diese modulieren, zeigt viele neue Therapie-Möglichkeiten auf. Kombinationen dieser verschiedenen Ansätze könnten dieses Spektrum noch zusätzlich erweitern.

## 5. Methoden zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Die Entstehung von soliden Tumoren ist auf eine Reihe von genetischen Veränderungen zurückzuführen, welche in einer modifizierten Expression vieler Gene resultiert. Die Analyse von mRNA und Proteinen wird verbreitet genutzt, um Genexpressionsmuster von Zellen oder Geweben unterschiedlicher Herkunft oder unter unterschiedlichen Bedingungen zu vergleichen. Die Untersuchung dieser Unterschiede in der Genexpression von Tumoren verschiedener Stadien untereinander bzw. mit Normalgeweben ist ein viel versprechender Ansatz, neue Gene zu finden, welche für die Entstehung und Progression von Krebs verantwortlich sind.

Das erfolgreichste Beispiel in den Anfängen der Erforschung differentiell exprimierter Gene ist die Entdeckung des Tumorsuppressor-Proteins p53, das bei einem Vergleich von normalen Zellen mit SV40-Tumoviren-infizierten Zellen durch eindimensionale Protein-Gelelektrophorese entdeckt wurde (Linzer und Levine, 1979).

Neben der Weiterentwicklung dieser Techniken auf Proteinebene in Richtung Proteomics, konzentrierte sich die Forschung zunehmend auf die Analyse von mRNA. Einer der ersten Ansätze brachte die sogenannte differentielle Hybridisierung hervor (Sargent, 1987). Obwohl mit dieser Technik einige Erfolge erzielt wurden hat sich schnell abgezeichnet, dass dieser Ansatz für die Detektion von Genen, die schwächer exprimiert werden, nicht geeignet ist. Seit der Entwicklung dieser Methode wurden einige PCR-basierende subtraktive Hybridisierungs-Strategien kreiert, wie z. B. die RDA-Analyse (*Representational Difference Analysis*; Lisitsyn und Wigler, 1993) und die Methode der subtraktiven Hybridisierung (Diatchenko et al., 1996). Hierbei werden die cDNAs, die Gene repräsentieren, welche in beiden zu vergleichenden Zelltypen exprimiert werden, entfernt; nur die einzelsträngigen cDNAs, welche die wenigen differentiell exprimierten Gene repräsentieren, werden analysiert.

Um die Identifizierung differentiell exprimierter Gene zu beschleunigen, entwickelten Liang und Pardee die Methode des *Differential Display*, in der PCR und DNA-Sequenzierung durch Gelelektrophorese integriert wurden (Liang und Pardee, 1997). Einer der Hauptvorteile ist die leichte Durchführbarkeit der Technik, die keine Information über mRNA- oder Gen-Sequenzen voraussetzt.

In der Entwicklung des *Human Genome Projects* entwickelte die Gruppe um Craig Venter die Strategie der sogenannten EST-Sequenzierung (*Expressed Sequence Tags*), um nur exprimierte Gene anstatt des gesamten Genoms zu sequenzieren (Adams et al., 1992). Dabei werden die 3'-Enden von zufällig gewählten cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek ansequenziert. Diese ESTs repräsentieren Fragmente exprimierter Gene. Diese Methode nahm eine Schlüsselrolle in der



Entdeckung von Genen und in der Katalogisierung für das *Cancer Genome Anatomy Program* des NIH (*National Institutes of Health*) ein, wird aber aufgrund der hohen Kosten und des hohen Arbeitsaufwandes nur noch selten zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene verwendet.

Bis heute wird dagegen die sogenannte SAGE-Technik (*Serial Analysis of Gene Expression*) angewendet, die erstmals die quantitative und simultane Analyse einer großen Anzahl von Transkripten ermöglichte (Velculescu et al., 1995). Bei dieser Methode werden von der mRNA ausgehend sogenannte SAGE-Sequenzmarker (*SAGE-Tags*) von 10 – 14 Basen Länge hergestellt, welche ein Transkript eindeutig identifizieren, und den Genexpressionsspiegel aufgrund der Frequenz des Auftretens der 3'-Signatur der *SAGE-Tags* ermitteln. Da die Sequenz-Information, die in den 10 – 14 Basen des *SAGE-Tags* enthalten ist, sehr gering ist, wird eine umfangreiche Sammlung an cDNA-Sequenzen für das zu analysierende biologische System benötigt.

Die Weiterentwicklung dieser Techniken führte schließlich zu den cDNA-Mikroarrays (Schena et al., 1995) und den Oligonukleotid-Mikroarrays (Genchips) von Affymetrix (Chee et al., 1996), welche die simultane Analyse der mRNA-Expression von mehreren tausend Genen möglich machen. Bei diesen werden zwischen 100 bis 40000 Gen-spezifische Sonden, entweder cDNA-Fragmente (500 bis 5000 bp lang) oder Oligonukleotide (25 bis 80 bp lang), auf einer Oberfläche (Glas, Kunststoff bzw. Silizium) verankert, an welche die zu analysierende Fluoreszenz-markierte RNA bindet. Das Fluoreszenz-Signal ist anhängig von der Stärke der RNA-Expression und wird mit einem hochauflösenden Farbscanner gemessen. Einer der größten Vorteile dieser Methode gegenüber den bereits erwähnten ist, dass jeder Punkt auf dem Mikroarray eine bekannte Sequenz enthält, d. h. jedes Signal kann sofort mit einer Gensequenz in Verbindung gebracht werden. Das bedeutet gleichzeitig, dass, anders als bei *Differential Display* oder SAGE, nur bekannte Sequenzen analysiert werden können. Mit dieser Technik können umfassende Genexpressionsprofile von Zellen und Geweben erstellt werden und durch den Einsatz entsprechender Software mit anderen verglichen werden, um in kürzester Zeit die Unterschiede in der Genexpression zweier Systeme zu erfassen.

## 6. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Affymetrix Genechip Technologie Gene in Ovarkarzinomzellen zu ermitteln, welche als neue Angriffsziele in der Diagnostik oder Therapie des Ovarkarzinoms dienen können. Geeignete Zielgene für diese Zwecke sollten im Vergleich mit normalen epithelialen Zellen des Eierstocks im Karzinom überexprimiert sein (Bast et al., 2000).

Durch den Vergleich des Genexpressionsprofils von elf Ovar tumor-Zelllinien mit dem zweier Kontroll-Zelllinien, die aus gesundem Epithelgewebe des Ovars etabliert wurden, sollten zunächst differentiell exprimierte Gene ermittelt werden. Bei der Suche nach Kandidatengenen sollte besonderer Fokus auf Gene gelegt werden, welche in den Tumorzellen überexprimiert sind und deren Proteine entweder auf der Oberfläche der Zellen lokalisiert sind bzw. auf solche, die für sezernierte Proteine kodieren.

Kandidatengene sollten in Expressionsstudien in Ovar tumor-Gewebeproben bzw. Patientenserum hinsichtlich ihres Potentials als Tumormarker getestet werden. In funktionellen Studien sollte dann mittels einer transfizierten Ovar tumor-Zelllinie untersucht werden, ob ein Kandidatengen den Phänotyp der Tumorzellen verändern und zur Malignität beitragen kann.

## II. Material und Methoden

### 1. Material und Bezugsquellen

#### 1.1 Verwendete Kulturen und Gewebe

##### 1.1.1 Humane Zelllinien

Zelllinie	FIGO-Stadium	Differenzierungsgrad	Histologische Klassifizierung	Herkunft
<sup>1</sup> HI	III	*	serös-papillär	Aszites
<sup>1</sup> HB	III	3	adeno-papillär	Aszites
<sup>1</sup> OC	III	*	serös-papillär	Aszites
<sup>1</sup> GG	III	2	serös-papillär	Bauchnetzmetastase
<sup>1</sup> DW	III	3	adeno-papillär	Aszites
<sup>2</sup> OV-MZ-1	III	2	*	Aszites
<sup>2</sup> OV-MZ-2	IV	*	*	Aszites
<sup>3</sup> OV-MZ-6	IV	2	serös-papillär	Aszites
<sup>3</sup> OV-MZ-9	III	2	serös-papillär	Pleura
<sup>3</sup> OV-MZ-15	III	2	serös-papillär	Solides Ovarkarzinom
<sup>3</sup> OV-MZ-30	IV	*	serös-papillär	Pleura

**Tabelle 4: Humane Ovar tumor-Zelllinien.** <sup>1</sup> Erhalten von Prof. Sepp Kaul, Frauenklinik der Universität Heidelberg (unveröffentlicht); <sup>2</sup> erhalten von Prof. Sepp Kaul, Frauenklinik der Universität Heidelberg (Mobus et al., 1992); <sup>3</sup> RNA erhalten von Prof. Robert Zeillinger, Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie, Universität Wien (Mobus et al., 1994); \* keine Angabe.

Humane SV-40 large T-immortalisierte ovariale Epithel-Zelllinien	
IOSE 80	<i>SV40 large T-immortalised ovarian surface epithelial cell line</i>
IOSE 144	<i>SV40-large T-immortalised ovarian surface epithelial cell line</i>

**Tabelle 5: IOSE-Zelllinien.** Referenz-Zelllinien, etabliert aus Oberflächen-Epithelzellen des Eierstocks, bereitgestellt von Prof. Nelly Auersperg, Universität von British Columbia, Vancouver, Kanada (Maines-Bandiera et al., 1992).

### 1.1.2 Humane Gewebeschnitte

Alle verwendeten Gewebeschnitte wurden von Dr. Helmut Deissler, Frauenklinik Ulm, erhalten.

### 1.1.3 *E. coli*-Stämme

Für Klonierungen werden superkompetente XL1-Blue-Zellen der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet.

## 1.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
T7-(T) <sub>24</sub>	5'GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'	cDNA-Synthese Affymetrix
L1CAMFL3NotI_for	5'-ATT TGC GGC CGC AAA GAT GGT CGT GGC GCT GCG G-3'	Klonierung
L1CAMFL2XbaI_rev	5'-CAG CAT CTA GAG TCC TGG ACT CCA CTA TTC T-3'	Klonierung
SeqL1CAM601_for	5'-ACT TTG CCA ATG TGC TCA CCT C-3'	Sequenzierung
SeqL1CAM1210_rev	5'-GTG ACA CAA TGG TGA CCC AAT G-3'	Sequenzierung
SeqL1CAM1807_for	5'-AAC TGG ATG TGG TGG AGA GTA G-3'	Sequenzierung
T7_for	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	Sequenzierung
BGHR_rev	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'	Sequenzierung
L1CAMNB_for	5'-GGA AGG CAT TGA AAT CCT CA-3'	Northern-Sonde, Sequenzierung
L1CAMNB_rev	5'-CTG TAC TCG CCG AAG GTC TC-3'	Northern-Sonde
Jag2NB_for	5'-AAT GGT GGC ATC TGT GTT GA-3'	Northern-Sonde
Jag2NB_rev	5'-TTG CAC TGG TAG AGC ACG TC-3'	Northern-Sonde
NMUNB_for	5'-AGA TGC TGCTGC GAA CAG AGA GC-3'	Northern-Sonde
NMUNB_rev	5'-CAA CAC AGG GAT TTT CAA CAG A-3'	Northern-Sonde
GAPD_for	5'-TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA-3'	Northern-Sonde
GAPD_rev	5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG TCC TTC-3'	Northern-Sonde
LCL1CAM_for	5'-CCT TTC GCC ACA GTA TGT CAG-3'	PCR*
LCL1CAM_rev	5'-ACT CAC AAA GCC GAT GAA CC-3'	PCR*
LC18srRNA_for	5'-AGT TGG TGG AGC GAT TTG TC-3'	PCR*
LC18srRNA_rev	5'-CGC TGA GCC AGT CAG TGT AG-3'	PCR*
LCcycloph_for	5'-ATG GCA AGC ATG TGG TGT T-3'	PCR*
LCcycloph_rev	5'-AGG ATA CTG CGA GCA AAT GG-3'	PCR*
LCE-CAD_for	5'-TGG CTT CCC TCT TTC ATC TC-3'	PCR*
LCE-CAD_rev	5'-CAT CTC CAA GCC CAC TTT TC-3'	PCR*

Name	Sequenz	Verwendung
LCDDR1_for	5'-TGT ACC TCA ACG ACT CCA CCT-3'	PCR*
LCDDR1_rev	5'-AGC CGG TCA AAC TCA AAC TC-3'	PCR*
Jag2_for	5'-GGG TCG TAC TTG CAC TCA CA-3'	PCR*
Jag2_rev	5'-CCG TTG ATC TCA TCC ACA CA-3'	PCR*
LCNMU_for	5'-ACA GCC TGA ACA ACA GCT ACA-3'	PCR*
LCNMU_rev	5'-TGC CCA ACT TCT GTG TCT TC-3'	PCR*
LCSLPI_for	5'-TGT GGA AGG CTC TGG AAA GT-3'	PCR*
LCSLPI_rev	5'-GCT TCC TCC TTG TTG GGT TT-3'	PCR*
LCTetraspan1/2_for	5'-GTG TGG AAC ACC ACC ATG AA-3'	PCR*
LCTetraspan1/2_rev	5'-GCT GAT TGA AGC AAC CCT CT-3'	PCR*

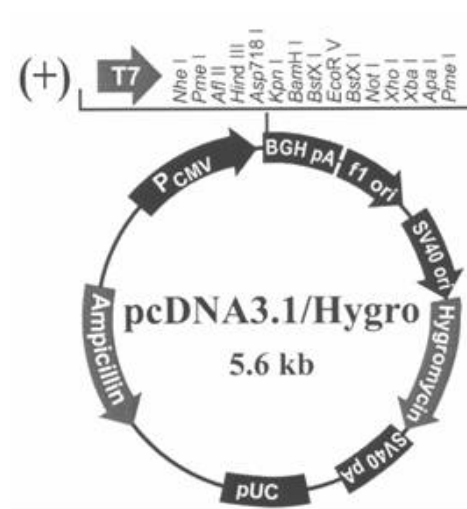
**Tabelle 6: Oligonukleotide und ihre Verwendung.** Alle Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. \*PCR basierend auf dem LightCycler System

### 1.3 RNA-, DNA- und Proteinstandards

RNA Millenium Marker	Ambion, Austin, USA
DNA Längenmarker IV	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA Längenmarker VII	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA 500 bp Ladder	Roche Diagnostics, Mannheim
Low DNA Mass Ladder	Roche Diagnostics, Mannheim
Multimark Multi-Colored Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 1.4 Vektor

Für die Klonierung von LICAM wird der Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Vektors pcDNA3.1/Hygro von Invitrogen.**

## 1.5 Antikörper

### 1.5.1 Primäre Antikörper

Name	Verwendung	Bezugsquelle
L1CAM IgG <sub>1</sub> /κ (Maus, mAb), Klon UJ125	Westernblot, Immunhistochemie IHC (ready-to-use), Immunzytochemie IZC	Neomarkers, Freemont, CA, USA
L1CAM IgG <sub>2a</sub> (Ziege, mAb), Klon 5G3	FACS	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Negativ Kontrolle, Maus IgG <sub>1</sub>	Isotyp-Kontrolle für FACS	Neomarkers, Freemont, CA, USA
Negativ-Kontrolle, Maus IgG <sub>1</sub>	Isotyp-Kontrolle bei IHC	Cederlane, Ontario, Canada

**Tabelle 7: Primäre Antikörper, ihre Verwendung und Bezugsquelle.**

### 1.5.2 Sekundäre Antikörper

Name	Verwendung	Bezugsquelle
Anti-Streptavidin IgG (Ziege)	Affymetrix	Santa Cruz, Heidelberg
Biotinylierter Anti-Ziege IgG (Maus)	Affymetrix	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phycoerythrin-gekoppelter Anti-Ziege IgG (Maus)	FACS	Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA
CY3-gekoppelter Anti-Maus IgG (Ziege)	Immunzytochemie	Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA
Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus IgG (Ziege)	Westernblot	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Envision Mouse HRP-System Ready-to-use	Immunhistochemie	Dako, Hamburg

**Tabelle 8: Sekundäre Antikörper, ihre Verwendung und Bezugsquelle.**

## 1.6 Arrays

### 1.6.1 Affymetrix-Arrays

Affymetrix HG U95Av2 Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Affymetrix Test2-Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

### 1.6.2 Gewebe-Array

Ovartumor-Gewebearray CJ1	Biocat, Heidelberg
---------------------------	--------------------

## 1.7 Reaktionssysteme

BCA Protein Assay Kit	Pierce Rockford, IL, USA
DNA-Free Kit	Ambion, Austin, USA
DAKO ChemMate Detection Kit, DAB/Peroxidase	Dako, Hamburg
Expand High Fidelity <sup>PLUS</sup> PCR-System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
First Strand cDNA-Synthese Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
High Fidelity PCR Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler DNA Master	
SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lumi-Light <sup>plus</sup> Western blotting Substrat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Megascript T7 Kit	Ambion, Austin, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Strip-EZ DNA Kit	Ambion, Austin, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNeasyMini/Midi Kit	Qiagen, Hilden
Superscript II Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
WST-1 Proliferation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 1.8 Enzyme

Superscript II RT	Invitrogen, Carlsbad, USA
E. coli DNA-Ligase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Alle verwendeten Restriktionsenzyme (und passende Puffer)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 1.9 Nukleinsäuren

First Choice Normal Tissue Ovary Total RNA      Ambion, Austin, USA

Gesamt-RNA der Zelllinien OV-MZ-6, OV-MZ-9, OV-MZ-15 und OV-MZ-30 (s. Tab. 4, S.27) sowie Gesamt-RNA aus 38 Geweben von Ovarialtumoren fortgeschrittenen Grades (G3/4) wurde von Prof. Robert Zeillinger, Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie, Universität Wien erhalten.

## 1.10 Chemikalien und biochemische Reagenzien

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP (370 MBq/ml)	Amersham, Braunschweig
Agarose MP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Antifoam O-30	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Complete Mini, EDTA-free	
Proteasehemmer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbeccos MEM/NUT MIX F-12 (HAM)	Invitrogen/Gibco, Carlsbad, USA
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut pro analysis	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ExpressHyb Northern Hybridisierungslösung	Ambion, Austin, USA
Fibronektin	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
FKS	Invitrogen Carlsbad, USA
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hygromycin B	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hybridoma-SFM	Invitrogen/Gibco, Carlsbad, USA
Insulin/Transferrin	BioWitthaker, Walkersville, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kollagen I	BD Bioscience, San Jose, USA
Kollagen IV	BD Bioscience, San Jose, USA
Laminin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LE-Agarose	Ambion, Austin, USA
Magermilchpulver	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
$\beta$ -Mercapto-EtOH	Fluka, Neu-Ulm
MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaCl, 5M, RNase-free	Ambion, Austin, USA
NorthernMax, 10x Denaturing Gel Puffer	Ambion, Austin, USA
NorthernMax, Formaldehyd Loadingbuffer	Ambion, Austin, USA
NorthernMax, Running Buffer	Ambion, Austin, USA
Northern ULTRAHyb-Lösung	Ambion, Austin, USA
NuPAGE LDS Auftragspuffer 4x	Invitrogen Carlsbad, USA
NuPAGE MES Running Buffer	Invitrogen Carlsbad, USA



NuPage Reducing Agent	Invitrogen Carlsbad, USA
PBS, steril	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Perhydrol®	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Reveal Antigen Retrieval Solution 10x	Biocarta, Carlsbad, USA
RNaseZap	Ambion, Austin, USA
SDS-Lösung, 20 %	Ambion, Austin, USA
SSC-Lösung (20 %)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Streptavidin/Phycoerythrin (SAPE)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Triton®X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tween-20, 10 %	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Velcorin (Dimethyldicarbonat)	Bayer, Leverkusen
Vitronectin	BD Bioscience, San Jose, USA
Xylol	Merck, Darmstadt
Velcorin (Dimethyldicarbonat)	Bayer, Leverkusen

### 1.11 Verbrauchsmaterialien

Affymetrix HG_U95A_Genechip	Affymetrix, Santa Clara, USA
BD BioCoat™Matrigel™ Invasion Chamber	BD Bioscience, San Jose, USA
BrightStar-Plus Nylonmembran	Ambion, Austin, USA
LightCycler Kapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Nitrocellulose Membran (0,2 µm Porengröße)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage Bis-Tris Gele, 10 %	Invitrogen, Carlsbad, USA
Quick Spin Columns	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Röntgenfilm Cronex 5	Agfa-Gevaert N.V., Belgien
SuperfrostPlus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Whatmanpapier 3MM	Biometra, Göttingen

## 1.12 Puffer und Lösungen

Fragmentierungspuffer	200 mM Tris-Acetat, pH 8,1 150 mM Magnesium-Acetat 500 mM Kalium-Acetat
MES-Hybridisierungspuffer	Kontroll-cRNA (1,5; 5; 25 und 100 pM) 50 pM Kontroll-Oligonukleotide 100 µg/ml fragmentierte Heringssperma-DNA 500 µg/ml azetyliertes BSA 50 mM MES 0,5 M NaCl 10 mM EDTA 0,005 % Tween 20
Stringenter Waschpuffer	75 mM MES Na-Salz 27,5 mM MES-freie Säure 100 mM NaCl 0,01 % Tween-20; sterilfiltrieren, 0,22 µm
Nicht-stringenter Waschpuffer	0,9 M NaCl 60 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6 mM EDTA 0,005 % Triton X-100 0,01 % (w/v) Antifoam-30 0,02 % Tween-20; sterilfiltrieren, 0,22 µm
2x Färbepuffer	150 mM MES Na-Salz 200 mM MES-freie Säure 1 M NaCl, RNase-frei 0,1 % Tween-20 0,01 % (w/v) Antifoam-30; sterilfiltrieren, 0,22 µm
Färbelösung 1	1x Färbepuffer 10 µg/ml rekombinantes Streptavidin und 2 µg/µl azetyliertes BSA
Färbelösung 2	1x Färbepuffer 100 µg/ml Anti-Streptavidin IgG (Ziege) 3 µg/ml biotinylierter Anti-Ziege IgG 2 µg azetyliertes BSA

---

SAPE-Färbelösung	1x Färbepuffer 1 mg/ ml Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) 2 µg azetyliertes BSA
Northern-Waschpuffer 1	2x SSC-Lösung 0,05 % SDS-Lösung (20 %)
Northern-Waschpuffer 2	0,1x SSC-Lösung 0,1 % SDS-Lösung (20 %)
RIPA-Puffer	50 mM Tris/CL, pH 7,5 375 mM NaCl 1 % Nonidet P40 0,5 % Na-Desoxycholat 0,1 % SDS 1x Proteasehemmer Complete Mini
TBS-Puffer	100 mM Tris/Cl, pH7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween	100 mM Tris/Cl, pH7,5 150 mM NaCl 0,1 % Tween-20
10x MOPS-Puffer	0,2 M MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
Transferpuffer	50 mM Tris 39 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS 20 % (v/v) MeOH
TAE-Puffer	0,4 M Tris 0,2 M Eisessig 0,1 M EDTA; pH 8,4
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4

IHC-Block	10 % Ziegen Serum 1 % BSA 1x PBS
LS-Na-Phosphatpuffer	150 mM NaCl 10 mM Na-Phosphat
HS-Na-Phosphatpuffer	500 mM NaCl 20 mM Na-Phosphat
GSDB-Puffer	20 % Ziegen Serum 0,3 % Triton X-100 450 mM NaCl 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4

## 1.13 Medien

### 1.13.1 Zellkultur humaner Zellen

Spezial-Medium	400 ml Hybridoma-SFM 400 ml Dulbeccos MEM/NUT MIX F-12 320 µl Pen/Strep 1x 100 µl Insulin/Transferrin 8 % FKS
Einfriermedium	10 % DMSO 90 % FKS

### 1.13.2 *E. coli*-Medien

LB-Medium	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
LB-Glyzerin-Medium (für Dauerkulturen)	LB-Medium und 100 %iges Glyzerin im Verhältnis 1:1
LB-Platten	LB-Medium mit 2 % Bacto-Agar

## 2. Methoden

### 2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.1.1 Arbeiten mit *E. coli*

##### 2.1.1.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme werden bei 37 °C im LB-Flüssigmedium bei 180 RPM geschüttelt oder auf LB-Platten kultiviert. Für eine kurzfristige Lagerung können die Zellen bei 4 °C deponiert werden. Für eine langfristige Aufbewahrung werden Dauerkulturen angelegt. Dazu werden die Zellen aus 1 ml Übernachtskultur kurz abzentrifugiert, in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und 0,5 ml 100 %iges Glycerin zugegeben. Die Dauerkultur wird anschließend schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

##### 2.1.1.2 Transformation

Ein Aliquot kompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen wird auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl kompetenter Zellen werden 1,7 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann werden 0,1 – 50 ng DNA aus dem Ligationsansatz zugegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 41 °C für exakt 45 s und eine Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl vorgewärmtem SOC-Medium wird der Ansatz 1 h bei 37 °C bei 250 RPM geschüttelt und danach auf vorgewärmte LB/Amp-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37 °C.

##### 2.1.1.3 Plasmid-Minipräparationen

4 ml einer Übernachtskultur werden nacheinander in einem 2 ml-Eppendorfgefäß abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die weitere Präparation erfolgt mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers.

## 2.1.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

### 2.1.2.1 Auftauen von Kryokulturen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen werden so schnell wie möglich bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und direkt in reichlich (20 – 40 ml; je nach Empfindlichkeit der Zellen) vorgewärmtes Medium gegeben. Nach Pelletierung bei 1000 RPM für 5 min werden die Zellen in warmem Medium resuspendiert und in eine T75-Kulturflasche gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen.

### 2.1.2.2 Einfrieren von Zellen

Es werden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in 4 °C in 1 ml kaltem FKS mit 10 % DMSO resuspendiert, in einer vorgekühlten Isopropanol-Box mind. 24 h in –80 °C aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.1.2.3 Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien IOSE 80, IOSE 144, DW, GG, HB, HI, OC, OV-MZ-1 und OV-MZ-2 werden im angegebenen Spezial-Medium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei 70 – 80 % Konfluenz werden die Zellen subkultiviert. Die Zelllinien OV-MZ-6, -9, -15 und -30 werden unter gleichen Bedingungen im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Zeillinger kultiviert.

### 2.1.2.4 Subkultivierung

Das Medium wird abgesaugt, die Zellen mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Anschließend wird Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und bis zum Ablösen der Zellen (Mikroskop) bei RT oder 37 °C inkubiert. Mit warmem Medium werden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgespült und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen werden 5 min bei 1000 RPM pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und je nach Bedarf 1:3 oder 1:5 in eine neue Kulturflasche überführt.

### 2.1.2.5 Zellernte

Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 70 – 80 % geerntet. Dazu werden die Zellen nach Absaugen des Mediums zunächst mit 10 ml vorgewärmtem PBS gewaschen, um Mediumreste und nicht adhärente Zellen zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA bis zum Ablösen der Zellen bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 ml Medium gestoppt und die Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach Pelletierung der Zellen bei 1000 RPM für 5 min werden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert. In einem Aliquot wird mit Trypan-Blue-Färbung (1:1) die Lebend-Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Danach werden die Zellen in Aliquots von ca.  $1 \times 10^8$  in 15 ml Falcon-Röhrchen pipetiert, bei 1000 RPM für 5 min pelletiert und nach Abnahme des Überstandes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.2.6 Herstellung stabiler Transfektanten

Am Vortag werden  $5 \times 10^5$  Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und über Nacht bis zu einer Konfluenz von 80 % im Brutschrank inkubiert.

Am Tag der Transfektion wird zunächst das Transfektionsreagens Lipofectamine2000 (Invitrogen) mit serumfreiem Medium vermischt und 5 min bei RT inkubiert (Ansatz 1). In der Zwischenzeit wird die zirkuläre Plasmid-DNA in serumfreies Medium gegeben (Ansatz 2) und nach der obigen Inkubationszeit mit dem Ansatz 1 vermischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Das eingesetzte Verhältnis Lipofectamine2000 zu Plasmid-DNA beträgt nach vorausgegangener Optimierung 6:3 (6  $\mu\text{l}$  Lipofectamine2000: 3  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA). Die Zellen werden in 500  $\mu\text{l}$  serumfreies Medium gegeben und der gesamte Ansatz nach der Inkubationszeit dazugegeben. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wird das Transfektionsmedium durch serumhaltiges Medium ersetzt. Nach zwei Tagen werden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:5) in 10 mm Kulturschalen umgesetzt und in Selektionsmedium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B kultiviert, bis einzelne Kolonien resistenter Zellen sichtbar werden. Diese resistenten Kolonien werden mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert, in 96-Lochplatten umgesetzt und vermehrt. Die transfizierten Zellen werden ständig unter Selektionsdruck (100  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B) kultiviert.

### 2.1.2.7 Invasions- und Motilitätstest

Im Invasionsstest werden die Zellen in eine Kammer ausgesät, die von einer zweiten Kammer durch eine mit Matrigel beschichtete Kunststoff-(PET-)Membran mit einer Porengröße von 8 µm getrennt ist. Das Matrigel ist so zusammengesetzt, dass es die Basalmembran imitiert. Wachsen die Zellen invasiv, so dringen sie durch die Matrigelschicht und die Membran in der sogenannten Boyden-Kammer in das untere Kompartiment vor. Der Motilitätstest entspricht dem Invasionsstest mit der Ausnahme, dass die Kunststoffmembran nicht mit Matrigel beschichtet ist und die Zellen nur durch die Poren der Membran migrieren können.

Für diesen Versuch werden 24-Lochplatten mit Filtereinsätzen von BD Bioscience verwendet. Die Filtereinsätze für den Invasionsstest (BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber) werden 2 h vor Versuchsbeginn im Standard-Kulturmedium rehydriert. Es werden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen in 500 µl Medium mit 5 % FKS aufgenommen und in das obere Kompartiment gegeben (Zweifach-Bestimmung). In die untere Kammer werden 800 µl Medium mit 20 % FKS als Chemoattraktant pipettiert. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank werden die Zellen von der oberen Seite der Membran vorsichtig mit einem Baumwollstäbchen entfernt. Die Zellen, die sich auf der unteren Seite der Membran und in der unteren Kammer befinden werden mit Hilfe des WST-1 Tests bestimmt. Dazu werden in die untere Kammer 500 µl Medium mit 10 % WST-1 Reagenz gegeben und 3 h bei 37 °C inkubiert. Bei der Kontrolle werden alle Zellen gemessen und dazu in die obere Kammer 250 µl und in die untere 500 µl Medium mit 10 % WST-1 Reagenz gegeben. Anschließend werden 100 µl zur Messung in eine 96-Loch-Platte überführt und die optische Dichte bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm; TECAN X-Read Plus, Tecan, Crailsheim) bestimmt. Die Invasion bzw. Motilität der Zellen wird, wie folgt, prozentual zur ausgesäten Zellzahl nach Inkubationszeit in beiden Kammern berechnet:

$$\% \text{ Invasion/Motilität} = \text{oD}_{450} (\text{untere Kammer}) * 100 / \text{oD}_{450} (\text{obere} + \text{untere Kammer})$$

### 2.1.2.8 Adhäsionstest

#### 2.1.2.8.1 Beschichtung der Platten

Im Adhäsionstest werden 96-Lochplatten eingesetzt, deren Oberfläche unbehandelt ist. Die verwendeten Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Vitronectin werden in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen von 40 µg/ml (bzw. 0,4 µg/ml für Vitronectin) verdünnt. Je Vertiefung werden 50 µl der



Proteinlösungen ( $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  bzw.  $50\text{ ng}/\text{cm}^2$  für Vitronektin) zugegeben und die Platten für 1 h bei RT und dann über Nacht bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag werden die Überstände abgenommen und die Vertiefungen zweimal mit PBS gewaschen.

#### 2.1.2.8.2 Durchführung des Adhäsionstests

Bei einer Konfluenz von 80 % werden die Zellen mit einer 0,5 mM EDTA-Lösung in PBS vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach zwei Waschschritten mit PBS bringt man die Zellen in serumfreiem Medium auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml und inkubiert sie für 30 min bei RT mit  $10\ \mu\text{l}$  Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM). Nach dieser Markierung werden die Zellen zweimal mit warmem serumfreiem Medium gewaschen und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml gebracht. Je  $100\ \mu\text{l}$  dieser Zellsuspension werden in die beschichteten Vertiefungen gegeben und für 90 min bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert (Achtfach-Bestimmung). Ein gleiches Aliquot von je  $1 \times 10^5$  markierten Zellen werden zur Bestimmung der Ausgangszellzahl in unbeschichtete Vertiefungen gegeben. Nach der Inkubationszeit werden die nicht adhärenen Zellen zweimal vorsichtig mit warmem PBS abgewaschen, und die verbleibenden Zellen werden mit einer 1:1 Mischung aus PBS und serumfreiem Medium überschichtet. Die Fluoreszenz der adhärenen Zellen wird mit Hilfe eines SpectraFluor Plus-Lesers (Tecan, Crailsheim) mit einem Fluoreszenzfilter von 485 nm bei einer Referenzwellenlänge von 535 nm gemessen. Die Anzahl der adhärenen Zellen ist direkt proportional zur detektierten Fluoreszenz und wird relativ zur Ausgangszellzahl wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Adhäsion} = F_{485} (\text{adhärente Zellen}) * 100 / F_{485} (\text{Ausgangszellzahl})$$

## 2.2 Arbeiten mit RNA

Bei allen Arbeiten mit RNA wird RNase-freies Wasser, das zu diesem Zweck mit Dimethyldicarbonat behandelt wird, verwendet. Alle Komponenten, die mit RNA in Berührung kommen können, werden für 10 min mit RNaseZap behandelt und anschließend mit RNase-freiem Wasser gespült. Außerdem werden spezielle RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet.

### 2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

$1 \times 10^8$  Zellen werden in 7,6 ml RLT-Puffer resuspendiert und mit einem Ultraturax T25 (Janke und Kunkel, IKA Labortechnik) ca. 1 min lang aufgeschlossen. Anschließend wird die RNA von je  $3,8\ \text{ml}$  Zellen mit Hilfe des QIAquick RNeasy Midikits nach Vorschrift des Herstellers isoliert und die Konzentration photometrisch (s. Kap. II.2.2.2, S. 42) bestimmt.

## 2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen werden mit einem Spektralphotometer (Kontron Spektralphotometer, Uvikon 931) bestimmt. Nach Abgleichen der Nullwerte wird das Absorptionsmaximum der untersuchten Nukleinsäuren bei 260 nm bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 230 nm) ermittelt. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$C \text{ [mg/ml]} = (E_{260} - E_{320}) * f * c$$

C = Konzentration der Probe

E = Extinktion

f = Verdünnungsfaktor

c = Konzentration standard/ Extinktion standard

für doppelsträngige DNA: c = 0,05 mg/ml

für einzelsträngige DNA: c = 0,025 mg/ml

für RNA: c = 0.04 mg/ml

E230 = Extinktion von Salzen

E260 = Extinktion von DNA/RNA

E280 = Extinktion von Proteinen

E320 = Nullwert

Der Quotient E260/E280 ist ein Maß für die Reinheit der DNA/RNA und sollte  $2,0 \pm 0,3$  betragen.

## 2.2.3 Northernanalyse

### 2.2.3.1 Northerntransfer

8 µg Gesamt-RNA werden in einem Volumen von 5 µl mit 15 µl Formaldehyd-Ladepuffer für 15 min bei 65 °C denaturiert und in einem 1 %igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nur dem Größenmarker (RNA-Millennium Marker, Ambion) wird zur Sichtbarmachung unter UV-Licht (254 nm) Ethidiumbromid zugegeben, welches eventuell den anschließenden RNA-Transfer der Proben beeinträchtigen könnte.

Die so aufgetrennte RNA wird mittels Kapillartransfer abwärts vom Gel auf eine Nylonmembran überführt (Chomczynski, 1992). Der Transferaufbau erfolgt nach Angaben des Membran-Herstellers (Ambion). Nach zweistündigem Transfer wird die Membran kurz im Laufpuffer gewaschen und die RNA im Stratalinker (Stratagene UV Stratalinker2400) bei 120 mJ kovalent auf

der Membran fixiert. Anschließend kann die Membran bis zur weiteren Verwendung in Plastikfolie eingeschweißt und bei -20 °C gelagert werden.

#### 2.2.3.2 Radioaktive Markierung von RNA

Die Markierung der RNA mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP wird nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) mit Hilfe des Strip-EZ™ DNA-Kits (Ambion) durchgeführt. Dazu werden 25 ng des DNA-Fragmentes in 9  $\mu$ l Gesamtvolumen für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Klenow-Reaktion wird gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt und nach 30 min bei 37 °C im Wasserbad mit 1  $\mu$ l EDTA gestoppt. Der Ansatz wird dann auf eine Sephadex-Säule (Mini Quick Spin RNA Column, Roche) pipetiert und für 4 min bei 5000 RPM zentrifugiert, um nicht eingebautes [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP zu entfernen. Von diesem Eluat wird wieder 1  $\mu$ l abgenommen und die Einbaurrate gemessen.

#### 2.2.3.3 Northernblot-Hybridisierung

Nach einer Hitzedenaturierung für 10 min bei 90 °C werden  $1 \times 10^7$  cpm der markierten Sonde zu 10 ml der bei 68 °C vorgewärmten ExpressHyb-Lösung (Ambion) zugegeben. Die Nylonmembran mit der transferierten RNA wird in eine Plastikhülle eingeschweißt und für 30 min mit der Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Anschließend erfolgt die Zugabe der Hybridisierungslösung mit der denaturierten Sonde; die Inkubation erfolgt über Nacht bei 68 °C.

Am nächsten Tag wird die Membran zuerst für 30 min in Northern-Waschpuffer<sup>1</sup> bei RT und anschließend im stringenten Northern-Waschpuffer<sup>2</sup> für 15 min bei 50 °C gewaschen. Zur Signaldetektion wird ein Röntgenfilm bei -80 °C exponiert und am Entwicklerautomaten entwickelt (Agfa Curix HT330U).

#### 2.2.3.4 „Strippen“ von radioaktiv markierten Northernblots

Radioaktiv markierte DNA-Sonden können mittels des Strip-EZ DNA-Kits (Ambion) wieder von der Membran abgelöst werden. Die Verwendung erfolgt nach Herstellerangaben.

#### 2.2.4 DNase-Verdau

25 – 100  $\mu$ g total RNA wird mit Hilfe des DNA-free Kits von Ambion nach Vorschrift des Herstellers von DNA-Kontamination aufgereinigt und die Konzentration der RNA photometrisch (Kontron Photometer, Uvikon 931) bestimmt.

### 2.2.5 RT-PCR (Erststrang cDNA-Synthese)

Von 1 µg DNA-freier Total-RNA wird mit Hilfe des First Strand cDNA-Synthese Kit for RT-PCR (AMV, Roche) die Erst-Strang-cDNA-Synthese nach empfohlenem Programm mit Random-Hexamer-Primern durchgeführt.

### 2.2.6 PCR basierend auf dem LightCycler System

#### 2.2.6.1 Prinzip der PCR basierend auf dem LightCycler System

Die PCR basierend auf dem LightCycler System ist ein hochempfindliches und sehr selektives Verfahren zur DNA- und RNA-Quantifizierung. Da beim LightCycler PCR-Gerät und Fluorimeter kombiniert sind, bietet es gegenüber der konventionellen PCR den Vorteil, dass zum einen die Reaktion wesentlich schneller ablaufen kann und zum anderen die Amplifikation der PCR-Produkte in jedem Zyklus, also in Echtzeit, aufgezeichnet und beobachtet werden kann.

Für diese Methode gibt es zwei verschiedene Fluoreszenz-Techniken, die die Messung der Amplifikationsrate ermöglichen: Die „Hybridisation-Probes“- und die „SYBR-Green“-Methode. In dieser Arbeit wurde nur mit der SYBR-Green-Methode gearbeitet, da sie einfacher zu Handhaben und für die Fragestellung optimal geeignet ist. SYBR Green I ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der in die kleine Furche doppelsträngiger DNA (dsDNA) bindet. Befindet sich der Farbstoff in Lösung, fluoresziert er nur minimal; sobald er an die dsDNA binden kann, verstärkt sich die Fluoreszenz um ein Vielfaches. Zu Beginn der Amplifizierung liegen DNA und Primer in denaturierter Form sowie der Farbstoff in Lösung vor, wodurch ein schwaches Hintergrund-Fluoreszenzsignal produziert wird. Während der Elongation entstehen mehr und mehr dsDNA-Fragmente, an die SYBR Green I binden kann. Die Fluoreszenz-Emission steigt mit wachsender Anzahl der Amplifikate exponentiell an. Die Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen, so dass die Reaktion genau erfasst wird.

#### 2.2.6.2 Semiquantitative Analyse von PCR-Produkten

Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt direkt zu Beginn der exponentiellen Phase. Dazu wird zunächst eine zur x-Achse parallel liegende sogenannte „Kreuzungs-Linie“ von der log-linearen Region jeder Kurve ermittelt, die signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Der Punkt, an dem diese Linie auf die Fluoreszenzkurve zu Beginn der exponentiellen Phase trifft, ist der sogenannte „Kreuzungspunkt“, anhand dessen die Konzentration des PCR-Produktes berechnet wird. Die Fluoreszenz-Intensität tritt umso früher in die exponentielle Phase ein, je mehr Matrize in der Probe enthalten ist. Um die Zyklenzahl des Kreuzungspunktes zu ermitteln, wird die

„*Second Derivative Maximum*“-Methode verwendet, die das Maximum der zweiten Ableitung einer Kurve bestimmt, an dem sich die Probenfluoreszenz am deutlichsten von der Hintergrundfluoreszenz absetzt.

Die Quantifizierungssoftware ermittelt anhand einer Standardkurve einen Wert für die jeweilige Probe. Diese wird von dem Haushaltsgens Cyclophilin A erstellt, und jedes untersuchte Zielgen wird anhand dieser Standardkurve relativ zu Cyclophilin A quantifiziert. Je 1 µg DNase-verdaute Gesamt-RNA einer Zelllinie (OV-MZ-1) wurde revers transkribiert und pro Reaktion je 2 µl einer Verdünnung von 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 und unverdünnt eingesetzt und daraus die Standardkurve erstellt. In jedem Lauf wurde Cyclophilin A aus einer 1:10-Verdünnung der cDNA aus einer der Zelllinien (OV-MZ-1) mitamplifiziert und über die Standardkurve die relativen Werte berechnet. Da Cyclophilin A deutlich stärker als die untersuchten Zielgene exprimiert wird, werden die Werte der Zielgene mit dem Faktor 1000 multipliziert, um positive Werte zu erhalten. Wird also bei einem Zielgen der gleiche Kreuzungspunkt ermittelt wie bei der 1:10-Verdünnung von Cyclophilin A, so beträgt sein Wert 100. Bei den angegebenen Werten handelt es sich also um relative Werte bezogen auf die Expression von Cyclophilin A.

### 2.2.6.3 Normalisierung

Um zu gewährleisten, dass immer die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wird und um Abweichungen, die eventuell aus der RT-PCR resultieren können, auszugleichen, werden die Werte anhand der Expression der 18S rRNA normalisiert. Jede RT-PCR wird durch Amplifikation der 18S rRNA überprüft und der erhaltene Wert zur Abgleichung der Proben herangezogen. Dazu werden die Werte der 18S rRNA-Expression der verwendeten Zelllinien gemittelt und die Abweichung der einzelnen Werte vom Mittelwert nach folgender Formel berechnet:

$$F_{(ZL)} = E_{(A)} / E_{(N)}$$

$$E_{\text{normalisiert (Zielgen)}} = F_{(ZL)} * E_{(Zielgen)}$$

$F_{(ZL)}$  = Faktor der jeweiligen Zelllinie

$E_{(N)}$  = Expression der 18S rRNA in der jeweiligen Zelllinie

$E_{(A)}$  = Gemittelte Expression der 18S rRNA aller verwendeten Zelllinien

$E_{(Zielgen)}$  = Expression eines Zielgens in der jeweiligen Zelllinie

Der Faktor ist für jede Zelllinie verschieden, je nach dem, wie stark die Expression der 18S rRNA ( $E_{(N)}$ ) einer Zelllinie vom Mittelwert der 18S rRNA Expression aller verwendeten Zelllinien ( $E_{(A)}$ ) abweicht.

### 2.2.6.4 Schmelzkurvenanalyse

Um die Spezifität des PCR-Produktes zu bestimmen, wird nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die die Analyse des Produktes mittels Gelelektrophorese ersetzt. Diese Methode basiert darauf, dass jede dsDNA einen charakteristischen Schmelzpunkt aufweist. Durch kontinuierliches Erhitzen der PCR-Produkte in der Kapillare wird die dsDNA langsam denaturiert und die Fluoreszenz sinkt mit zunehmender Temperatur. Da das erwünschte PCR-Produkt einen anderen Schmelzpunkt hat als eventuelle Nebenprodukte oder Primerdimere, kann so die Spezifität der Reaktion ermittelt und die PCR gegebenenfalls optimiert werden.

### 2.2.6.5 Durchführung

Für die PCR wird der LightCycler DNA-Master SYBR Green I-Kit (Roche) verwendet. Als Matritze werden gemäß der Empfehlung des Herstellers 2 µl cDNA verwendet. Die Amplifikation erfolgt in speziellen Glaskapillaren (Roche). Die Menge an MgCl<sub>2</sub>, die für eine optimale Primerbindung erforderlich ist, wird für jedes Primerpaar neu ermittelt, ebenso die Annealing-Temperatur. Alle Werte werden aus zwei unabhängigen cDNA-Synthese-Ansätzen ermittelt. Als Kontaminationskontrolle wird in einem Ansatz pro Lauf statt cDNA Wasser verwendet. Der Ablauf der gesamten Reaktion ist in Tabelle 9 dargestellt.

Programm	Temperatur [°C]	Haltezeit [s]	ΔT/Zeit [°C/s]
Denaturierung	95	60	20
PCR (40 Zyklen)	95	0	20
	57-60**	5	20
	72	10	20
	84*	1	20
Schmelzkurvenanalyse	95	0	20
	60	15	20
	95*	0	0,1
Kühlen	40	30	20

**Tabelle 9: Protokoll der semiquantitativen RT-PCR im LightCycler System.** Bei den mit \* gekennzeichneten Temperaturen erfolgt die Messung der Fluoreszenz während der PCR-Reaktion. Bei der Schmelzkurvenanalyse erfolgt diese kontinuierlich bis zum Erreichen der Endtemperatur. Die Annealing-Temperatur (\*\*) ist für die jeweiligen Primer verschieden.

## 2.3 Affymetrix Genchip Technologie

### 2.3.1 Erststrang-Synthese von cDNA

20 µg Gesamt-RNA werden für die Erststrang-Synthese mit dem SuperScript cDNA-Synthese Kit eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellers synthetisiert. Als Primer diente der T7-(T)24-Primer (s. Tab. 6, S. 28), der eine T7 RNA-Promotor-Stelle enthält. Die cDNA wird durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und der gesamte Ansatz für die nachfolgende IVT verwendet (s. unten).

### 2.3.2 Synthese biotinylierter cRNA (*in vitro* Transkription, IVT)

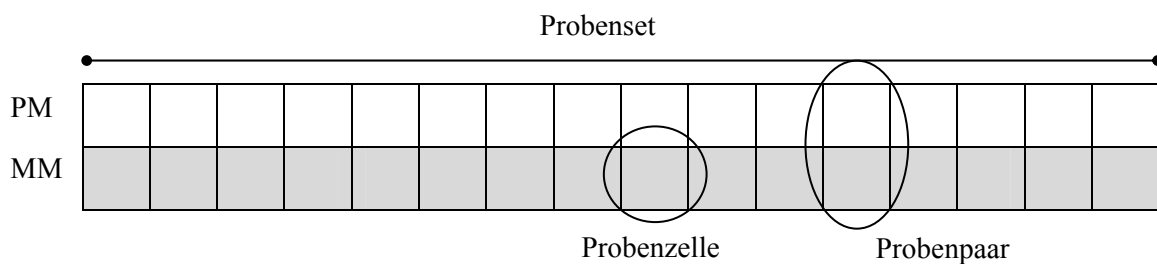
Bei der *in vitro* Transkription wird komplementäre RNA (cRNA) mit Hilfe des MegaScript T7-Kits (Ambion, Austin, USA) in Gegenwart von biotinyliertem UTP gemäß dem Protokoll des Herstellers synthetisiert. Die Aufreinigung der markierten cRNA erfolgt anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Die Konzentration der cRNA wird im Spektrometer (Uvikon 931) bei 260 nm bestimmt. 20 µg cRNA werden in Fragmentierungspuffer für 35 min bei 95 °C inkubiert. Der Ansatz kann bei -20 °C gelagert werden oder unmittelbar in die Hybridisierung eingesetzt werden.

### 2.3.3 Hybridisierung und Waschen der Genchips

15 µg fragmentierte cRNA werden in Hybridisierungspuffer gegeben (Endvolumen 300 µl). Dieser Hybridisierungscocktail wird in einen Genchip U95Av2 (Affymetrix, Santa Clara, USA) pipetiert und anschließend 16 h bei 45 °C unter Rotation im Hybridisierungssofen (Memmert, Schwabach) inkubiert. Nach der Hybridisierung werden die Genchips in einer Waschstation (Affymetrix FluidicsStation 400) gemäß den Herstellerangaben computergesteuert mit stringenten und nicht stringenten Waschpuffern gewaschen. Zum Nachweis und zur Verstärkung der Fluoreszenzsignale werden die Genchips nacheinander mit den Affymetrix-Färbelösungen 1-3 inkubiert. Zwischen jedem Färbeschritt und abschließend werden die Chips mit nicht stringentem Waschpuffer gewaschen. Kontroll-Oligonukleotide, die im Hybridisierungspuffer enthalten sind, hybridisieren am Rand und als Kreuz in der Mitte des Chips, um das Orientierungs-Gitter für die Auswertung positionieren zu können.

### 2.3.4 Beschreibung der Affymetrix Genchips

Auf den verwendeten Genchip U95Av2 Arrays der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) sind die Sequenzen von 12625 verschiedenen cDNAs repräsentiert. Diese Sequenzen stammen aus der Datenbank „GenBank“ und können unter <http://www.netaffx.com> eingesehen werden. Auf eine Glasoberfläche von 20  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$  werden ca.  $10^7$  Kopien eines Oligonukleotids von durchschnittlich 25 bp Länge synthetisiert. Diese Fläche wird als „Probenzelle“ bezeichnet. Die Sequenz des Oligonukleotids entspricht exakt derjenigen der jeweiligen cDNA und wird mit „PM“ (*PerfectMatch*) bezeichnet. Direkt neben einer PM-Zelle befindet sich ein Oligonukleotid mit einem homomeren Basenaustausch an Position 13, das mit „MM“ (*MisMatch*) bezeichnet wird. Ein Probenpaar (PP) besteht aus einer PM- und einer MM-Zelle. 16 Probenpaare entsprechen 16 verschiedenen Sequenzen jeder einzelnen cDNA und stellen ein „Probenset“ (PS) dar. Die Segmente eines Probensets sind über den gesamten Chip verteilt, so dass z. B. bei mechanischer Beschädigung eines Teilbereichs der Hybridisierungsfläche oder anderer Unregelmäßigkeiten die Information des Probensets erhalten bleibt.



**Abbildung 3: Anordnung von 16 Oligonukleotiden auf dem Chip, die einer cDNA aus den Datenbanken entsprechen.** Die Abkürzungen sind im Text erläutert.

### 2.3.5 Scannen der Genchips

Das Scannen der Genchips erfolgt mit einem HP GeneArray™ Scanners (Affymetrix). Als sog. *Average Difference* (AvgDiff) wird der Mittelwert der Fluoreszenzintensität innerhalb eines Probensets ermittelt, die einzelnen Fluoreszenzsignale ergeben sich aus der Intensität des *PerfectMatch* im Vergleich zum *MisMatch*. Die durch einen Laser erzeugte Fluoreszenz wird bei einer Auflösung von 3  $\mu\text{m}$ /Pixel als „dat-Datei“ gespeichert. Es werden 64 Pixel/Probenzelle berechnet. Da die Intensitäten aufgrund von Randeffekten u. ä. auf der Fläche nicht gleichmäßig verteilt sind, wird eine durchschnittliche Intensität pro Probenzelle berechnet, die als „cel-Datei“ gespeichert wird. Diese „cel-Datei“ bildet die Grundlage der quantitativen Datenauswertung, die in der „chp-Datei“ gespeichert werden.



### 2.3.6 Bestimmung des „*Absolute Call*“

Bei der Auswertung der Genchips wird für jedes Probenet der „*Absolute Call*“ (AbsCall) bestimmt, der angibt, ob ein Probenet als anwesend (*present* = p) oder nicht anwesend (*absent* = a) berechnet wird. Für jede Probenzelle wird eine durchschnittliche Intensität kalkuliert und das Hintergrundrauschen (Q), welches durch unspezifische SAPE Bindung an die Chip-Matrix entsteht, wird davon abgezogen. Liegt die Differenz aus den Intensitäten von PM und MM über einem signifikanten Schwellenwert (empirisch festgelegt) und der Quotient aus PM und MM über 1,5, so ist ein Probenpaar positiv. Entsprechend definiert sich ein negatives Probenpaar, wenn die Werte unter den Schwellenwerten liegen. Die Anzahl von positiven und negativen Probenpaaren beschreibt die Hybridisierungseffizienz jedes Probenets. Diese wird durch die „Positive Fraktion“ und die Positiv/Negativ Ratio angegeben. Die positive Fraktion gibt den Anteil positiver Zellen/Chip an. Die Positiv/Negativ Ratio ist der Quotient aus der Anzahl positiver Zellen und negativer Zellen. Die AvgDiff, der Mittelwert der Fluoreszenzintensität innerhalb eines Probenets, beträgt für ein Probenet, welches als anwesend gewertet wird, einen Schwellenwert von 200. Zudem wird die „LogAvgRatio“ ermittelt, die ein Maß für die Hybridisierungseffizienz von *PerfectMatch* und *MisMatch* darstellt. Aus diesen Größen wird der AbsCall ermittelt, der aufgrund empirischer Schwellenwerte die Signale als „*present*“, „*marginal*“ oder „*absent*“ berechnet.

### 2.3.7 Auswertung der Ergebnisse (RACE-A)

Die Auswertung der Daten wurde mit der von Roche entwickelten Software RACE-A (*Roche Affymetrix Chip Experiment-Analysis*) Version 1.3.3. durchgeführt. Dazu werden die „chp-Dateien“ vom Affymetrix Genchip Programm zu RACE-A transferiert. Alle Chip-Experimente, die miteinander verglichen werden sollen, werden als „Set“ bezeichnet. Dieses Set wird zunächst kreiert und die sog. Konditionen festgelegt, die miteinander verglichen werden sollen, d. h. jedes Chip-Experiment mit dem Expressionsprofil einer Zelllinie entspricht einer Kondition mit einer bestimmten Anzahl von Replikaten, in dieser Arbeit jeweils zwei. Die Referenz-Zelllinien werden als die „Basislinie“ festgelegt und als Replikate gemittelt (4 Stück). Mit dieser Basislinie ( $\text{AvgDiff}_{\text{Basislinie}}$ ) werden alle gewünschten Experimente ( $\text{AvgDiff}_{\text{Exp}}$ ) verglichen und die Unterschiede in der Genexpression, gemessen als AvgDiff, als sog. „*Change Factor*“ (CHGF) angegeben. Dieser Wert wird wie folgt berechnet:

$\text{CHGF} = (\text{AvgDiff}_{\text{Exp}} / \text{AvgDiff}_{\text{Basislinie}}) - 1$  für überexprimierte Gene bzw.

$\text{CHGF} = -(\text{AvgDiff}_{\text{Basislinie}} / \text{AvgDiff}_{\text{Exp}}) + 1$  für unterexprimierte Gene.

Die statistische Relevanz des CHGFs wird durch die „*Change Factor Quality*“ (CFQ) bestimmt. In dieser Arbeit wird eine CFQ von  $\geq 1$  als Qualitäts-Kriterium gewählt, was bedeutet, dass die Standardabweichungen der AvgDiffs nicht überlappen.

### 2.3.8 Cluster-Analyse

Dieser Schritt der Datenanalyse dient zum Vergleich der Expressionsprofile der verwendeten Zelllinien, um Zelllinien mit ähnlichen Genexpressionsmustern und ähnlich deregulierten Genen gruppieren (engl.: *to cluster*) zu können. Mit dem Programm „Cluster“ wurde sog. hierarchisches Clustern nach Eisen (Eisen et al., 1998) durchgeführt, das auf paarweisem Vergleich aller Gene basiert. Die Beziehungen der Gene werden durch gemeinsame Zweige in einem Stammbaum repräsentiert. Jedes Gen kann als Blatt dieses Baumes interpretiert werden, und der Abstand zum Verzweigungspunkt reflektiert die Entfernung, die überbrückt werden muss, um die Gene in ein gemeinsames Cluster zu gruppieren. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm „Treeview“ (Eisen et al., 1998). Beide Programme sind frei erhältlich unter <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

## 2.4 Arbeiten mit DNA

### 2.4.1 Gelelektrophorese (Sambrock et al., 1989)

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden meistens 1 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wird 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf etwa 60 °C wird Ethidiumbromid zugesetzt. Als Laufpuffer wird ebenfalls 1x TAE-Puffer verwendet. Die DNA kann dann unter UV-Licht (UV-Transilluminator, UVP, San Gabriel, USA) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera fotografiert werden.

### 2.4.2 Restriktionsspaltung

Alle Restriktionsspaltungen werden unter den empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die gewünschten Fragmente werden nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel unter UV-Licht durch Einlagerung von Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

### 2.4.3 Gelelution

Die DNA wird in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte Bande mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Die DNA wird mit Hilfe des Qiaquick Gelextraktionskits (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

#### 2.4.4 PCR

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zur Klonierung wird die Methode der PCR in einem Volumen von 50 µl mit dem Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> PCR-System (Roche) durchgeführt. Die Primer werden in einer Konzentration von je 10 µM eingesetzt.

#### 2.4.5 Ligation

Die kovalente Verknüpfung von linearen DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe des Rapid Ligation Kits (Roche) nach Anleitung des Herstellers.

### 2.5 Arbeiten mit Proteinen

#### 2.5.1 Isolierung von Proteinlysat

Die Zellen werden bis zu einer Konfluenz von ca. 70 - 80 % in T75-Kulturflaschen inkubiert und dann nach Absaugen des Mediums einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml Accutase vom Boden abgelöst und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach Pelletierung werden die Zellen in 300 – 500 µl eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert und bei 4 °C ca. 20 min geschüttelt, bis die Zellen lysieren. Das Lysat wird in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für 15 min bei 14000 RPM zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wird abgenommen und auf Eis aufbewahrt, während die Proteinkonzentration bestimmt wird (s. Kap. II.2.5.2, unten). Anschließend wird das Proteinlysat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

#### 2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinbestimmung werden mehrere Verdünnungen der Proteinlösung angesetzt (z. B. 1:3, 1:6). Diese werden in Doppelbestimmungen neben einer Albumin-Verdünnungsreihe auf eine 96-Lochplatte aufgetragen und 200 µl BCA-Lösung dazugegeben. Nach 30 s auf dem Schüttler wird der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert und die Proteinkonzentration anschließend bei 562 nm gemessen (Referenzwellenlänge 700 nm; TECAN X-Read Plus, Tecan, Crailsheim). Die Proteinkonzentration wird anhand einer Eichkurve bestimmt, die aus Verdünnungen eines Albumin-Standards (Pierce) von 2000 µg/ml bis 25 µg/ml erstellt wird.

### 2.5.3 NuPAGE Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wird die diskontinuierliche Gelelektrophorese angewendet. Dazu werden 4-12 %ige Bis-Tris Gradientengele von NuPage (1,0 mm x 12 Taschen) verwendet. Als Laufpuffer dient der 1x NuPage MES/SDS-Puffer mit 500 µl/200 ml Antioxidans. Pro Probe werden 20 µg Gesamtprotein mit 1x NuPage LDS-Ladepuffer für 10 min bei 70 ° C denaturiert und nach kurzem Abkühlen bei RT aufgetragen. Der Lauf erfolgt bei 100 V für ca. 2 h.

### 2.5.4 Westernblot

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden die aufgetrennten Proteine zur Detektion mit Antikörpern auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße; Invitrogen) transferiert. Der Transfer erfolgt in einer Semidry-Blotting-Apparatur (LKB Bromma). Das Gel wird aus der Elektrophoresekammer gelöst und kurz in Semidry-Blottingpuffer geschwenkt. Auf die Graphitplatte der Transferkammer werden zuerst zwei in Semidry-Blottingpuffer getränkte Whatman-Papiere übereinander gelegt, darauf kommt die im gleichen Puffer getränkte Nitrozellulosemembran. Auf diese wird das Gel und abschließend wieder zwei getränkte Whatman-Papiere gelegt. Bei dem Aufbau ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten entstehen, da sonst an diesen Stellen der Transfer gestört wird. Der Transfer erfolgt bei 60 mA pro Blot für 80 min. Die Kontrolle des Transfers und eines gleichmäßigen Proteinauftrags erfolgt durch Poinceau S-Färbung.

### 2.5.5 Antikörper-Nachweis (Immundekoration)

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wird die Membran nach dem Transfer in TBS/MP unter leichtem Schütteln bei RT für mindestens 1 h blockiert. Anschließend wird der primäre Antikörper 1:500 in TBS/MP verdünnt und der Blot darin über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Am nächsten Tag wird die Membran viermal 5 min in TBST/MP gewaschen und danach mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper 1:2000 verdünnt in TBS/MP für ca. 1 ½ h bei RT geschwenkt. Dann wird die Membran viermal 5 min in TBST/MP, einmal 5 min mit TBST und einmal 1 min mit TBS gewaschen, um störendes Milchpulver und Tween zu entfernen. Danach wird die Membran mit LumiLight plus (Roche) gemäß den Herstellerangaben für 10 min inkubiert und in der Dunkelkammer ein LumiLight Film (Roche) auf der Membran belichtet und entwickelt.

### 2.5.6 Immunzytochemie

$5 \times 10^4$  Zellen werden auf ein steriles Deckglas (Assistant) aufgetropft, mit Medium überschichtet und in 6-Lochplatten über Nacht bis zu einer Konfluenz von 50–70 % kultiviert. Am nächsten Tag werden sie mit PBS gewaschen und anschließend im Fixierungspuffer fixiert. Nach zweimaligem Waschen in LS-Na-Phosphatpuffer und zweimaligem Waschen in HS-Na-Phosphatpuffer werden die Zellen für 30 min mit GSDB-Puffer inkubiert und danach mit dem primären Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in GSDB-Puffer 1-2 h bei RT inkubiert. Dann wird dreimal mit HS-Na-Phosphatpuffer und einmal mit LS-Na-Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mit dem sekundären CY3-gekoppelten Antikörper, 1:70 in GSDB-Puffer verdünnt, 1 h bei RT inkubiert. Danach wird erneut dreimal mit HS-Na-Phosphatpuffer und einmal mit LS-Na-Phosphatpuffer gewaschen. Die Kernfärbung erfolgt mit 1:1000 verdünnter DAPI-Lösung für 2-3 min. Nach dreimaligem Waschen in HS-Na-Phosphatpuffer, einmaligen Waschen in LS-Na-Phosphatpuffer und Entfernen letzter Salzurückstände mit PBS werden die Zellen in eine 10 % Glycerin/PBS-Lösung auf einem Objektträger eingebettet und mit Nagellack fixiert. Zur Analyse werden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan, Göttingen) mit Licht der Wellenlänge 546 nm bestrahlt und mit einer Digitalkamera (CCD-Kamera, Photometrics, Ottobrunn) fotografiert. Die Weiterbearbeitung erfolgt mit dem Bildverarbeitungsprogramm MetaMorph 4.5.0.0. (Universal Imaging, Downtown, PA, USA).

### 2.5.7 Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence Activated Cell Scanner*)

$1 \times 10^6$  Zellen werden pelletiert und in 100  $\mu$ l einer 1:25 Verdünnung des primären Antikörpers in Kulturmedium aufgenommen und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 3 ml Medium gewaschen und bei 1000 RPM für 10 min abzentrifugiert. Nach Inkubation mit 100  $\mu$ l einer 1:20 Verdünnung eines sekundären Phycoerythrin-gekoppelten Antikörpers bei 4 °C für 30 min wird erneut mit 3 ml Medium gewaschen und die Zellen in 400  $\mu$ l Medium aufgenommen. Die Messung der Oberflächenexpression des Proteins erfolgt mit dem FACScan Durchflusszytometer (Beckton Dickinson, Heidelberg).

## 2.6 Arbeiten mit Paraffinschnitten

### 2.6.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Gewebeproben werden im Autotechnikon in einer aufsteigenden Ethanolreihe bis zum Xylol dehydriert und anschließend in einen Paraffinblock gebettet. Das so fixierte Gewebe wird dann mit einem Mikrotom (Leica, Bensheim) in 3 µm dünne Schichten geschnitten, die auf einem SuperfrostPlus Objektträger fixiert werden.

### 2.6.2 Immunhistochemie mit Paraffinschnitten (IHC)

Die Paraffinschnitte werden zunächst in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Zur Antigen-Demaskierung werden die Schnitte 20 min im Dampfgerar (Multigourmet, Braun) in 1x Reveal-Lösung gekocht. Anschließend lässt man die Schnitte 5 min in der bei RT abkühlenden Lösung stehen und überführt die Präparate dann für weitere 5 min in warmes Wasser, das ebenfalls erhitzt wurde und bei RT langsam abkühlt. Danach werden die Schnitte kurz in Aqua dest. geschwenkt und dann in PBS bis zur Weiterbehandlung gestellt. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren werden die Gewebeschnitte für 5 min mit einer 3-%igen Hydrogen-Peroxid-Lösung inkubiert und anschließend 5 min in PBS gespült. Dann werden 30 Minuten lang mit IHC-Block unspezifische Bindungsstellen blockiert, bevor das Präparat mit dem gebrauchsfertigen primären LICAM-Antikörper UJ127 über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert wird.

Am nächsten Tag wird das Präparat 2 x 3 min mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und anschließend 30 min mit dem gebrauchsfertigen sekundären Envision-HRP-System (Dako) bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Dabei handelt es sich um ein Dextran-Polymer, das sowohl mit dem Peroxidase-Enzym als auch mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper konjugiert ist. Dann wird wieder 2 x 3 min mit PBS/0,05 % Tween gewaschen bevor die Färbung mit DAB-Substrat (Dako) für 2 – 10 min erfolgt, wobei der Färbeprozess im Mikroskop kontrolliert wird und bei gewünschter Intensität mit einer PBS-Spülung abgebrochen wird. Durch das Enzym Peroxidase wird unter Zusatz des Elektronendonors H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) zu einem braunen Farbniederschlag ausgefällt. Die Gegenfärbung erfolgt mit Hämalaun für 10 s. Der fertig gefärbte Schnitt wird dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, automatisch eingedeckt (Tissue-Tek® SCA™ Coverslipper, Niederlande) und lichtgeschützt aufbewahrt. Die mikroskopischen Aufnahmen der immunhistochemisch untersuchten Gewebeschnitte werden an einem Mikroskop (Axioscop; Zeiss, Jena) mit integrierter Kamera (opto-electronics, Gleichen) vorgenommen und unter Verwendung der Software Kappa Image-Base Control DX30 visualisiert.

### 2.6.3 Hämalaun/Eosin-Färbung ( H&E-Färbung)

Die Gewebeschnitte werden von der Färbung entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Anschließend werden die Schnitte 20 min in Hämalaun gefärbt und danach 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Schwenken in bidestilliertem Wasser werden die Schnitte in Eosin ca. 1 min gefärbt. Nach erneutem kurzem Eintauchen in bidestilliertes Wasser werden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert.

### III. Ergebnisse

#### 1. Identifizierung Ovar tumor-assoziiierter Gene

##### 1.1 Genexpressionsanalyse von Ovar tumor-Zelllinien mit der Affymetrix Genchip Technologie

Mit Hilfe der Affymetrix Genchip Technologie wurden die Genexpressionsprofile von elf Ovar tumor-Zelllinien und zwei Referenz-Zelllinien, die aus gesundem Epithelgewebe des Ovars etabliert wurden, erstellt (s. Tab. 4 und 5, S. 27). Dazu wurde der HG-U95Av2-Genechip verwendet, auf dem die Sequenzen von 12652 bekannten Genen repräsentiert sind.

Die Expression dieser Gene wird über die Fluoreszenzintensität ihrer Biotin-markierten cRNA auf dem Chip gemessen und diese wird als sog. *Average Difference* (AvgDiff) angegeben. Die cDNA der Gene sind durch 16 verschiedene Oligonukleotide auf dem Genchip vertreten, die jeweils eine Länge von 25 Nukleotiden besitzen. Eine genaue Beschreibung der Genchips findet sich in Kapitel II.2.3.4 (S. 48). Das Expressionsprofil der einzelnen Zelllinien ist die Gesamtheit der AvgDiffs aller Gene des Chips und gibt Auskunft darüber, welche dieser Gene in welcher Stärke in der jeweiligen Zelllinie exprimiert sind. Durch den Vergleich des mittleren Expressionsprofils der beiden IOSE-Referenz-Zelllinien mit dem der einzelnen Ovar tumor-Zelllinien wurden Abweichungen in der Genexpression ermittelt, welche die Tumorzellen von den Referenz-Zelllinien unterscheidet. Dieser Unterschied wird als sog. *Change Factor* (CHGF) angegeben (s. Kap. II.2.3.7, S. 49). Beträgt der CHGF beispielsweise +2, so ist das jeweilige Gen in der Tumorzelllinie dreimal so stark exprimiert verglichen mit dem Mittelwert der IOSE-Zelllinien gemäß der Formel  $CHGF = (AvgDiff_{Exp} / AvgDiff_{Basislinie}) - 1$  für überexprimierte Gene bzw.  $CHGF = -(AvgDiff_{Basislinie} / AvgDiff_{Exp}) + 1$  für unterexprimierte Gene.

Um aus der Datenmenge der 12652 erfassten Gene diejenigen herauszufiltern, die bestimmten Qualitäts- und Relevanzkriterien standhalten, wurden folgende Auswahlbedingungen festgelegt.

Es wurden nur Gene analysiert, die eine signifikante Fluoreszenzintensität auf dem Genchip zeigten. Der Schwellenwert des als AvgDiff gemessenen Wertes liegt bei 200. Die *Change Factor Quality* wurde für alle vergleichenden Analysen mit einem Wert von  $\geq 1$  festgesetzt (s. Kap. II.2.3.7, S. 49).



In dieser Arbeit sollten Gene identifiziert werden, die in den Ovar tumor-Zelllinien im Vergleich zu den Referenz-Zelllinien überexprimiert sind und für sezernierte oder transmembranlokalisierte Proteine kodieren. Um in diesen Kategorien eine Auswahl an Genen zu erhalten, deren Expression in der Mehrheit der untersuchten Tumorzelllinien signifikant von derjenigen der Referenz-Zelllinien abweicht, wurde folgende Rahmenbedingung festgesetzt: Es werden nur Gene erfasst, die in mindestens sieben der elf verwendeten Ovar tumor-Zelllinien mit einem CHGF von  $\geq 2$  bzw.  $\leq -2$  dereguliert sind.

Mit diesen Auswahlkriterien wurden 300 deregulierte Gene ermittelt; davon sind 135 Gene in mindestens sieben von elf Ovar tumor-Zelllinien im Vergleich zu den Referenz-Zelllinien überrepräsentiert (1,1 %) bzw. 165 Gene unterrepräsentiert (1,3 %).

Diese Gene wurden anhand ihrer in der Literatur beschriebenen Funktion oder Zell-Lokalisation ihrer Protein-Produkte in folgende zehn Kategorien eingeteilt: Enzyme, Transmembran-Proteine, sezernierte Proteine, intrazelluläre Signalmoleküle, Zellzyklus-Regulatoren, extrazelluläre Matrix-Proteine, Transkriptionsfaktoren, Zytoskelett-Proteine, Proteine anderer Funktion und Proteine unbekannter Funktion (Genliste s. Tab.16, Anhang ab S. 133).

Kategorien	Anzahl der deregulierten Gene	Anzahl der überexprimierten Gene (CHGF > 2)	Anzahl der unterexprimierten Gene (CHGF < -2)
Enzyme	37	21	16
Transmembran-Proteine	56	31	25
Sezernierte Proteine	47	13	34
Intrazelluläre Signalmoleküle	34	20	14
Zellzyklus-Regulatoren	10	4	6
Extrazelluläre Matrix-Proteine	14	2	12
Transkriptionsfaktoren	28	12	16
Zytoskelett-Proteine	13	7	6
Proteine anderer Funktion	40	15	25
Proteine unbekannter Funktion	21	10	11

**Tabelle 10: 300 deregulierte Gene in mindestens sieben aus elf Ovar tumor-Zelllinien im Vergleich zu IOSE-Referenz-Zelllinien aus der Affymetrix-Analyse, eingeteilt in zehn Kategorien anhand der Funktion oder Lokalisierung ihrer Protein-Produkte.** Jedes Gen ist nur einmal vertreten. Alle deregulierten Gene sind im Anhang (ab S. 133) aufgelistet.

Gemäß dem Ziel dieser Arbeit, tumorassoziierte Zielmoleküle zu identifizieren, die entweder auf der Oberfläche der Tumorzellen als Zielmoleküle exprimiert werden oder von den Tumorzellen als möglicher Marker sezerniert werden, konzentrierte sich die Suche nach Kandidatengen ausschließlich auf überexprimierte Gene aus den Kategorien „Transmembran-Proteine“ und „Sezernierte Proteine“. Diese sind in Tabelle 11 und 12 aufgelistet.

Gen-Bezeichnung	OV-MZ-2	OV-MZ-1	DW	GG	HB	HI	OC	OVMZ15	OVMZ30	OVMZ6	OVMZ9
DDR1: (CAK), Hs.423573	3	3	3	3	5	5	9	4	8	5	4
TGFB3: TGF receptor beta 3, Hs.342874	71	44	-1	1	12	9	1	51	7	19	16
FGFR2:FGF receptor 2, Hs.404081	145	74	0	6	75	79	31	0	0	0	108
FGFR3: FGF receptor 3 Hs.1420	21	25	3	0	7	57	7	1	0	4	17
ERBB3: Hs.199067 (HER3)	0	1	5	79	206	25	440	91	4	36	59
CXCR4: chemokine receptor 4, Hs.421986	1	0	6	12	6	1	0	81	5	15	28
CELSR3: Hs.55173	4	7	4	1	5	4	19	0	25	4	8
IL6R: interleukin 6 receptor Hs.193400	10	19	2	4	4	4	0	2	0	3	0
PRAME: melanoma antigen, Hs.30743	35	73	266	21	46	659	66	0	204	61	52
TJP3 tight junction protein 3 (ZO3) Hs.25527	1	7	1	9	16	17	43	9	3	7	11
CLDN3: claudin 3 Hs.25640	-5	0	18	28	162	68	66	14	0	1	20
CLDN4: claudin 4 Hs.5372	0	0	149	141	776	34	464	770	0	0	154
CLDN7: claudin 7 Hs.278562	0	0	9	58	82	80	42	68	1	3	21
TSPAN-1: tetraspan 1 Hs.38972	4	6	41	365	94	66	17	356	16	30	44
SORL1: sortilin-related receptor Hs.82845	33	14	5	3	33	13	42	19	23	6	1
UPK1B: uroplakin 1B Hs.271580	19	3	2	6	47	80	0	7	-5	11	-1
GPC4, glypican-4 Hs.58367	14	14	14	24	37	126	0	7	0	1	2
ABCA2: Hs.94806	0	4	3	-2	4	11	24	2	21	12	26
TACSTD1: (Ep-CAM) Hs.692	10	6	131	433	392	288	275	359	1	51	239
KCNK1: (TWIK-1). Hs.79351	-2	2	18	15	2	5	2	25	6	75	15
ENT2: NBMPR nucleoside transporter Hs.32951	6	8	3	9	7	6	18	3	0	3	2
SLC6A8: solute carrier family 6 Hs.187958	63	60	7	0	2	79	23	42	22	23	36
MUC1: mucin 1 Hs.89603	0	-7	-2	29	147	0	53	4	2	24	14
ITGB4: integrin, beta 4 Hs.85266	55	18	17	18	6	52	15	37	13	99	22
ITGB8: integrin, beta 8 Hs.52620	2	1	9	14	2	4	-3	14	-3	0	2
CDH1: E-cadherin Hs.194657	14	19	24	182	181	252	405	200	0	14	18
L1CAM: L1 cell adhesion molecule, Hs.445201	-1	7	27	17	10	24	1	5	-3	15	4
JAG2: jagged 2 Hs.433445	4	11	2	12	14	11	12	3	7	11	12
EFNA3 ephrin-A3 Hs.37054	2	2	1	1	4	2	6	3	3	3	4
NEO1: neogenin (chicken) homolog 1 Hs.90408	54	34	2	-2	15	17	-2	6	19	16	7
FAT2: FAT (Drosophila) homolog 2 Hs.158159	0	0	3	8	5	7	1	2	1	4	3

**Tabelle 11: Liste der in mindestens sieben aus elf Ovar tumor-Zelllinien im Vergleich zu den IOSE-Referenz-Zelllinien überexprimierten Gene (CHGF  $\geq$  2), die für Transmembran-Proteine kodieren.** Jedes Feld der Farbmatrix repräsentiert den CHGF eines Gens. Rote Felder zeigen einen positiven CHGF an, grüne Felder einen negativen CHGF und weiße Felder signalisieren einen CHGF von 0. Die Farbsättigung spiegelt die Höhe des CHGF wider. Die Gene sind nach der UniGene-Datenbank annotiert.

Gen-Bezeichnung	OV-MZ-2	OV-MZ-1	DW	GG	HB	HI	OC	OV-MZ-15	OV-MZ-30	OV-MZ-6	OV-MZ-9
NMU, neuromedin U Hs.2841	1	10	17	79	25	47	20	22	0	3	13
IGFBP2, Hs.433326	24	23	18	28	76	64	11	34	-13	-1	1
WFDC2,(HE4) Hs.2719	0	0	138	40	645	292	3	279	0	69	0
SERPINI1 (neuroserpin) Hs.78589	0	12	7	11	0	31	35	6	26	1	13
SERPINB1 (ovalbumin) Hs.183583	14	0	91	216	34	190	8	149	73	352	64
SLPI, Hs.169793	270	405	409	980	765	862	43	138	14	76	15
CTSL2, cathepsin L2 Hs.87417	67	32	3	4	3	52	5	2	-4	5	11
CTSH, cathepsin H Hs.288181	18	15	1	2	2	5	3	1	0	2	3
HPB17, Hs.1690	1	-1	89	57	1	26	9	445	3	230	114
MDK, midkine (NEGF2) Hs.82045	10	14	4	-46	3	10	-3	2	-46	-1	9
TGFA, Hs.170009	1	1	12	24	1	4	4	12	6	11	-1
FGF18, fibroblast growth factor 18, Hs.49585	14	13	121	100	0	258	0	27	0	0	11
APOE, apolipoprotein E Hs.169401	378	753	0	46	76	681	333	0	0	0	9

**Tabelle 12:** Liste der in mindestens sieben aus elf Ovar tumor-Zelllinien im Vergleich zu den IOSE-Referenz-Zelllinien überexprimierten Gene (CHGF  $\geq 2$ ), die für sezernierte Proteine kodieren. Jedes Feld der Farbmatrix repräsentiert den CHGF eines Gens. Rote Felder zeigen einen positiven CHGF an, grüne Felder einen negativen CHGF und weiße Felder signalisieren einen CHGF von 0. Die Farbsättigung spiegelt die Höhe des CHGFs wider. Die Gene sind nach der UniGene-Datenbank annotiert.

In diesen beiden Genlisten sind auch Gene zu finden, die bereits im Zusammenhang mit Karzinomen des Ovars zum Zeitpunkt der experimentellen Evaluierung beschrieben waren. Diese sind als Kandidatengene für weitere Untersuchungen aus, bestätigen aber die Verwendung dieses Zelllinien-System und die gewählten Parameter zu Identifizierung neuer Antigene gemäß der Aufgabenstellung.

Von 31 überexprimierten Genen wurde für folgende zehn Gene bereits eine Rolle in Karzinomen des Ovars beschrieben: Claudin-3 und -4, CXCR4, DDR1, E-CAD, ErbB3, Ep-CAM, FRFG2, MUC1 und TGFBR3 (s. Kap. IV.2.2, S. 93). Aus den verbleibenden 21 Genen wurden drei Gene für weitere Untersuchungen ausgewählt. Besonderer Fokus wurde auf Gene gelegt, deren Proteinprodukte zur Malignität der Tumorzellen beitragen könnten. Nach einer Literaturrecherche wurden JAG2, L1CAM und TSPAN-1 ausgewählt (s. Kap. IV.2.3, S. 95). Für diese Gene war zum Zeitpunkt ihrer Selektion keine Assoziation mit Ovarkarzinomen bekannt. TSPAN-1 wurde allerdings zurückgestellt, da zu diesem Zeitpunkt keine Antikörper für den Nachweis des Proteinprodukts erhältlich waren.

In der Kategorie der sezernierten Proteine wurden sechs Gene bereits im Kontext mit Karzinomen des Eierstocks beschrieben (s. Kap. IV.2.1, S. 92). Die sieben Gene, deren Überexpression in Ovar tumor-Zelllinien zum ersten Mal in dieser Arbeit ermittelt wurde, sind SerpinI1, SerpinB1, Cathepsin L2 und H, HPB17, FGF18 und NMU. Von diesen Genen wurde nur dem Neuropeptid

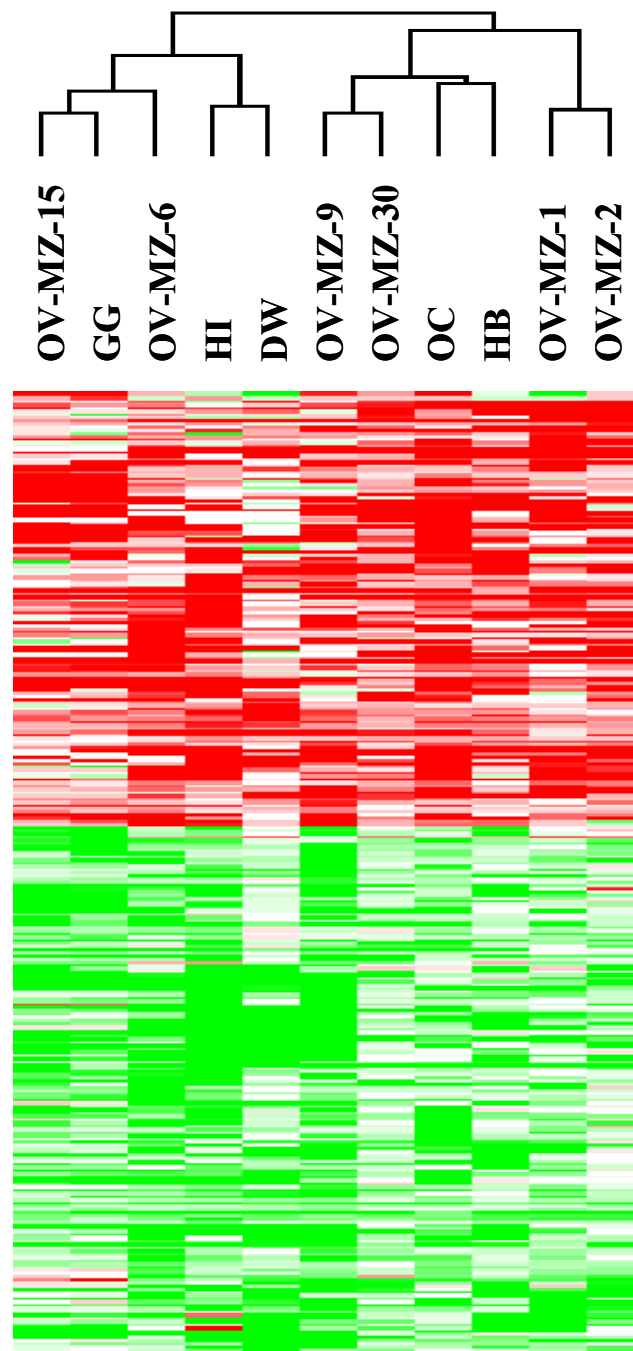
NMU noch keine Rolle in Tumorzellen anderer Krebsarten zugesprochen. Mitglieder der Neuropeptid-Familie sind als Wachstumsfaktoren in die Tumorgenese involviert (Heasley et al., 2001). Aus diesen Gründen wurde dieses Gen, das eine deutliche Hochregulierung in einem Großteil der Ovartumorzelllinien aufweist, als dritter Kandidat für weitere Analysen ausgewählt (s. Kap. IV.2.3, S. 95).

## 1.2 Cluster-Analyse

Mit Hilfe einer sogenannten Cluster-Analyse können Gene und Zelllinien in Gruppen mit ähnlichem Expressionsmuster eingeteilt werden. Mit dem Verfahren des hierarchischen Clusters (Eisen et al., 1998) entstehen einerseits Cluster von Genen, die ähnlich in verschiedenen Zelllinien exprimiert werden, und andererseits erfolgt eine Gruppierung der Zelllinien anhand der Ähnlichkeit ihres Genexpressionsprofils.

Da die verwendeten Zelllinien von Ovartumoren verschiedener Patientinnen abstammen, sollte durch die Cluster-Analyse ermittelt werden, in wie weit die Abweichungen in der Genexpression (CHGFs) der untersuchten Ovartumor-Zelllinien zu den Referenz-Zelllinien auf die bekannten Merkmale der Zelllinien zurückzuführen sind. Diese Ähnlichkeiten können in dem sogenannten Dendrogramm abgelesen werden, das sich über den Bezeichnungen der Zelllinien befindet (s. Abb. 4, S. 61). Gen-Cluster, die Aufschluss über gemeinsam regulierte Gene geben können, sind nicht eingezeichnet, da nur Gene aus bestimmten Kategorien für diese Arbeit im Vordergrund standen.

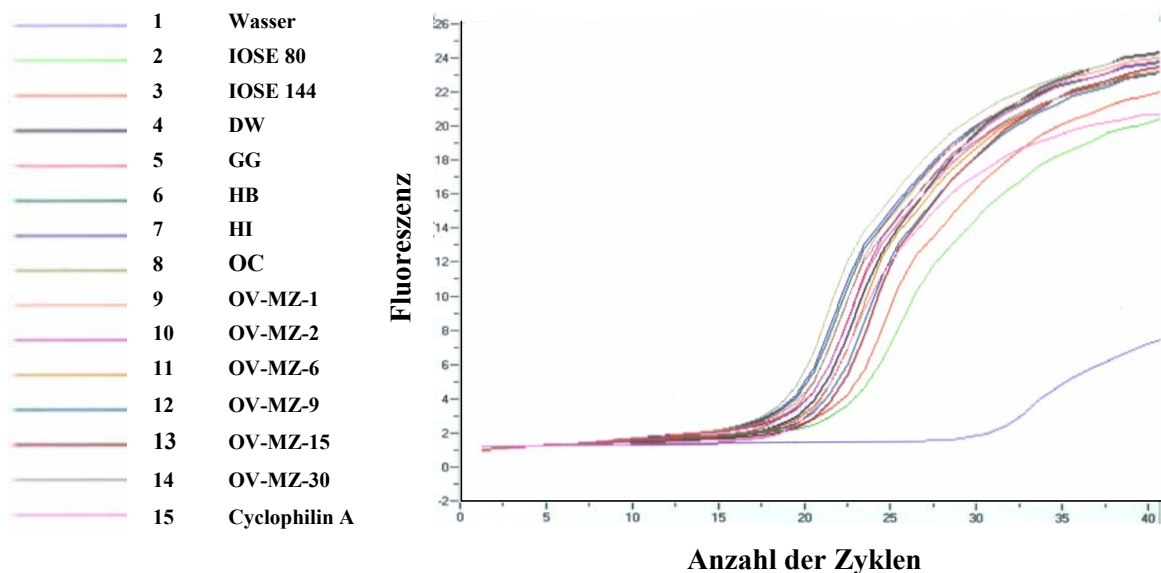
Das Dendrogramm ordnet die Zelllinien in zwei Hauptgruppen, die wiederum in zwei Untergruppen untergeteilt sind. OV-MZ-9 und OV-MZ-30 zeigen große Ähnlichkeit im Genexpressionsprofil und wurden beide aus Tumorzellen der Pleura-Flüssigkeit etabliert. Ebenso bilden GG und OV-MZ-15 eine gemeinsame Untergruppe. Beide wurden aus Tumorzellen solider Tumoren isoliert, wobei die Zelllinie OV-MZ-15 aus einem Ovarkarzinom, die Zelllinie GG dagegen aus einer Netzmetastase etabliert wurde. Die anderen Zelllinien stammen von Tumorzellen ab, die aus Aszitesflüssigkeit gewonnen wurden. Diese weisen keine auffallenden Unterschiede im Genexpressionsprofil zu den Zelllinien auf, die aus Pleuralflüssigkeit oder soliden Tumoren gewonnen wurden. Die histologische Klassifizierung der Ursprungstumoren, von denen die Zelllinien abstammen, sowie deren Stadium und Differenzierungsgrad (s. Tab. 4, S. 27) spiegelt sich nicht in der Gruppierung der Zelllinien wider. Gene, die aus dieser Analyse hervorgehen, kennzeichnen also nicht nur einen bestimmten Subtyp bzw. Stadium. Weitere Informationen zu den Zelllinien, die näheren Aufschluss z. B. über die Bildung der beiden Hauptgruppen geben könnten, standen nicht zur Verfügung.



**Abbildung 4: Auswertung von Expressionsprofilen mittels hierarchischer Cluster-Analyse nach Eisen et al (1998).** hierbei werden die untersuchten Zelllinien (horizontal) und die 300 deregulierten Gene (vertikal) nach Ähnlichkeiten im Expressionsmuster sortiert. Jedes Feld der Farbmatrix repräsentiert den CHGF eines Gens. Rote Felder zeigen einen positiven CHGF an, grüne Felder einen negativen CHGF und weiße Felder signalisieren einen CHGF von 0. Die Farbsättigung spiegelt die Höhe des CHGFs wider. Das Dendrogramm zeigt die Ähnlichkeiten zwischen den Ovarietumorzelllinien an.

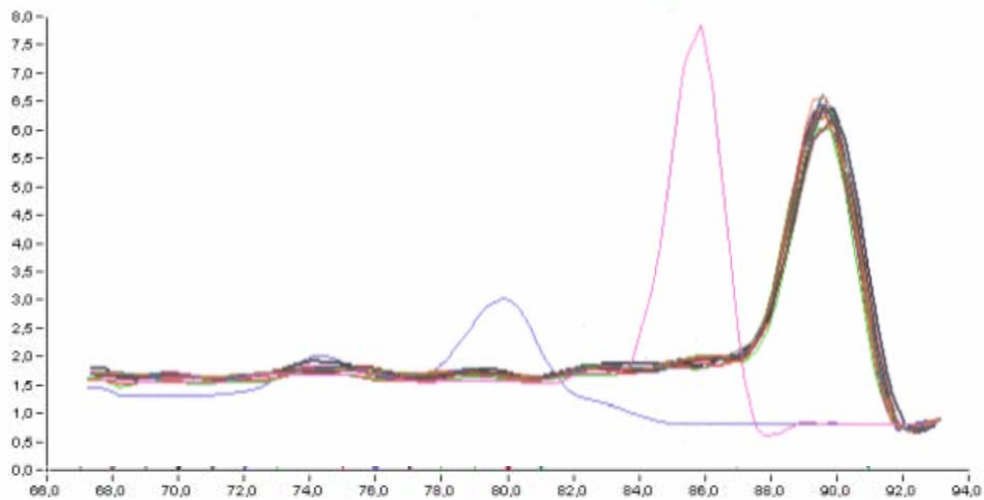
### 1.3 Bestätigung der Affymetrix-Ergebnisse durch semiquantitative RT-PCR

Um die Ergebnisse der Affymetrix-Experimente mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden insgesamt sieben ausgewählte Gene, darunter drei Kandidatengene (s. Kap III.1.1, S. 56) mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR im LightCycler Gerät hinsichtlich der Expression ihrer mRNA untersucht (s. Kap. II.2.2.6, S. 44). Diese Technologie bietet ein hochoempfindliches Verfahren zur RNA-Quantifizierung und kann im Vergleich zur Northern-Analyse mit relativ wenig RNA durchgeführt werden. Letzteres war in diesem Fall entscheidend, da von vier der verwendeten 13 Zelllinien die verfügbare Menge an Gesamt-RNA sehr begrenzt war. Pro Ansatz wurde 1 µg Gesamt-RNA mittels Zufalls-p(dN)<sub>6</sub>-Primern revers transkribiert und ein Zehntel davon im zweiten Schritt mit Gen-spezifischen Primern im LightCycler Gerät amplifiziert. Die Werte wurden auf die als Standard definierte Expression des Haushaltgens Cyclophilin A aus einer 1:10-Verdünnung der cDNA der Zelllinie OV-MZ-1 bezogen, die bei jedem Lauf mitamplifiziert wurde. Da die meisten Zielgene schwächer exprimiert waren als Cyclophilin A, wurden die Werte der Zielgene mit 1000 multipliziert, um positive Werte zu erhalten. Wurde also bei einem Zielgen der gleiche Kreuzungspunkt ermittelt wie bei der 1:10-Verdünnung von Cyclophilin A, so beträgt sein Wert 100 (s. Kap. II.2.2.6.2, S. 44). Diese Relation wurde gewählt, um alle getesteten mRNA auf einen gleichen Wert zu beziehen. Zur Abgleichung der Werte (Normalisierung) wurde die 18S ribosomale RNA verwendet, da sich diese als konstanter Bezugspunkt zur Bestimmung gleicher Mengen und gleich effizient verlaufender cDNA-Synthese herausstellte (s. Kap. II.2.2.6.3, S. 45).



**Abbildung 5: Exemplarische Darstellung des Verlaufs einer PCR mit dem LightCycler Gerät (DDR1).** 1 µg Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und ein Zehntel davon mit Gen-spezifischen Primern im LightCycler Gerät amplifiziert. Die Fluoreszenz der einzelnen Proben ist halblogarithmisch in Abhängigkeit der Zyklenzahl dargestellt. Je höher die Anzahl an Transkripten in einer Zelllinie ist, desto früher erreicht die Fluoreszenz der Amplifikate die log-lineare Region. Die Wasserkontrolle ist in blau, die Cyclophilin A-Kurve als relativer Bezugspunkt ist in pink dargestellt. Die anders-farbigen Kurven zeigen die Expression von DDR1 in den jeweiligen Zelllinien an (siehe Legende in Abbildung).

Mittels Schmelzkurvenanalyse wurden die amplifizierten Produkte hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht und die Primer dementsprechend optimiert.

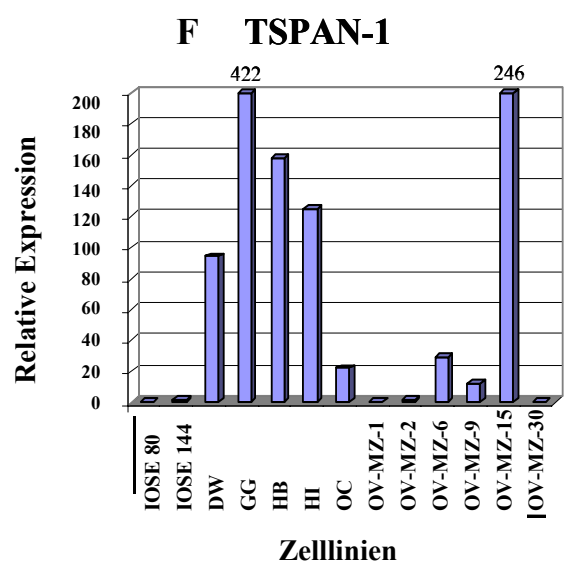
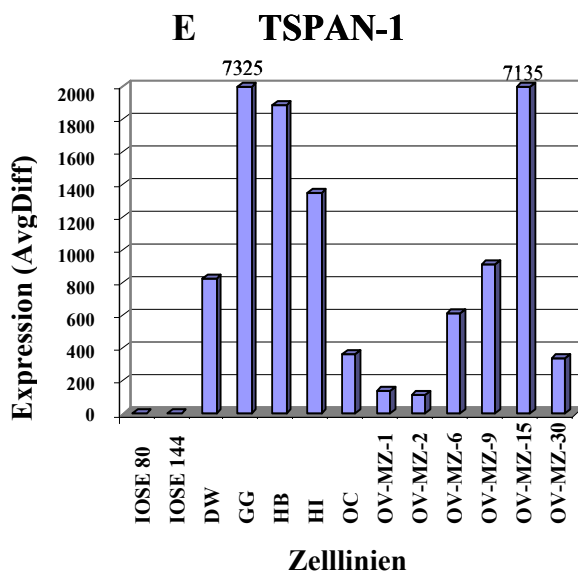
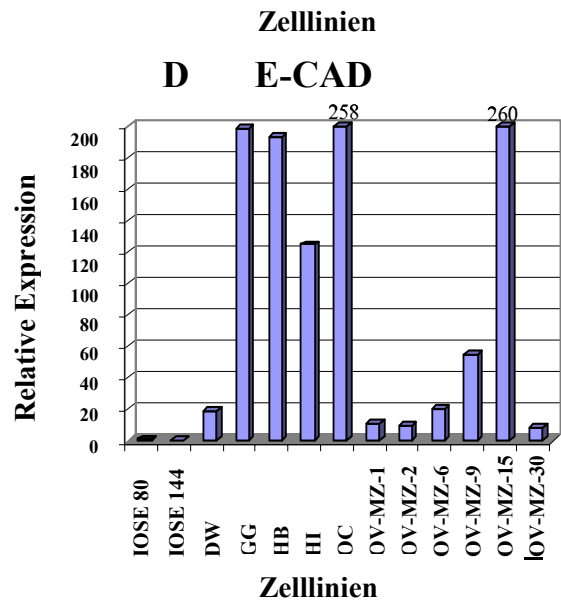
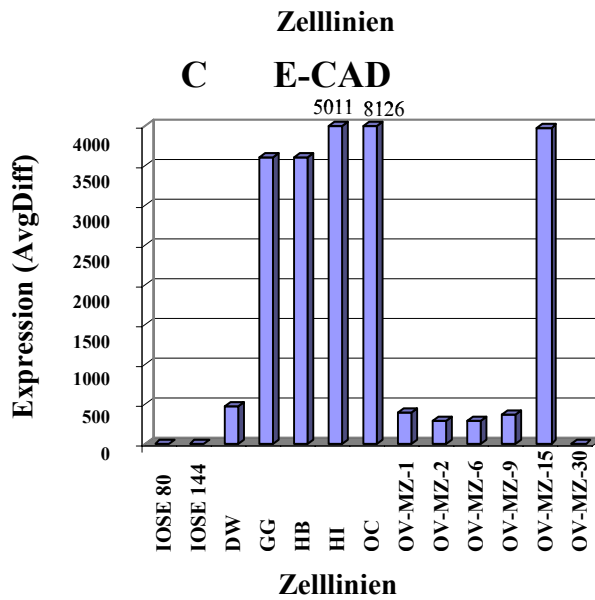
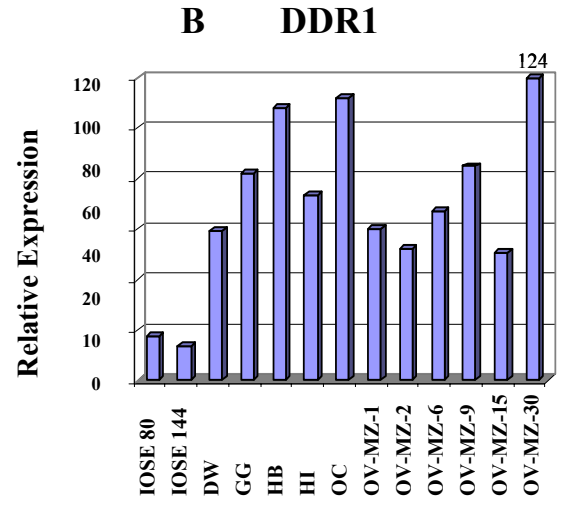
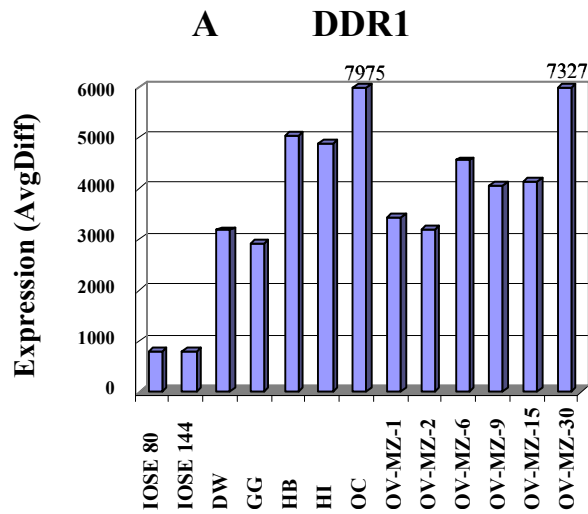


**Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurve (DDR1).** Schmelzkurve zum Nachweis der spezifischen Amplifizierung eines PCR-Produktes. Die blaue Kurve zeigt den Schmelzpunkt von Primer-Dimeren an, die sich in der Wasserkontrolle ohne cDNA-Matritze bilden. Die pinkfarbene Kurve gibt den Schmelzpunkt des Cyclophilin A PCR-Produktes an. Die anders-farbigen Kurven zeigen den Schmelzpunkt des DDR1 PCR-Produktes.

Durch die als Standard definierte Bezugsgröße der Cyclophilin A-Verdünnung wurden die Kreuzungspunkte in relative Werte umgerechnet, die sich in Diagrammen darstellen lassen. Zum direkten Vergleich sind in Abbildung 7 (s. S. 64 - 66) die Genexpressionsdaten (AvgDiff) der Affymetrix-Analyse dargestellt.

**Affymetrix-Analyse**

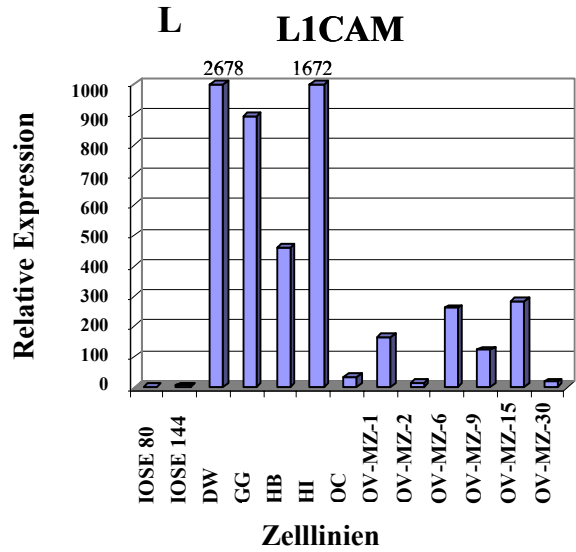
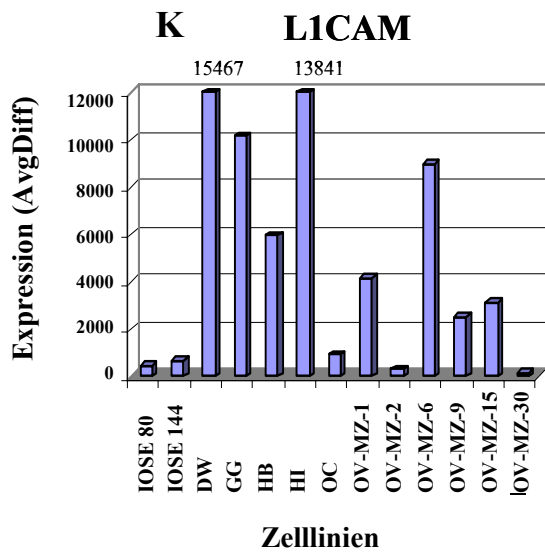
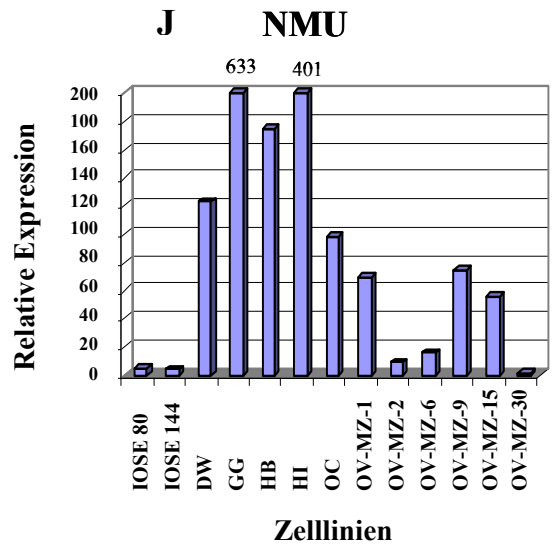
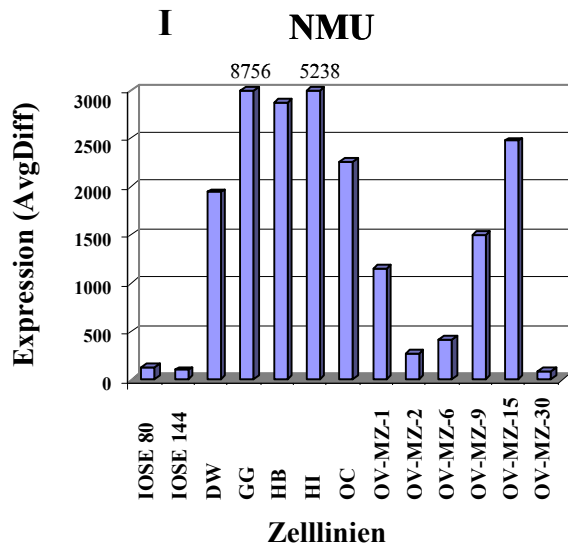
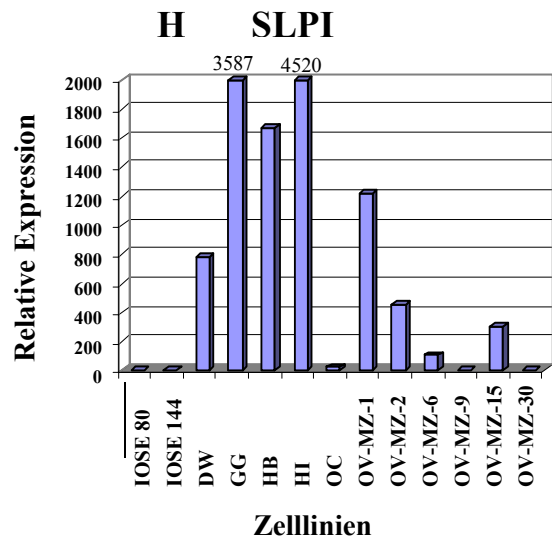
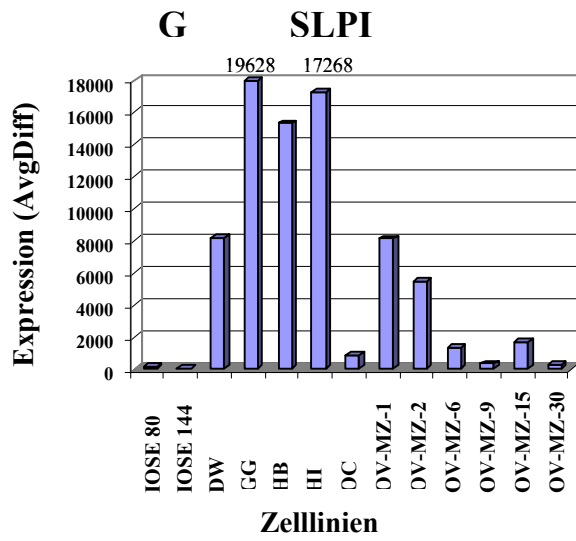
**RT-PCR-Analyse**

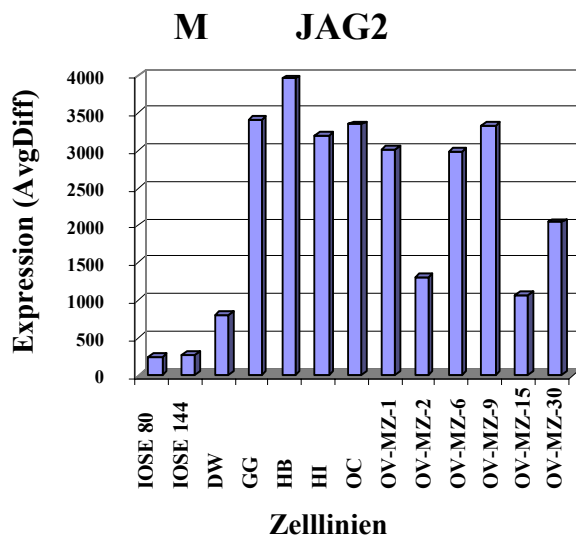
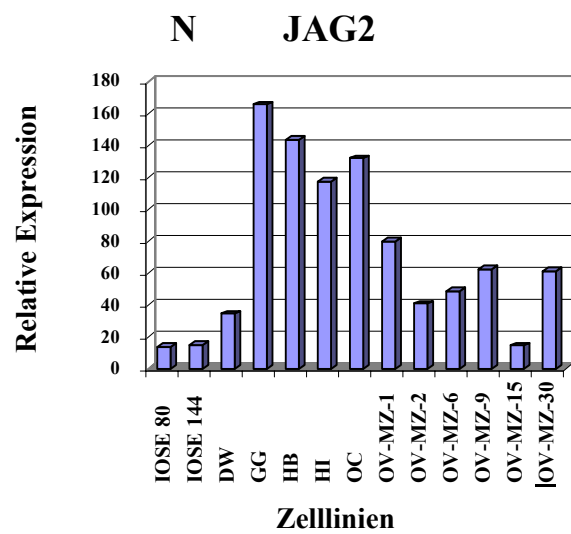




### Affymetrix-Analyse

### RT-PCR-Analyse



**Affymetrix-Analyse****RT-PCR-Analyse**

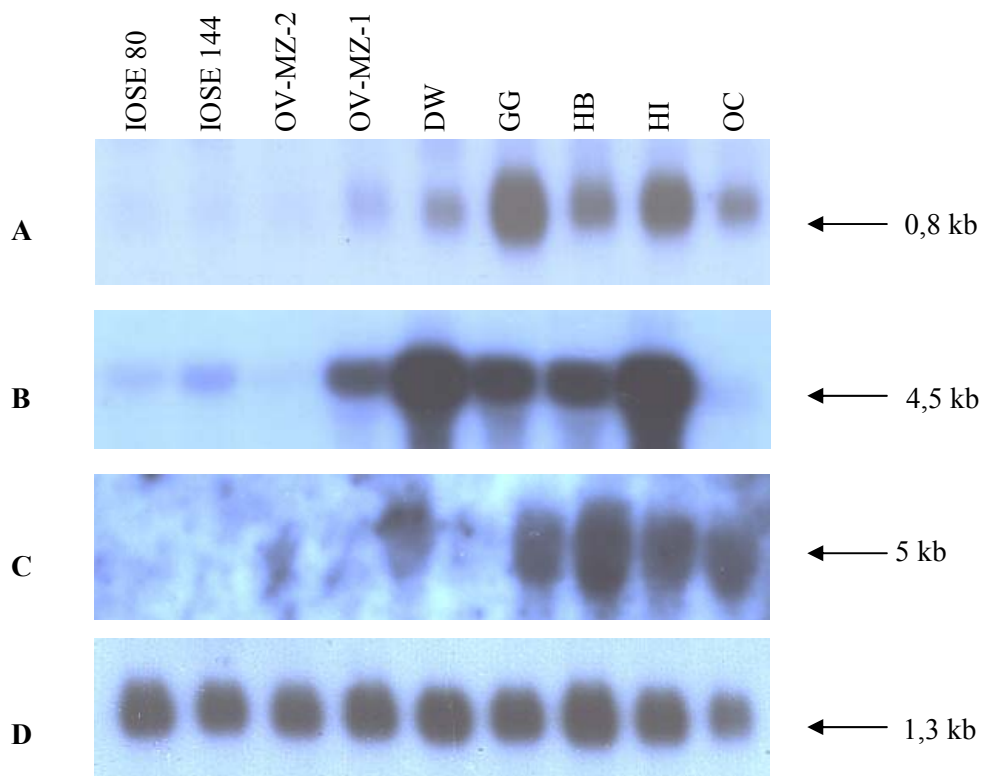
**Abbildung 7: Bestätigung der Affymetrix-Daten mit semiquantitativer RT-PCR basierend auf dem LightCycler System.** 2 µl cDNA wurden mit Gen-spezifischen Primern amplifiziert. Die Expression der Gene ist relativ zu Cyclophilin A dargestellt. Auf der linken Seite sind zum Vergleich die Expressionswerte aus der Affymetrix-Analyse (AvgDiff) dargestellt. Affymetrix-Analyse: A,C;E;G;I;K;M; RT-PCR-Analyse: B;D;F;H;J;L;N; A,B: DDR1; C,D: E-CAD; E,F: TSPAN-1; G,H: SLPI; I,J: NMU; K,L: L1CAM; M,N: JAG2. Normalisierung erfolgte auf die Expression der 18S rRNA.

Die differentielle Expression der getesteten Gene in den Ovar tumor-Zelllinien im Vergleich zu den IOSE-Referenz-Zelllinien konnte in allen Fällen bestätigt werden. In einigen Fällen sind Schwankungen in der Genexpression im Vergleich der beiden Methoden zu sehen. Diese können zum einen aus der unterschiedlichen reversen Transkription entstehen, da im Genchip-Experiment poly-T-Primer und in der RT-PCR Zufallshexamer-Primer eingesetzt wurden, um die 18S rRNA als Kontrolle verwenden zu können. Zum anderen wurden die Gen-spezifischen Primer für die RT-PCR im offenen Leserahmen der jeweiligen mRNA gewählt, während die Oligonukleotide, die auf den Genchips verwendet werden, bevorzugt aus dem 3'-untranslatierten Bereich stammen.

Die Unterschiede in der Genexpression zeigen, dass eine Bestätigung der Affymetrix-Daten unerlässlich ist. Gleichzeitig kann man aber erkennen, dass die Auswahlkriterien der Affymetrix-Analyse für Kandidatengene, die in den Ovar tumor-Zelllinien im Vergleich zu den IOSE-Referenz-Zelllinien überexprimiert sind, hoch genug angesetzt sind, um einer Bestätigung der differentiellen Expression mit einer unabhängigen Methode standzuhalten.

### 1.3 Bestätigung der deregulierten Kandidatengene mittels Northernanalyse

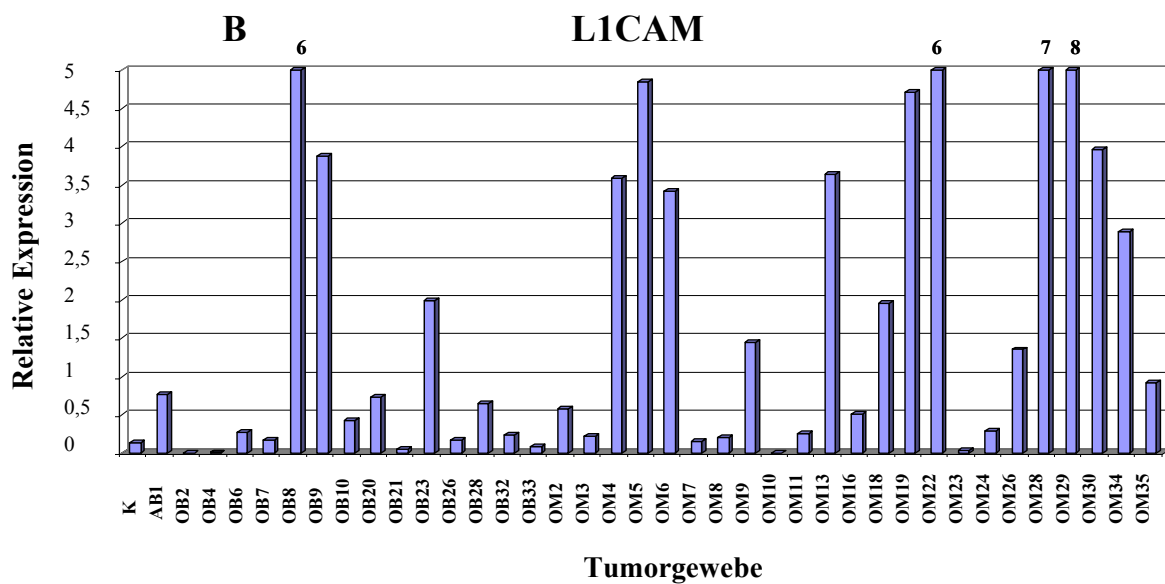
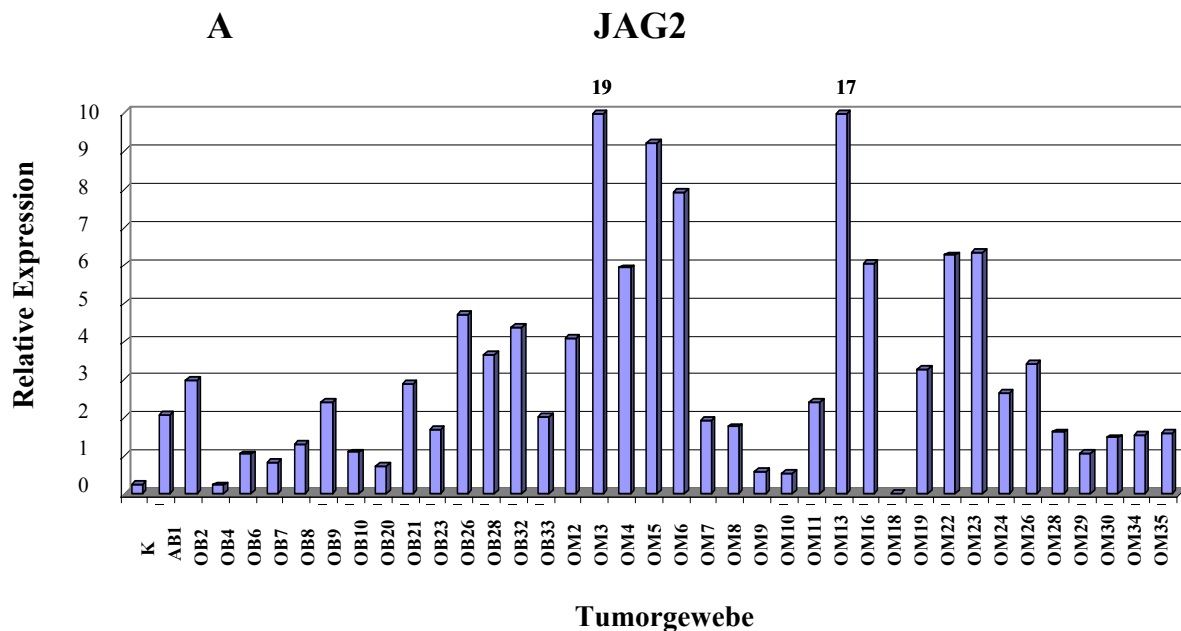
Die Bestätigung der Affymetrix-Ergebnisse wurde mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt, da sich diese Methode sehr gut zum Quantifizieren von Transkripten eignet und da die RNA von vier der 13 verwendeten Zelllinien nur in sehr begrenzten Mengen zur Verfügung stand. Um aber die Affymetrix- und RT-PCR-Daten mit einer gängigen Methode zum direkten Nachweis der RNA vergleichen zu können und um die Transkriptgrößen sichtbar zu machen, wurden die Transkripte der Kandidatengene NMU, L1CAM und JAG2 mittels Northernanalyse in neun der verwendeten elf Zelllinien untersucht (s. Kap. II.2.2.3, S. 42). Die erwartete Länge der mRNA beträgt für NMU 818 Nt. Für L1CAM und JAG2 sind zwei Isoformen bekannt. Die erwarteten Längen für die Isoformen von L1CAM sind 4525 Nt bzw. 4513 Nt und für JAG2 5077 Nt bzw. 4963 Nt (s. UniGene-Datenbank). Die Unterschiede in der Länge der Transkripte sind aber in beiden Fällen zu gering, um als Einzelbanden sichtbar gemacht zu werden. Die Deregulierung der Gene konnte bestätigt werden.

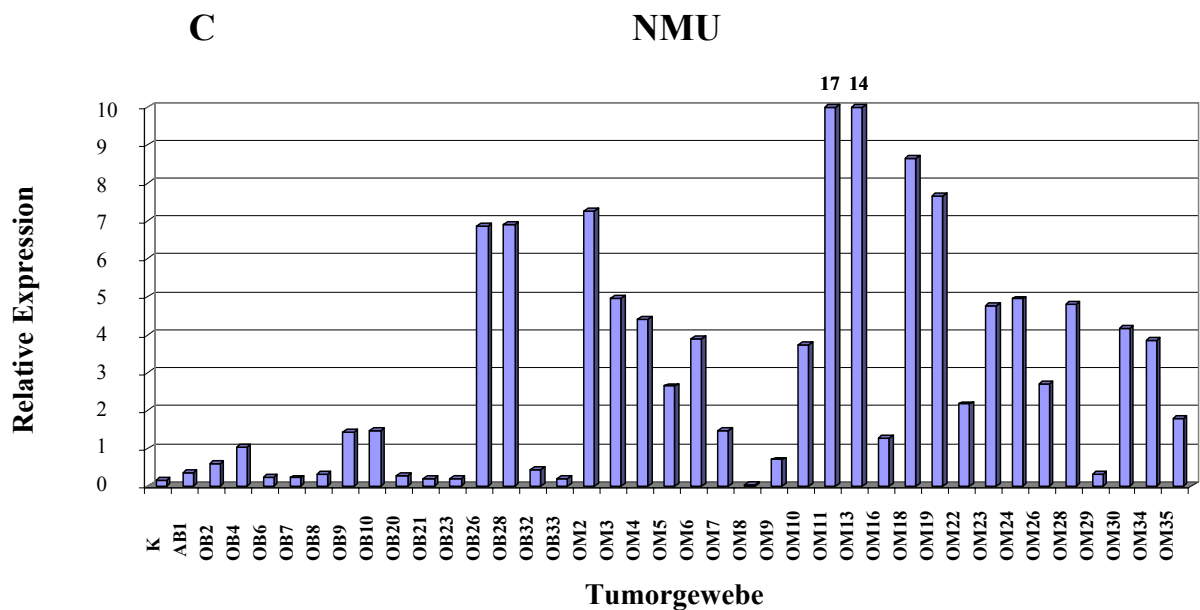


**Abbildung 8:** Northernanalyse der drei Kandidatengene in zwei IOSE-Referenz-Zelllinien und sieben Ovarialtumorzelllinien. 8 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit radioaktiv markierten, Gen-spezifischen Sonden im Bereich des ORF. A: NMU; B: L1CAM; C: JAG2; D: GAPDH-Kontrolle.

### 1.4 Expressionsanalyse der Kandidatengene in Ovariumtumorgewebe

Da Zelllinien in Kultur aufgrund ihrer veränderten Umgebung nicht exakt das gleiche Genexpressionsmuster zeigen wie Tumorzellen *in vivo*, wurde die Expression der Kandidatengene in Tumorgewebeproben des Eierstocks untersucht. Verwendet wurden ausschließlich Gewebeproben aus schlecht differenzierten humanen Ovarialkarzinomen (G3). Dazu wurde pro Ansatz 1 µg Gesamt-RNA aus 38 verschiedenen Ovarialtumormustern und einem Normalgewebe des Ovars mittels Zufalls-p(dN)<sub>6</sub>-Primern revers transkribiert. Ein Zehntel der entstandenen cDNA wurde mit Gen-spezifischen Primern im LightCycler Gerät amplifiziert. Die Werte wurden auf die als Standard definierte Expression des Haushaltgens Cyclophilin A aus einer 1:10-Verdünnung der cDNA der Zelllinie OV-MZ-1 bezogen (s. Kap. II.2.2.6.2, S. 44).





**Abbildung 9: Relative Expression der mRNA von drei Kandidatengenen in 38 Ovartumorgewebeproben im Vergleich zu normalem Ovargewebe (K) mit semiquantitativer RT-PCR basierend auf dem LightCycler System.** 2 µl cDNA wurden mit Gen-spezifischen Primern amplifiziert. Die Expression der Gene ist relativ zu Cyclophilin A dargestellt. Als Kontrolle (K) wurde RNA isoliert aus normalem Ovargewebe verwendet. Normalisierung erfolgte auf die Expression der 18S rRNA. A: JAG2; B: L1CAM; C: NMU.

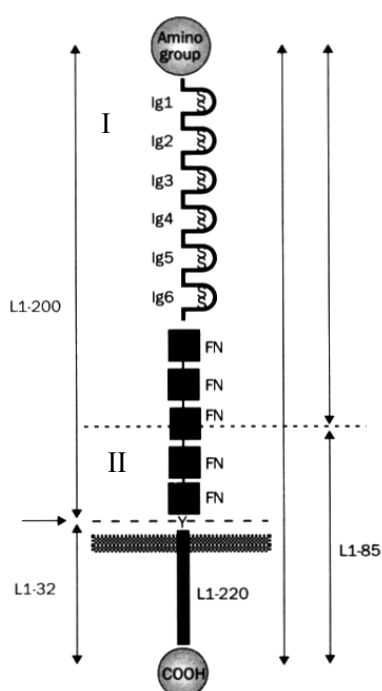
Eine deutliche Überexpression im Vergleich zur Kontrolle aus normalem Ovargewebe (mind. fünffach) war bei NMU in 24 (53 %), bei JAG2 in 25 (66 %) und bei L1CAM in 16 der 38 Ovartumor-Gewebeproben (42 %) zu sehen. Ein Vergleich mit der Genexpression der IOSE-Referenz-Zelllinien war nicht möglich, da die Werte auf die Expression der 18S rRNA normalisiert wurden, welche in ihrer Expressionshöhe nicht mit derjenigen in den Gewebeproben vergleichbar ist.

## 1.5 Expressionsstudien auf Proteinebene

Nachdem die Affymetrix-Daten auf RNA-Ebene bestätigt werden konnten, wurde die Expressionsanalyse der Kandidaten auf Proteinebene ausgeweitet. Mittels Immunhistochemie von Paraffinschnitten humaner Ovarien sollten die Proteine der Kandidatengene und ihre Lokalisierung in den Zelltypen der Gewebeproben nachgewiesen werden. Um die Spezifität der jeweiligen Antikörper zu untersuchen, wurden diese zunächst mittels Westernblot-Analyse im Lysat bzw. Überstand einer Ovarien-Zelllinie getestet. Die Proteine NMU und JAG2 konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da die getesteten Antikörper starke Kreuzreaktionen zeigten. Aus diesem Grund wurden weitere Analysen auf L1CAM beschränkt.

### 1.5.1 Spezifischer Nachweis des L1CAM-Proteins

Um die Spezifität des monoklonalen L1CAM-Antikörpers UJ127 (s. Tab. 7, S. 30) zu testen, wurden 10 µg des Gesamtproteins aus dem Zelllysate der Ovarien-Zelllinie GG, die eine deutliche Expression der L1CAM-mRNA zeigte, elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran immunologisch nachgewiesen (s. Kap. II.2.5.1-5, S. 51-52). Die verwendeten Zellen wachsen adhären und wurden schonend mit Akkutase vom Boden der Kulturflasche abgelöst, um membranständige Proteine nicht zu degradieren. L1CAM ist Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und besteht aus 1257 Aminosäuren und 22 möglichen N-Glykosylierungsstellen. Das Molekül ist aus vier Strukturelementen aufgebaut. Die extrazelluläre Region ist aus sechs Immunglobulin(Ig)-ähnlichen Domänen und fünf Fibronectin TypIII(FNIII)-ähnlichen Domänen zusammengesetzt (Nayem et al., 1999). Nach einer kurzen Transmembran-Domäne folgt ein kürzerer zytoplasmatischer Teil.

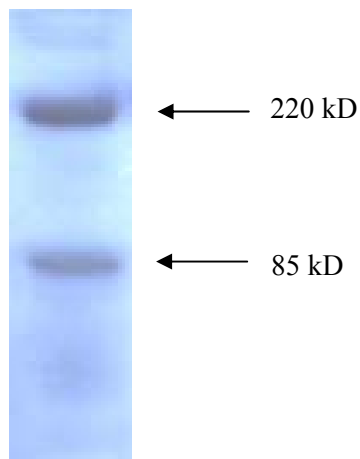


**Abbildung 10: Schema des L1CAM-Proteins nach Fogel et al. (2003).**

Zu sehen ist eine schematische Darstellung des L1CAM-Moleküls und zwei proteolytische Spaltstellen. Die extrazelluläre Domäne besteht aus sechs Ig-Domänen gefolgt von fünf Fibronectin TypIII(FNIII)-ähnlichen Domänen. Die Spaltstelle für Plasmin befindet sich in der dritten FNIII-ähnlichen Domäne (gepunktete Linie) und erzeugt ein membranständiges 85 kD und ein lösliches 140 kD Fragment. Die Spaltstelle für ADAM10 befindet sich zwischen der fünften FNIII-ähnlichen Domäne und der Transmembran-Domäne (gestrichelte Linie) und erzeugt ein lösliches 200 kD und ein membranständiges 32 kD Fragment. Die Bindestellen der verwendeten Antikörper sind eingezeichnet (nach Mechttersheimer et al., 2001): (I) mAb 5G3 (nur für FACS-Analyse, s. Kap. III.2.1.3, S. 82); (II) mAb UJ127.

Das Molekulargewicht von L1CAM beträgt 200 - 220 kD, je nach Glykosilierungszustand (Nayeem et al., 1999). Das Protein besitzt zwei bekannte Spaltstellen für posttranslationale Spaltungen *in vivo*. Die Serin-Protease Plasmin spaltet L1CAM in der dritten FNIII-ähnlichen Domäne. Die Spaltung an dieser Stelle resultiert in einem löslichen Amino-terminalen Fragment von ca. 140 kD und einem membranständigen Fragment von ca. 85 kD (Nayeem et al., 1999).

Außer Plasmin ist die Metalloprotease ADAM10 in der Lage, L1CAM zu spalten. Die Spaltung erfolgt extrazellulär zwischen der fünften FNIII-ähnlichen Domäne und der Transmembran-Domäne und resultiert in einem löslichen 200 kD Fragment und einem membranständigen 32 kD großen Fragment (Mechtersheimer et al., 2001).

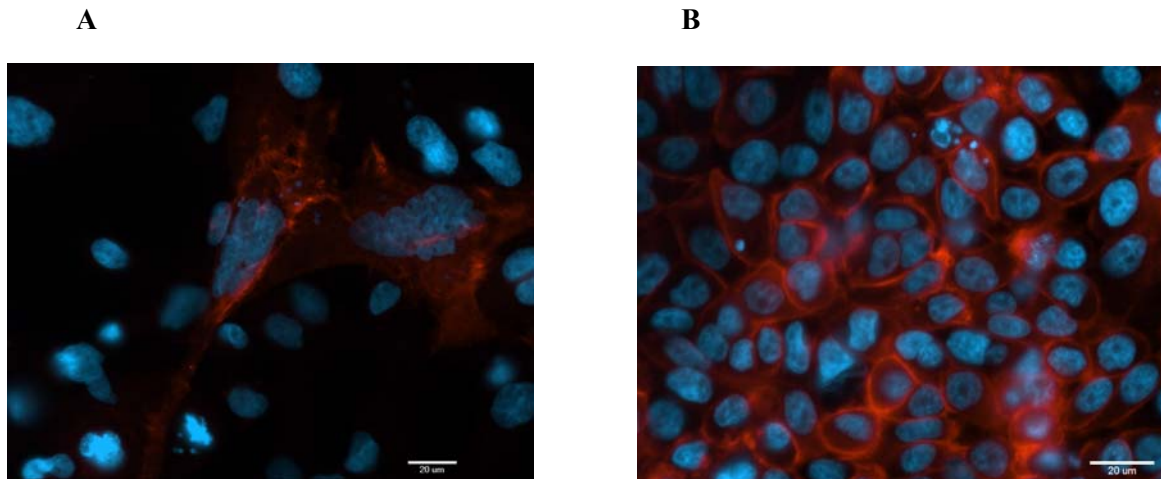


**Abbildung 11: Westernblot-Analyse von L1CAM.** Zum Nachweis des L1CAM Proteins wurde der mAb UJ127 verwendet 10 µg Gesamtprotein aus dem Lysat der Ovar tumor-Zelllinie GG wurden elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zu sehen sind zwei Banden bei 220 und bei 85 kD.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, zeigt der mAb UJ127 spezifische Bindung sowohl an die 220 kD als auch an die 85 kD großen membranständigen Formen von L1CAM. Das Molekül wird anscheinend zu einem gewissen Anteil von Plasmin gespalten. Spaltung durch ADAM10 kann mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden, da der Antikörper nicht mehr an das prozessierte membranständige 32 kD-Fragment binden kann (s. Abb. 10, S. 70).

### 1.5.2 Nachweis von L1CAM durch Immunzytochemie

Nachdem die Expressionsunterschiede der Kandidatengene auf RNA-Ebene bestätigt werden konnten, wurde untersucht, ob die jeweiligen Proteine ebenfalls differentiell exprimiert werden und ob die Lokalisierung in der Zelle korrekt ist. Dazu wurden die Referenz-Zelllinie IOSE 144 und die Ovar tumor-Zelllinie GG verwendet, um die L1CAM-Expression der Zelllinie aus gesundem Ovar epithel mit derjenigen der Ovar tumor-Zelllinie vergleichen zu können. Eine definierte Zellzahl wurde über Nacht auf einem Deckglas kultiviert und am nächsten Tag fixiert. Die Färbung erfolgte mit dem primären L1CAM mAb UJ127 und einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper und zeigt im Bild rote Fluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI-Blau gefärbt (s. Kap. II.2.5.6, S. 53). Die beiden Einzelbilder der Cy3- und der DAPI-Färbung wurden übereinander gelegt.



**Abbildung 12: Immunzytochemie der L1CAM Proteinexpression in der SV-40 large T immortalisierten Ovar epithel-Zelllinie IOSE 144 und der Ovar tumor-Zelllinie GG.** A: IOSE 144; B: GG; Die Zellen wurden auf Deckgläser fixiert und permeabilisiert. Die Proteinexpression wurde mit dem primären L1CAM mAb UJ127 und einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper nachgewiesen und ist an der Rot-Färbung zu erkennen. Die Zellkerne wurden mit DAPI-Blau gefärbt. Die Einzelbilder wurden übereinandergelegt. Vergrößerung: GG: 0,1675 nm/pixel; IOSE 144: 0,22333 nm/pixel.

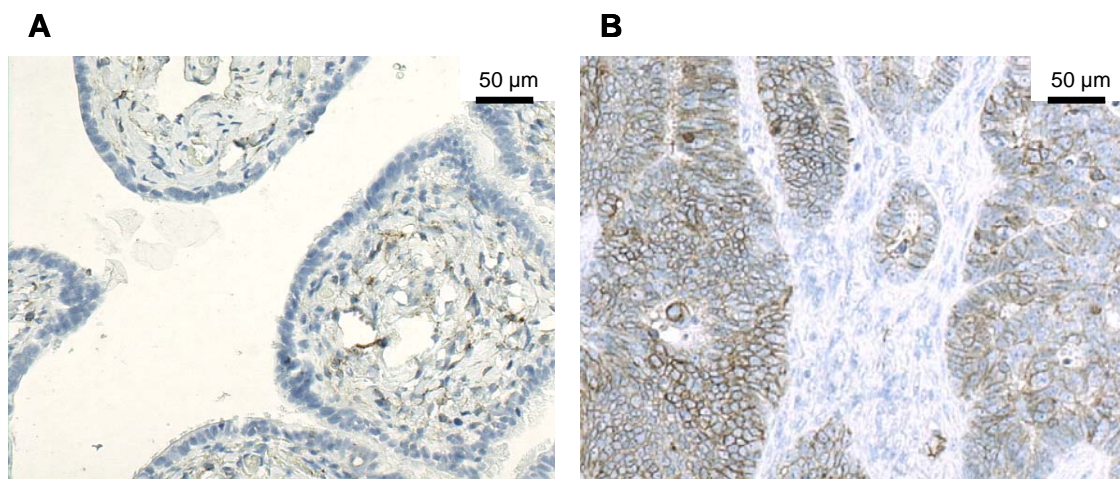
In Abbildung 12 kann man deutlich den Unterschied in der Expression zwischen den verwendeten Zelllinien feststellen. Wie schon auf RNA-Ebene gezeigt wurde, ist L1CAM in der Ovar tumor-Zelllinie im Vergleich zu der Referenz-Zelllinie IOSE 144 aus gesundem Ovar epithelgewebe stark überexprimiert. Zudem ist klar zu erkennen, dass das L1CAM-Protein auf der Oberfläche der Zellen lokalisiert ist. An Zell-Zell-Kontakten scheint das Protein verstärkt vorhanden zu sein. Die schwächeren Signale im Inneren der GG-Zellen können nicht eindeutig als zytoplasmatisch interpretiert werden, da die starke Fluoreszenz der Zellmembran durch mehrere Ebenen hindurch sichtbar ist. Dies könnte nur durch eine konfokale Mikroskopie bestimmt werden, die es möglich macht, eine Ebene isoliert zu betrachten.



Die rot fluoreszierenden IOSE-Zellen im Mittelpunkt der Abbildung 12A scheinen möglicherweise durch die Immortalisierung mit dem großen SV-40 T-Antigen entartet zu sein und zeigen Cy3-Färbung. Die vergrößerten Zellkerne können durch karyotypische Instabilität erklärt werden, wie sie bei SV40 *large T*-immortalisierten Zellen verkommen kann (Toouli et al., 2002). Solche Zellen waren sehr selten zu beobachten (ca. 1 %) und verdeutlichen hier die Überlagerung der beiden Färbungen, da die IOSE 144-Zellen mit typischem Zellkern LICAM-negativ waren.

### 1.5.3 Expression von LICAM in Tumor- bzw. Normalgewebe des Ovars

Mittels Immunhistochemie wurde die LICAM-Expression auf Proteinebene in Gewebeschnitten humaner Ovartumoren untersucht. Bei dieser Methode sind die verschiedenen Zelltypen innerhalb des Gewebeschnitts eindeutig voneinander abgrenzbar. So ist genau erkennbar, in welchen Zelltypen LICAM exprimiert wird, was bei der Untersuchung von RNA aus homogenisiertem Gewebe nicht hervorgeht. Zudem ist die Lokalisierung des Proteins in der Zelle zu erkennen. Die Methode wurde zunächst an Paraffinschnitten eines endometrioiden Adenokarzinom des Ovars etabliert und zum Vergleich ein Gewebeschnitt durch normales Ovargewebe mitgefärbt (s. Kap. II.1.1.2, S. 28). Nach Demaskierung des Antigens und Sättigung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte über Nacht mit dem LICAM mAb UJ127 inkubiert. Die Färbung erfolgte nach Inkubation mit einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper mit dem Substrat DAB (s. Kap. II.2.6.2, S. 54), das zu einem braunen Niederschlag umgesetzt wird. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun blau gefärbt.



**Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten aus humanen Tumoren und Normalgewebe des Ovars mit LICAM mAb UJ127.** Verwendet wurde der LICAM mAb UJ127 und ein sekundärer Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper. Die Färbung erfolgte mit DAB-Substrat, die Gegenfärbung mit Hämalaun. A: LICAM-negatives Normalgewebe des Ovars. B: LICAM-positives endometrioides Adenokarzinom des Ovars (G2).

In Abbildung 13A sind die Oberflächenzellen im Normalgewebe des Ovars als einschichtiges Epithel angeordnet, in welchem L1CAM-Expression nicht nachweisbar war. Das Endothel der Blutgefäße zeigte L1CAM-Färbung. In den entarteten Epithelzellen des Ovariumgewebes in Abbildung 13B ist dagegen L1CAM deutlich exprimiert und membranständig lokalisiert. Man erkennt die L1CAM-positiven Tumorzellen benachbart zu den kleineren, ungefärbten Stromazellen des Ovariumgewebes.

Um die L1CAM-Expression in einer größeren Anzahl verschiedener Tumoren des Eierstocks zu untersuchen, wurde ein Gewebe-Array angefärbt (s. Kap. II.1.6.2, S.31). Dies ist ein Objektträger, auf dem 58 Schnitte von Tumorgewebeproben verschiedener Patientinnen fixiert sind. Die Gewebeproben stammen von Ovarialtumoren verschiedener Histologie und vier Metastasen. Die immunhistochemische Färbung wurde auf die gleiche Weise wie bei den einzelnen Gewebeschnitten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Pathologen der Frauenklinik Ulm.

Epitheliale Tumoren des Ovars			Nicht epitheliale Tumoren des Ovars und Metastasen		
Histologie	++	-	Histologie	++	-
Seröse Karzinome	7	6	Granulosazelltumoren	0	3
Endometrioid Karzinome	4	0	Sertoli-Leydig Tumoren	0	2
<b>Borderline Tumoren</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	Thekome	0	6
Klarzellige Karzinome	4	1	Stroma ovarii	0	1
Brennertumoren	0	1	<b>Fibrome</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Gemischte Karzinome	1	1	Dysgerminome	0	4
Undifferenzierte Karzinome	1	0	Metastasen	0	4

**Tabelle 13: Auflistung der 58 verschiedenen epithelialen und nicht epithelialen Ovarialtumoren bzw. Metastasen des Gewebe-Arrays und ihre L1CAM-Färbung.** L1CAM-Färbung ist in positiv (++) oder negativ (-) unterschieden.

Um einen Überblick über die Expression von L1CAM in den verschiedenen Tumoren zu bekommen, wurden die Gewebeschnitte in Tumoren epithelialer und nicht epithelialer Herkunft eingeordnet. In 17 der insgesamt 26 untersuchten epithelialen Tumoren konnte L1CAM nachgewiesen werden (65 %). Ausgenommen wurden die Borderline-Tumoren, die zwar epithelialen Ursprungs sind, aber im Vergleich zu den anderen Karzinomen eine besonders gute

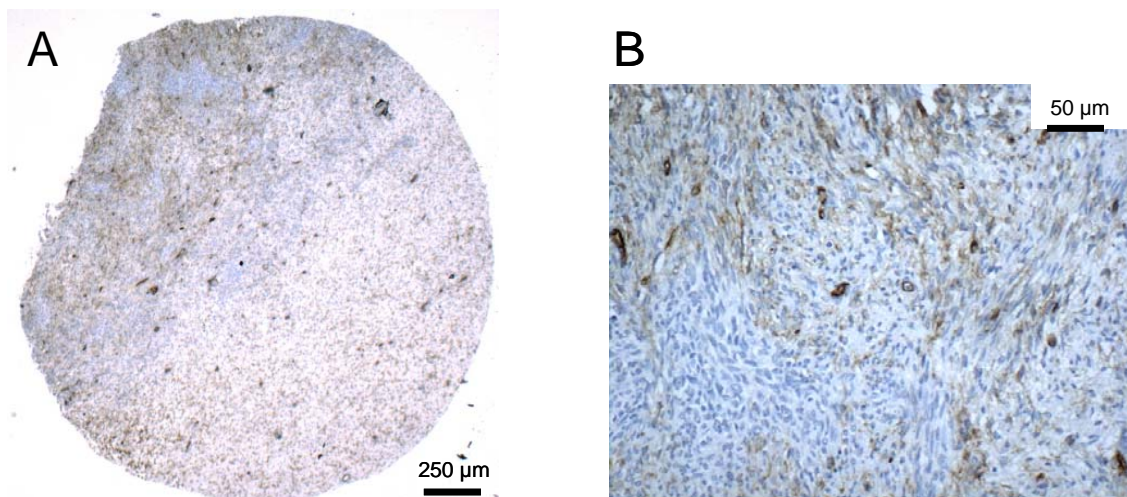
Prognose haben. Auffällig war, dass in keinem der acht Borderline-Tumoren L1CAM-Färbung zu erkennen war. Von den insgesamt 20 nicht epithelialen Ovarialtumoren zeigten zwei Proben L1CAM-Färbung (10 %). Dabei handelte es sich um sehr selten auftretende Fibrome. Die Metastasen, zu denen keine näheren Angaben zu Herkunft und Histologie bekannt sind, waren L1CAM-negativ.

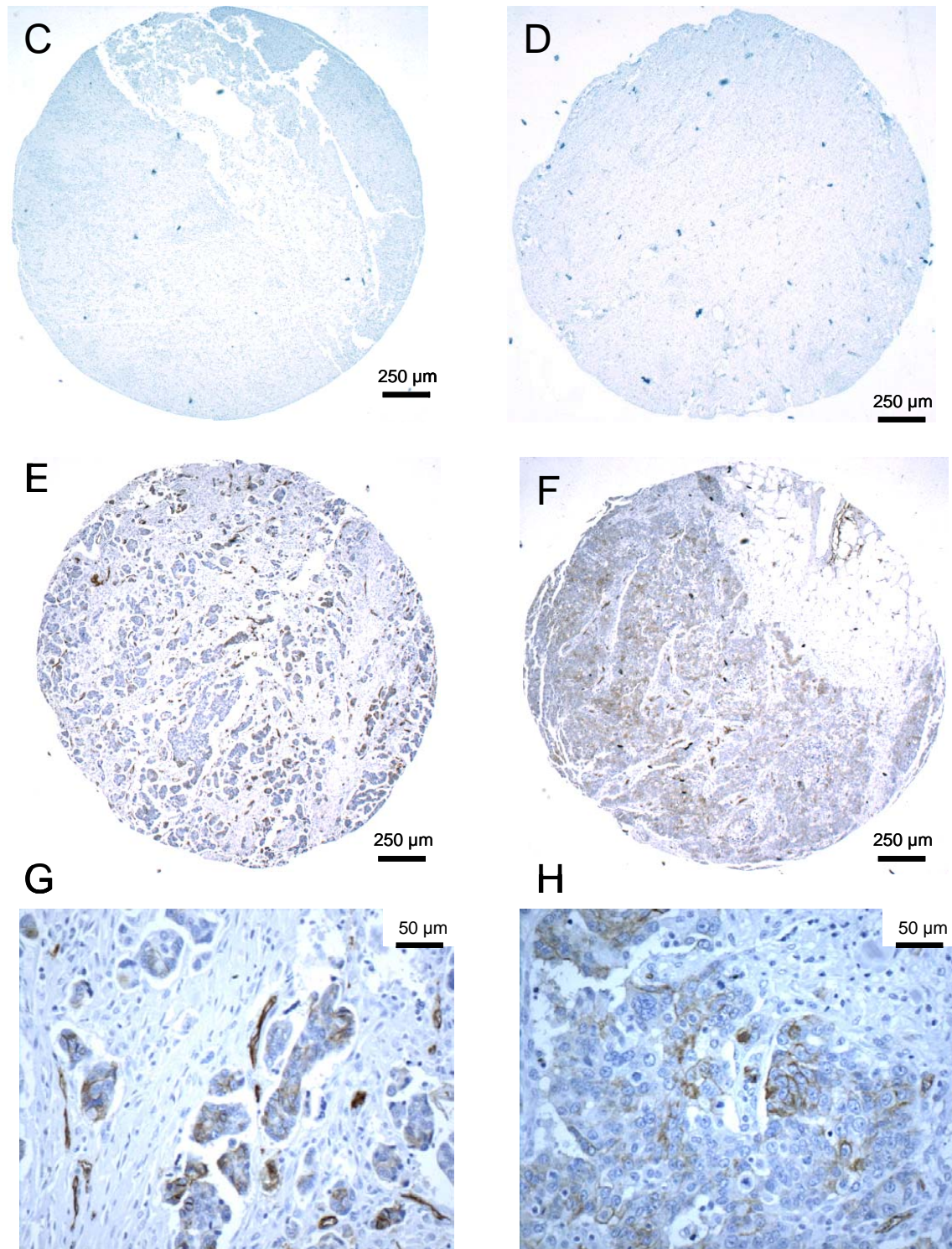
In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der immunhistologischen Färbung des Tumorgewebe-Arrays in einer Übersicht mit Ausnahme der Metastasen zusammengefasst.

L1CAM-Färbung	Epitheliale Ovarialtumoren	Borderline Tumoren	Nicht epitheliale Ovarialtumoren
++	17	0	2
-	9	8	18

**Tabelle 14:** Übersicht der immunhistochemischen Anfärbung eines Gewebe-Arrays mit 54 verschiedenen Ovarialtumoren grob unterteilt in epitheliale Tumoren, Borderline-Tumoren und nicht epitheliale Tumoren. L1CAM-Färbung ist in positiv (++) und negativ (-) unterschieden.

Da die einzelnen Tumorausschnitte mit 2 mm Durchmesser sehr klein waren, konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, dass ein als L1CAM-negativ beurteilter Tumor L1CAM exprimiert, da er nicht in seinem vollen Querschnitt untersucht werden konnte. Repräsentative Färbungen sind in Abbildung 14 dargestellt.





**Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von L1CAM im Ovariumtumorgewebe-Array.** Verwendet wurde der L1CAM mAb UJ127 und ein sekundärer Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper. Die Färbung erfolgte mit DAB-Substrat, die Gegenfärbung mit Hämalaun. Gezeigt werden repräsentative Färbungen eines L1CAM-positiven Fibroms (A, B), eines L1CAM-negativen Borderline-Tumors (C), eines L1CAM-negativen Fibroms (D), eines L1CAM-positiven serösen Karzinoms (E, G) und eines L1CAM-positiven endometrioiden Karzinoms (F, H).

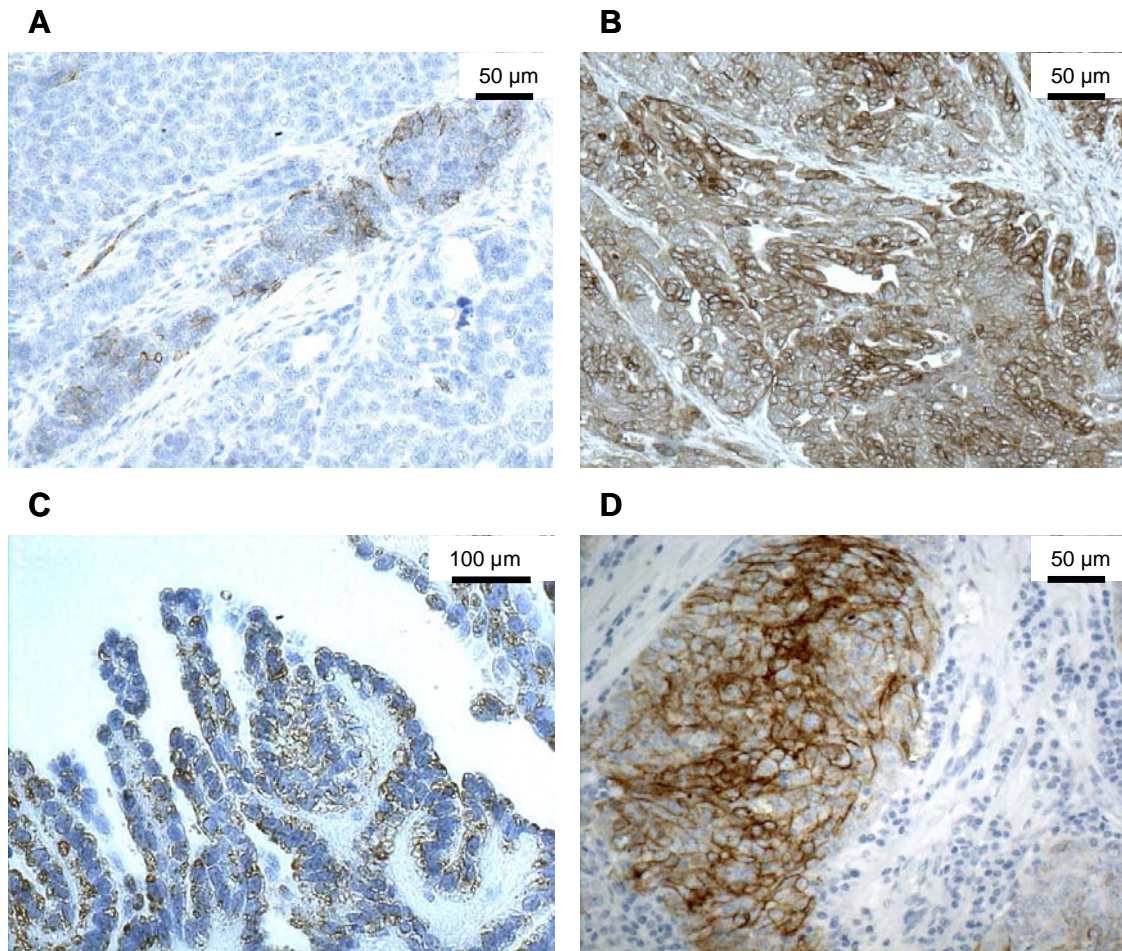
10 - 20 % aller epithelialen Tumoren sind Borderline-Tumoren, die im Gegensatz zu malignen Karzinomen mit einer außergewöhnlich guten Prognose verbunden sind (Zanetta et al., 2001). Allerdings ist dieser Subtyp von Karzinomen oft nur schwer von invasiven Karzinomen zu unterscheiden. Bisher gibt es keinen histologischen Marker, der eine eindeutige Abgrenzung ermöglicht. Nach dem Ergebnis des Ovariumgewebe-Arrays stellte sich die Frage, ob L1CAM möglicherweise als histologischer Marker geeignet ist, um Borderline-Tumoren von Karzinomen zu unterscheiden. Um diese Frage zu klären, wurden gezielt Gewebeschnitte von Karzinomen und Borderline-Tumoren des Ovars einer immunhistologischen Analyse unterzogen (s. Kap. II.1.1.2, S. 28).

Da diese Gewebeschnitte komplette Querschnitte durch Ovariumtumoren darstellen, konnte hier die Intensität der L1CAM-Färbung genauer beschrieben werden. So wurden großflächig und stark gefärbte Tumoren mit ++ (über 70 % positive Tumorzellen), Tumoren, die eine schwächere und differenzierte L1CAM-Färbung zeigten mit + (unter 40 % positive Tumorzellen), und L1CAM-negative Tumoren mit - gekennzeichnet.

Intensität der L1CAM-Färbung	Karzinome	Borderline Tumoren
++	9	3
+	7	2
-	6	12

**Tabelle 15: Übersicht der immunhistochemischen Anfärbung von insgesamt 39 Tumoren des Ovars unterteilt in 22 Karzinome und 17 Borderline-Tumoren.** L1CAM-Färbung ist in stark gefärbten Tumoren mit ++ (über 70 % positive Tumorzellen), in Tumoren, die eine schwächere und differenzierte L1CAM-Färbung zeigten mit + (unter 40 % positive Tumorzellen), und in L1CAM-negativen Tumoren mit - gekennzeichnet.

Von insgesamt 22 Karzinomen waren 16 L1CAM-positiv (73 %), wobei in neun Karzinomen die Färbung sehr stark und großflächig war (++) . In den getesteten Borderline-Tumoren konnte in fünf von insgesamt 17 Gewebeschnitten L1CAM nachgewiesen werden (29 %), davon in drei Proben in der überwiegenden Mehrheit der Tumorzellen. Repräsentative Färbungen sind in Abbildung 15 dargestellt (s. S. 78).



**Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten aus humanen Karzinomen und Normalgewebe des Ovars mit LICAM mAb UJ127.** Verwendet wurde der LICAM mAb UJ127 und ein sekundärer Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper. Die Färbung erfolgte mit DAB-Substrat, die Gegenfärbung mit Hämalaun. Gezeigt werden repräsentative Färbungen eines schwach LICAM positiven Adenokarzinoms (A), eines stark LICAM positiven Adenokarzinoms (B), eines LICAM positiven Borderline-Tumors (C), und eines LICAM positiven Adenokarzinoms, besonders stark gefärbt am invasiven Pol zum benachbarten Stroma (D).

## **2. Untersuchungen zur Funktion von L1CAM in Ovarkarzinom-Zellen anhand stabiler Transfektanten**

L1CAM ist im Vergleich zu den IOSE-Referenz-Zelllinien in acht der elf untersuchten Ovartumorzelllinien deutlich überexprimiert und in Tumorgewebe vorwiegend in malignen Karzinomen exprimiert. Zelladhäsionsmoleküle spielen bei der Verbreitung von Tumorzellen eine wichtige Rolle. Um zu untersuchen, ob die Expression von L1CAM zur Malignität von Ovartumorzellen beiträgt, wurden stabile Transfektanten hergestellt. Dazu wurde in eine Ovartumorzelllinie, die über eine sehr geringe endogene L1CAM-Expression verfügt, der offene Leserahmen von L1CAM unter einem konstitutiv aktiven Promotor eingeführt. Durch den Vergleich der Transfektanten mit ektopischer L1CAM-Expression und Kontroll-Transfektanten, welche den Vektor ohne L1CAM-Insertion erhalten haben (Vektor-Transfektanten), sollte der Einfluss des Proteins auf den Phänotyp dieser Zelllinie in verschiedenen zellulären Experimenten untersucht werden. Die Ovartumorzelllinien OV-MZ-2 und OV-MZ-30 zeigten eine sehr geringe Expression von L1CAM und stellten daher geeignete Zielzellen für die Transfektion dar. Da nur die Zelllinie OV-MZ-2 in unserem Labor zur Kultivierung bereitstand, wurde diese verwendet. In Vorversuchen zeigte sich, dass sie mit ausreichender Effizienz (16 %) transfiziert werden konnte.

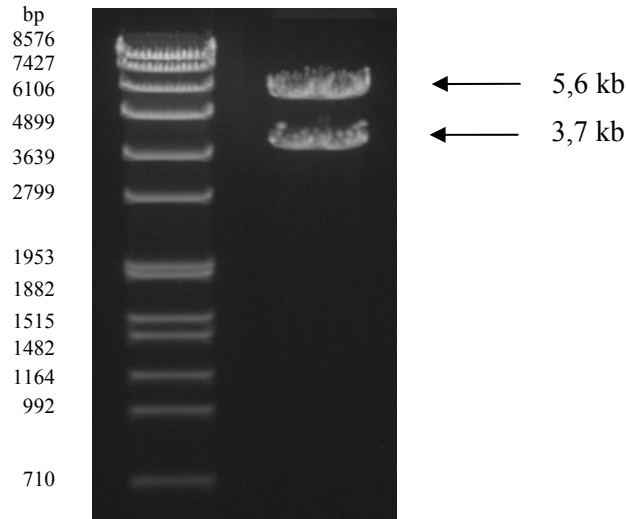
### **2.1 Herstellung und Verifizierung stabiler Transfektanten von L1CAM**

#### **2.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors**

Die kodierende Sequenz von L1CAM (3771 bp) wurde mittels PCR durch die Primer L1CAMFL3NotI\_for und L1CAMFL2XbaI\_rev (s. Tab. 6, S. 28) aus cDNA der Zelllinie DW amplifiziert, die eine starke L1CAM-Expression aufweist, und über die eingefügten Restriktionsschnittstellen NotI bzw. XbaI in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pcDNA3.1/Hygro (s. Abb. 2, S. 29) ligiert. Der offene Leserahmen (ORF) des L1CAM-Gens wurde unter die Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors gebracht. Da der ORF mit 3771 bp relativ groß ist, wurde ein spezielles PCR-Reaktionssystem verwendet, das bis zu 5 kb fehlerfrei amplifizieren kann (s. Kap. II.2.4.4, S. 51). Das fertige Konstrukt wurde durch Sequenzierung mittels überlappender Primer überprüft (Medigenomix, München). Dabei stellte sich heraus, dass die Sequenz des amplifizierten ORF einer Isoform von L1CAM entspricht, in welcher die Exons 2 und 27 deletiert sind (s. Kap. III.2.1.2, S. 80). Eine andere Isoform konnte auch aus der Zelllinie GG, die ebenfalls eine starke L1CAM-Expression zeigte und zusätzlich verwendet wurde, nicht isoliert werden. L1CAM<sub>Δ2,27</sub> stellt also in diesen Zelllinien die vorherrschende Isoform von

L1CAM dar und wurde daher für die Transfektion und anschließende Experimente verwendet. Der ORF dieser Isoform hat eine Länge von 3744 bp.

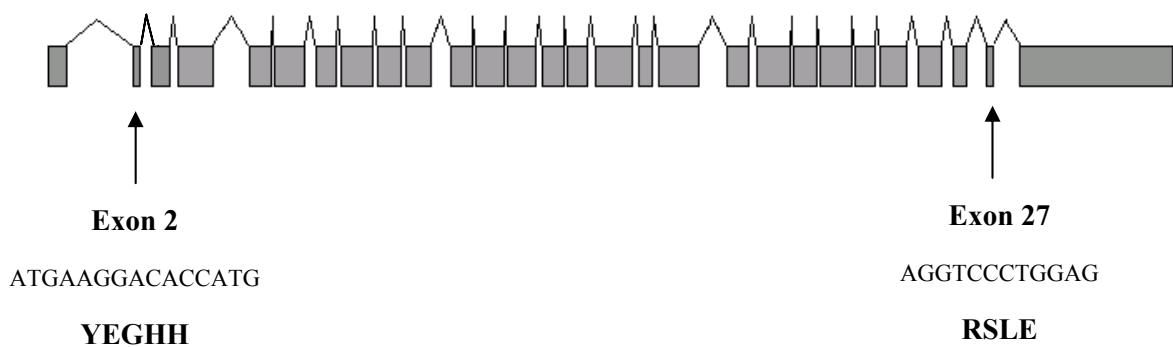
Der entstandene Vektor wurde als L1CAM $_{\Delta 2,27}$ -pcDNA3.1/Hygro bezeichnet.



**Abbildung 16:** Vektor L1CAM $_{\Delta 2,27}$ -pcDNA3.1/Hygro geschnitten mit Xba I und Not I. Auftrennung der Fragmente erfolgte im 1 %igen Agarose Gel. Der linearisierte Vektor hat eine Größe von 5,6 kb. Die Insertion zeigt die Größe des ORF der Isoform von L1CAM (3744 bp).

### 2.1.2 Isoform L1CAM $_{\Delta 2,27}$

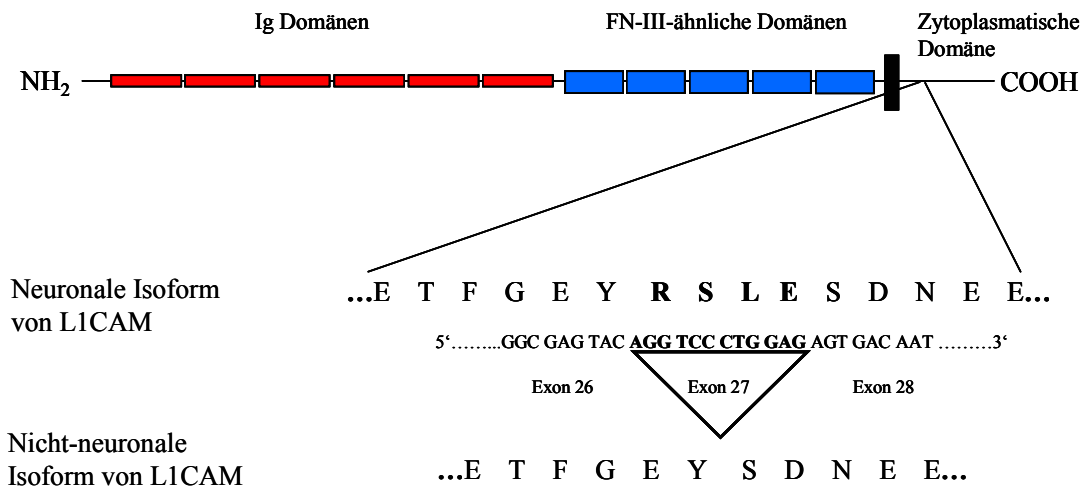
Wie im vorigen Kapitel beschrieben konnte aus den Ovar tumor-Zelllinien DW und GG nur die Spleißvariante L1CAM $_{\Delta 2,27}$  isoliert werden. Auf genomischer Ebene besteht L1CAM aus 28 Exons.



**Abbildung 17:** Schematische Anordnung der genomischen Exon-Intron-Struktur von L1CAM. Die grauen Kästen stellen die Größe der Exons, die verbindenden Linien die Größe der Introns dar. Die Exons 2 und 27 sind mit Pfeilen angezeigt und ihre Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz ist angegeben.

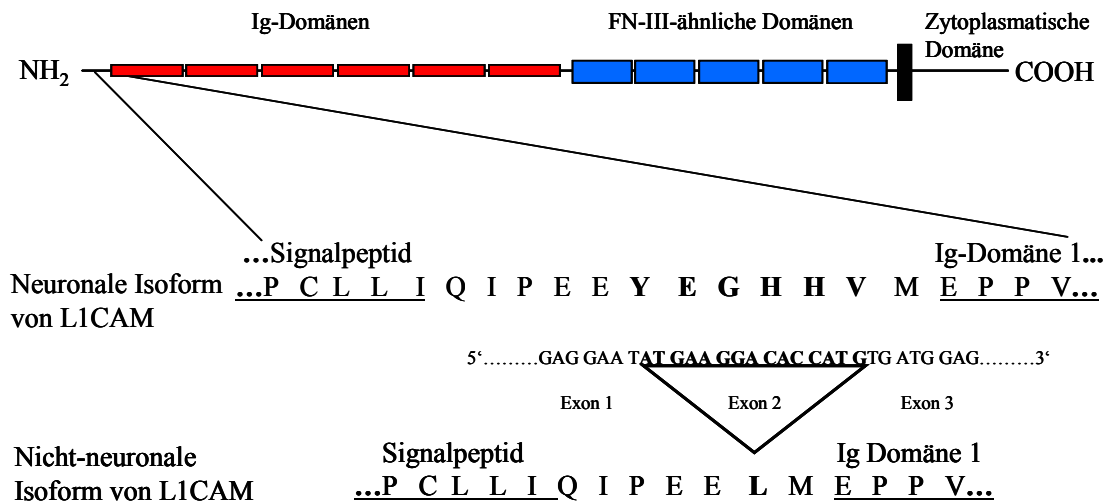
Die Isoform, die alle 28 Exons exprimiert, wurde bisher nur in Nervenzellen beschrieben. Nicht-neuronale Zellen exprimieren eine Isoform von L1CAM, welcher das Exon 27, das für vier Aminosäuren (RSLE) kodiert, fehlt (Miura et al., 1991; Reid und Hemperly, 1992).





**Abbildung 18: Schematische Darstellung des Exon 27 in der neuronalen und nicht-neuronalen Isoform von L1CAM.** Rote Balken symbolisieren die Ig-Domänen, blaue Balken die FNIII-ähnlichen Bereiche, der schwarze Balken zeigt die Transmembrandomäne an. Die für Exon 27 kodierende Region ist dick hervorgehoben.

Alternatives Spleißen des Exons 2, das für die Aminosäuren YEGHH kodiert, wurde zuerst in B-Zellen beschrieben (Jouet et al., 1995). Eine Isoform von L1CAM, in der Exon 27 und Exon 2 deletiert sind, wird in nicht-neuronalen Zellen wie Schwannschen Zellen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Takeda et al., 1996), aber auch in renalen Karzinomzellen exprimiert (Meli et al., 1999).

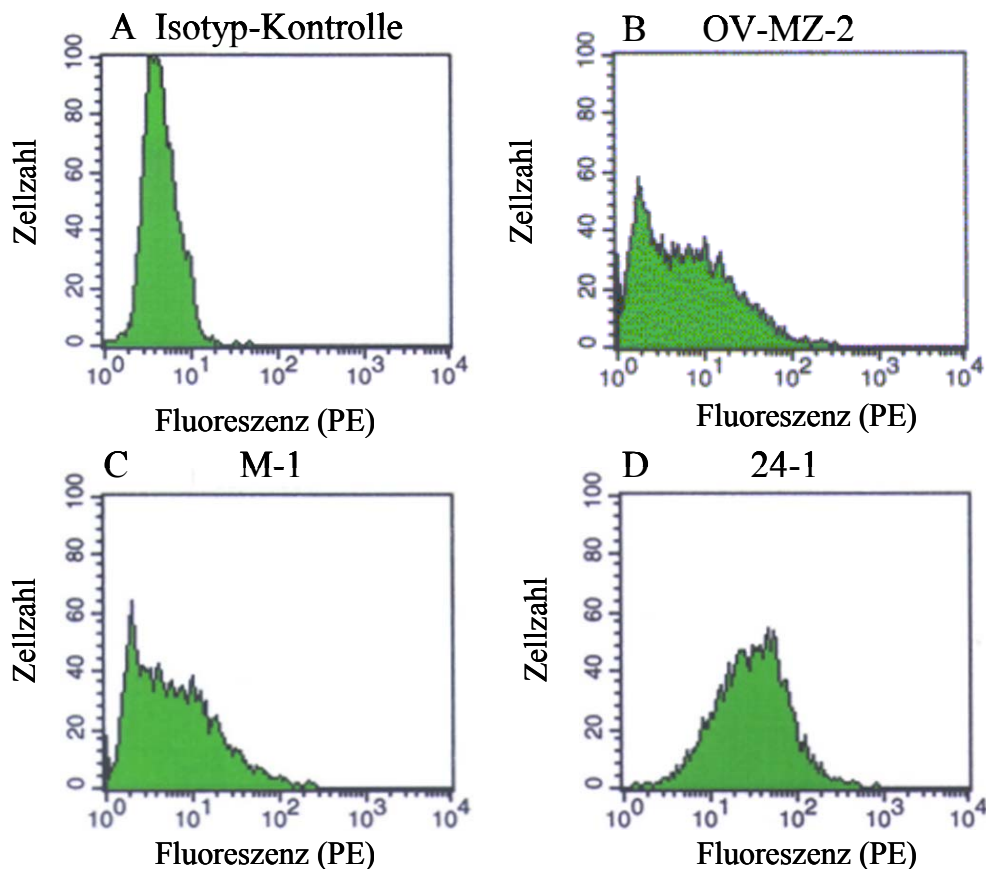


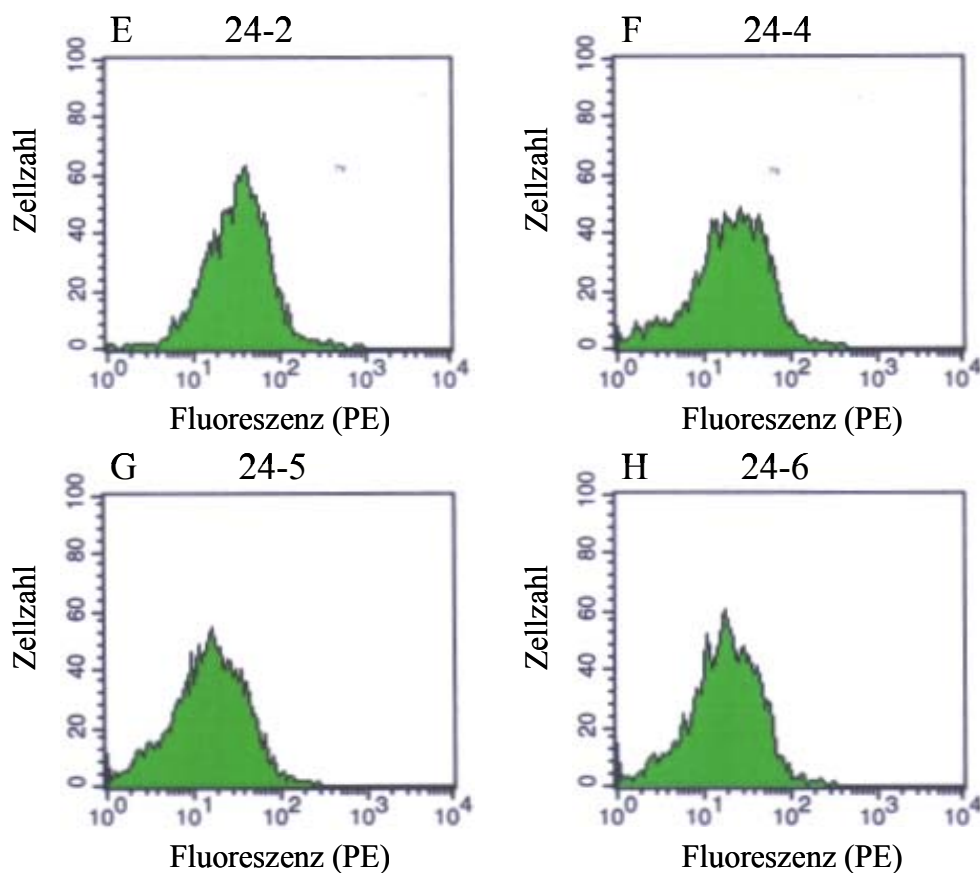
**Abbildung 19: Schematische Darstellung des Exon 2 in der neuronalen und nicht-neuronalen Isoform von L1CAM.** Rote Balken symbolisieren die Ig-Domänen, blaue Balken die FNIII-ähnlichen Bereiche, der schwarze Balken zeigt die Transmembrandomäne an. Die für Exon 2 kodierende Region ist dick hervorgehoben. Der Tyrosin-Rest an Position 26 wird durch Spleißen des Exons zu Leucin.

### 2.1.3 Herstellung und Selektion stabiler L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten

Wie in den Affymetrix-Ergebnissen zu sehen ist, zeigt die Zelllinie OV-MZ-2 eine sehr geringe L1CAM-Expression. Diese wurde auf ihre Transfizierbarkeit getestet, indem sie transient mit dem Kontrollvektor pCl-neo-GFP mit verschiedenen Transfektionsreagentien und nach verschiedenen Protokollen getestet wurde. Die FACS-Analyse der Transfektanten auf GFP-Fluoreszenz (GFP, *Green Fluorescent Protein*) ergab nach Optimierung des günstigsten Transfektionsprotokolls mit Lipofektamine2000 eine Transfektionseffizienz von 16 %. Diese Zelllinie wurde für die Transfektion des Vektors L1CAM $\Delta_{2,27}$ -pcDNA3.1/Hygro sowie des Leer-Vektors verwendet. Die Zellen wurden vier Wochen unter Selektionsdruck (100  $\mu$ g Hygromycin B) kultiviert und entstandene Einzelkolonien mit Klonierungszyklindern vereinzelt (s. Kap. II.2.1.2.6, S. 39).

Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde die L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Expression auf der Oberfläche der Tranfektanten gemessen (s. Kap. II.2.5.7, S. 53). So konnte gezeigt werden, dass das L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Protein nicht nur exprimiert wird, sondern auf der Zellmembran lokalisiert ist. Der verwendete mAb 5G3 (s. Tab. 7, S. 30) bindet am äußeren N-Terminus der extrazellulären Domäne von L1CAM (s. Abb. 10, S. 70). Als sekundärer Antikörper wurde ein Phycoerythrin-konjugierter Anti-Ziege-Antikörper verwendet (s. Tab. 8, S. 30).



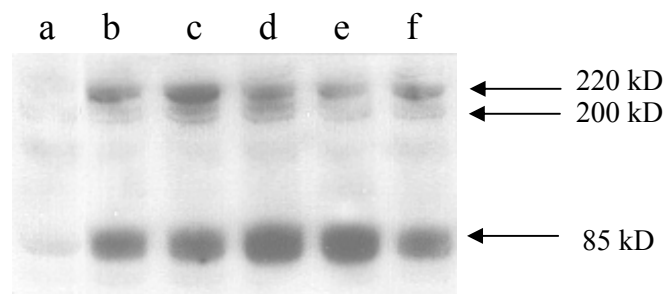


**Abbildung 20: FACS-Analyse der L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten.** L1CAM-Protein wurde mit einem primären L1CAM mAb 5G3 (B-H) und einem sekundären Phycoerythrin-gekoppelten Anti-Ziege-Antikörper nachgewiesen; A: Isotyp-Kontrolle (24-1); B: OV-MZ-2; C: Vektor-Kontrolle M-1; D-H: L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten: D: 24-1; E: 24-2; F: 24-4; G: 24-5; H: 24-6.

Wie in Abbildung 20C zu erkennen ist, ist die L1CAM-Expression in den Vektor-transfizierten Zellen (M-1) wie in den Zellen der Ursprungszelllinie OV-MZ-2 (Abb. 20B) heterogen, aber eine schwache Expression des Proteins auf der Oberfläche der Zellen ist sichtbar. In den L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten (Abb. 20D-H) ist diese Expression deutlich stärker. Die gezeigten fünf Klone wurden für die nachfolgenden zellulären Assays ausgewählt.

Mittels Westernblot-Analyse wurde Gesamt-Protein aus Zelllysaten untersucht, um die Expression von L1CAM $\Delta_{2,27}$  in den L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten im Vergleich zu den Vektor-Transfektanten auf Proteinebene zu zeigen und die Größe des Proteins darzustellen (s. Kap. II.2.5.1-5, S. 51-52). 20  $\mu$ g Gesamt-Protein aus Zelllysaten wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Proteinnachweis von L1CAM erfolgte mit dem primären

mAb UJ127 und einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (s. Tab. 7 und 8, S. 30). Der Antikörper UJ127 bindet an die extrazelluläre Domäne (s. Abb. 10, S. 70) und eignet sich zum Nachweis der 200-220 kD-Form und der 85 kD-Form von L1CAM, die durch proteolytische Spaltung in der dritten FNIII-ähnlichen Domäne entsteht (Nayeem et al., 1999). Durch unterschiedliche Glykosilierung liegt die Größe des ungespaltenen L1CAM-Proteins zwischen 200 und 220 kD.



**Abbildung 21: Westernblot-Analyse der L1CAM-Expression der Transfektanten.** Aufgetragen wurden je 20 µg Gesamt-Protein aus Zellysaten bestimmt mit BCA-Proteinbestimmung. L1CAM-Protein wurde mit dem L1CAM mAb UJ127 und einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Spur a: Vektor-Kontrolle M-1; Spur b-f: L1CAM<sub>Δ2,27</sub>-Transfektanten 24-1, 24-2, 24-4, 24-5, 24-6.

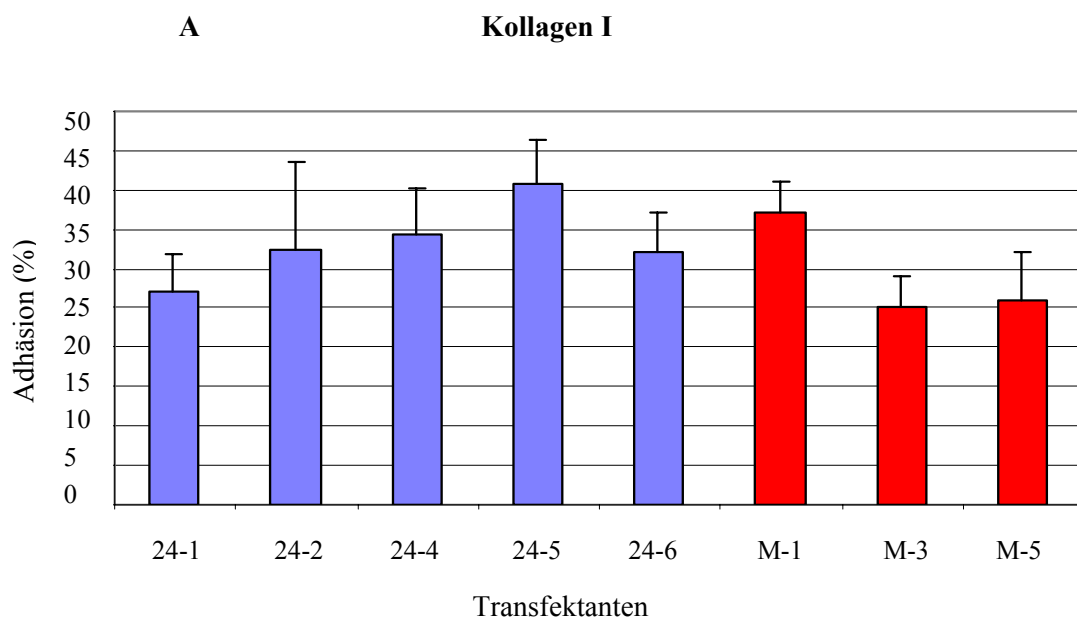
Man erkennt in Abbildung 21, dass die Expression des Proteins in den mit dem L1CAM<sub>Δ2,27</sub>-pcDNA3.1/Hygro-Vektor transfizierten Zellen deutlich höher ist als in den Vektor-transfizierten Zellen, in denen man die L1CAM-Expression der Ursprungs-Zelllinie OV-MZ-2 erwartet. Die Größen entsprechen den in der Literatur beschriebenen Werten (s. Kap. III.1.5.1, S. 70). Die gezeigten Transfektanten wurden für die nachfolgenden zellulären Tests verwendet.

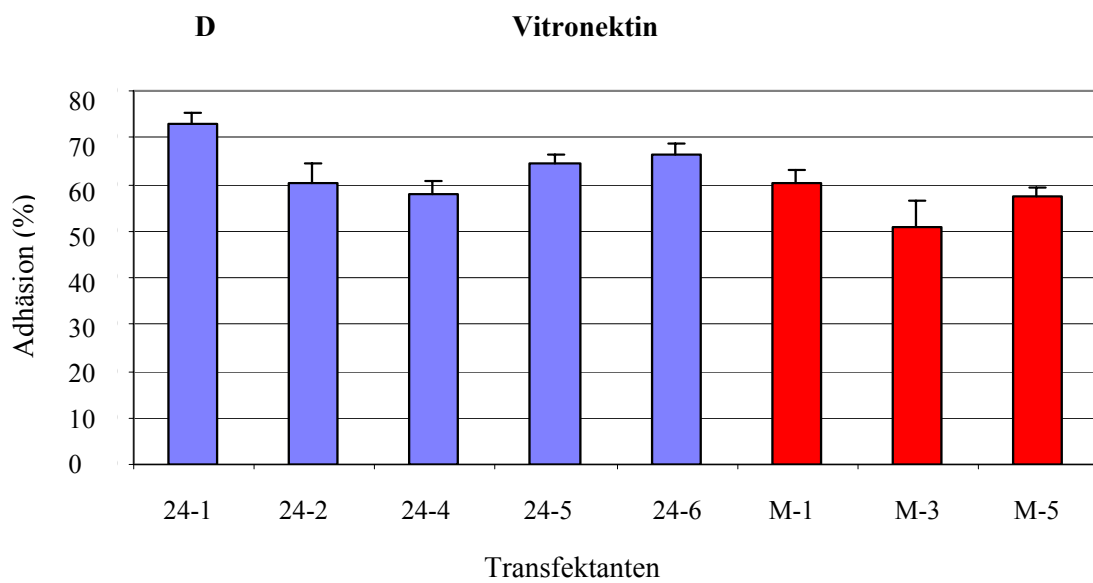
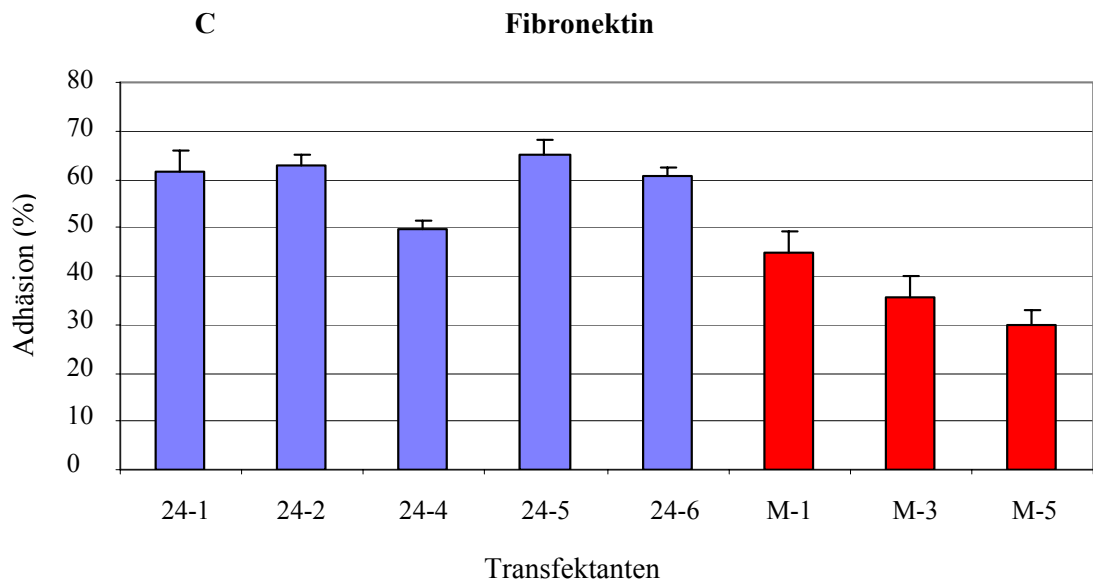
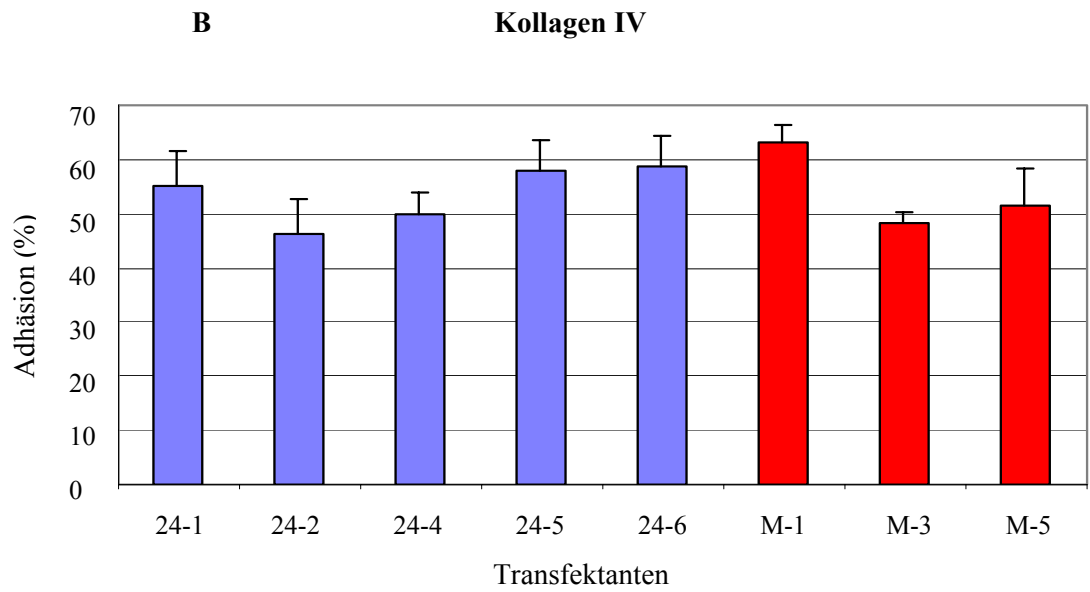
## 2.2 Versuche zur Funktion der Isoform L1CAM $\Delta_{2,27}$

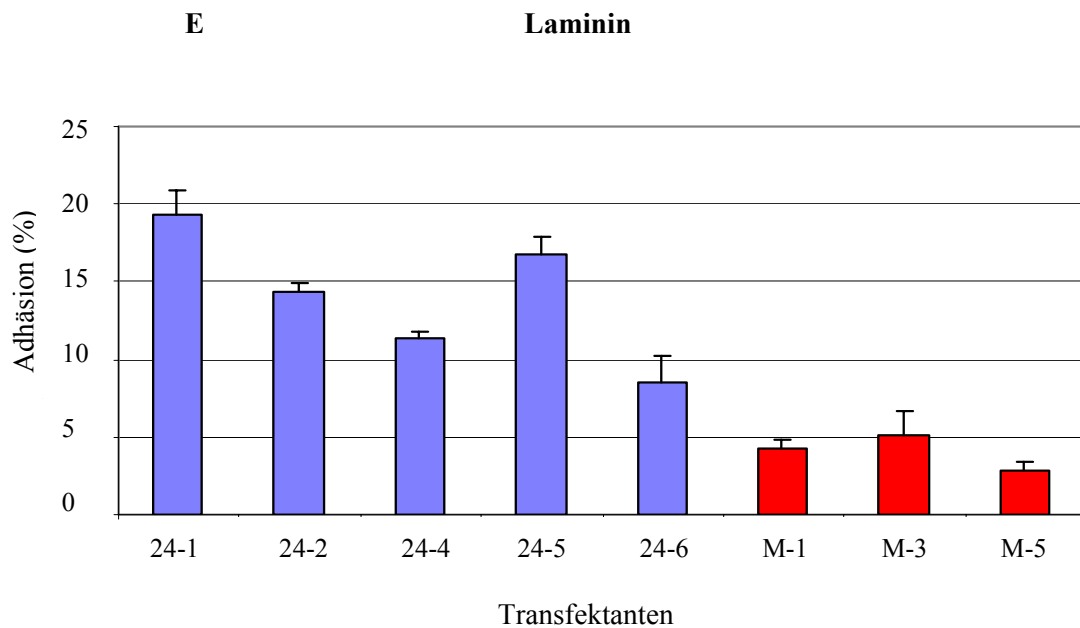
### 2.2.1 Bestimmung der Zelladhäsion an Substrate der extrazellulären Matrix

Im Adhäsionstest wurde untersucht, ob L1CAM $\Delta_{2,27}$  eine Rolle bei der Anheftung der Zellen an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix (EZM) spielt. Die Zusammensetzung der EZM, welche aus der Basalmembran und dem interstitiellen Bindegewebe besteht, enthält neben Organ-spezifischen Bestandteilen bestimmte Komponenten wie Laminin, Kollagen I und IV, Vitronektin, und Fibronektin, an die bestimmte Zelladhäsionsmoleküle binden können. Die Interaktion der neuronalen Isoform von L1CAM an Laminin wurde von Hall et al. gezeigt (1997). Die Bindung erfolgt im Bereich der Ig-Domänen des Zelladhäsionsmoleküls (Hall et al, 1997). Durch das Fehlen der fünf Aminosäuren im N-terminalen Bereich der Isoform L1CAM $\Delta_{2,27}$  ist das Bindungsverhalten sowohl bei homophilen als auch bei bestimmten heterophilen Interaktionen verändert (De Angelis et al., 2001; Jacob et al., 2002). Möglicherweise ist die Isoform L1CAM $\Delta_{2,27}$  nicht in der Lage, Adhäsion an Laminin zu vermitteln.

Spezielle 96-Lochplatten mit einer unbehandelten Oberfläche wurden mit den jeweiligen Substraten beschichtet und gleiche Aliquots Calcein-AM-markierter Zellen ausgesät (s. Kap. II.2.1.2.8, S. 40). Nicht adhärente Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 90 min durch vorsichtige Waschschriffe entfernt. Die Zellen, die nach dem Waschen noch am Substrat hafteten, wurden an einem Fluoreszenz-Messgerät bei 485 nm relativ zur Gesamtzahl der ausgesäten Zellen quantifiziert und sind in Prozent angegeben. Getestet wurde die Adhäsion an die genannten Komponenten.







**Abbildung 22: Adhäsion der L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten im Vergleich zu den Vektor-Transfektanten an Komponenten der EZM.** Blaue Balken zeigen die Adhäsion der L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten, rote Balken die der Vektor-Transfektanten. Nicht adhärenente Zellen wurden nach 90 min Inkubationszeit entfernt. Adhärenente Zellen sind prozentual im Vergleich zur Gesamtzahl der ausgesäten Zellen angegeben. Die Werte sind aus Achtfach-Bestimmungen von zwei unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Standardabweichungen sind als Striche über den Balken eingezeichnet. A: Kollagen I, B: Kollagen IV; C: Fibronectin; D: Vitronectin; E: Laminin.

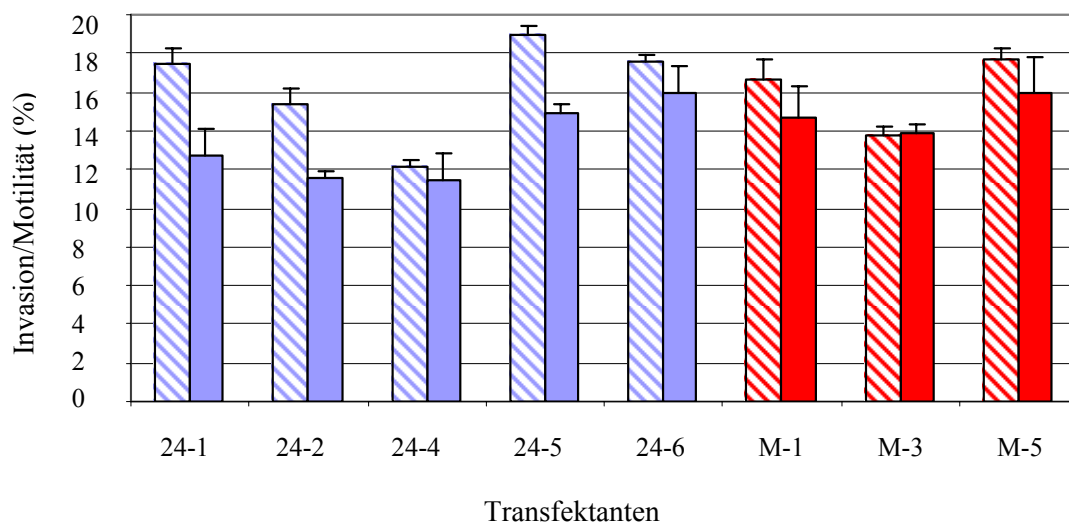
Die Adhäsion an die Substrate Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin und Vitronectin zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen den L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten und den Vektor-Transfektanten. In Abbildung 22E ist zu erkennen, dass die L1CAM $\Delta_{2,27}$ -Transfektanten deutlich besser an Laminin haften bleiben als die Vektor-Transfektanten. Die Adhäsion an dieses Substrat war insgesamt niedriger als die an die anderen getesteten Substrate. Diese Isoform von L1CAM ist also auch in der Lage Adhäsionsfähigkeit an Laminin zu vermitteln.

### 2.2.2 Invasionstest

Die Interaktion von Tumorzellen mit Laminin trägt über die Induktion von proteolytischer Aktivität zur Invasivität der Zellen bei (Pupa et al., 2002). Da die L1CAM $\Delta_{2,27}$ -transfizierte Zellen deutlich besser an Laminin adhären als die Vektor-transfizierte Zellen (s. Abb. 22, oben), stellte sich die Frage, ob die Interaktion mit Laminin Auswirkungen auf die Invasivität hat.

Das invasive Potenzial der Zellen wurde in einer Matrigel-Invasionskammer getestet. Diese besteht aus zwei Kammern, die durch einen Kunststoff-Filter voneinander getrennt sind. Der Kunststoff-Filter hat eine Porengröße von 8  $\mu$ m und ist mit einer Matrigel-Schicht versehen. Matrigel besteht aus den Hauptkomponenten der Basalmembran wie Laminin, Entaktin, Kollagen IV und Heparan-Sulfat-Proteoglykan und imitiert diese *in vitro*. Invasive Zellen können durch die Matrigelschicht

und die Poren der Membran in das untere Kompartiment gelangen. Ein wichtiger Mechanismus im Prozess der Invasion ist die Beweglichkeit der Zellen. Zellen mit einer größeren invasiven Aktivität besitzen meist auch eine größere Motilität (Chu et al., 1993). Der Motilitätstest entspricht dem Invasionstest mit dem Unterschied, dass die Kunststoffmembran unbeschichtet ist. Die Anzahl der Zellen in der unteren Kammer und auf der Unterseite des Einsatzes wurde nach einer Inkubationszeit von 72 h mit Hilfe des WST-1-Tests bestimmt und relativ zur Gesamtzahl der ausgesäten Zellen berechnet (s. Kap. II.2.1.2.7, S. 40).



**Abbildung 23: Invasion und Motilität der LICAM $_{\Delta 2,27}$ -Transfektanten im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen in der modifizierten Boyden-Kammer.** Blaue Balken zeigen die Invasion der LICAM $_{\Delta 2,27}$ -Transfektanten, rote Balken zeigen die der Vektor-Transfektanten. Die blau- bzw. rotgestreiften Balken zeigen die Motilität der Zellen im Versuch ohne Matrigelschicht an. Zellen die sich nach Inkubationszeit von 72 h im unteren Kompartiment bzw. auf der Unterseite der Membran befanden, wurden im WST-1-Test nachgewiesen und sind prozentual zur Gesamtzellzahl in beiden Kompartimenten angegeben. Die Werte wurden aus Doppelbestimmungen von zwei unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Standardabweichungen sind als Striche über den Balken eingezeichnet.

LICAM $_{\Delta 2,27}$ -transfizierte Zellen zeigten im Bezug auf Motilität und Invasivität im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen keine signifikanten Unterschiede. LICAM $_{\Delta 2,27}$  scheint also weder durch eine Erhöhung der Beweglichkeit noch über eine Induktion von proteolytischer Aktivität zu einer verstärkten Invasivität beizutragen.



## IV. Diskussion

Patientinnen mit epithelialen Tumoren des Ovars haben eine sehr niedrige Überlebensrate aufgrund unzureichender Diagnose- und Therapie-Möglichkeiten. Klinische Symptome sind im frühen Stadium der Krankheit kaum vorhanden und im späten Stadium unspezifisch, so dass bei dem Großteil der Patientinnen die Diagnose mit bereits fortgeschrittener Krankheit gestellt wird. Die Fünfjahres-Überlebensrate liegt in diesen Fällen bei 30 %. Bei dem kleinen Anteil an Patientinnen, der im Stadium I diagnostiziert wird, liegt diese Rate dagegen bei 90 %. Obwohl die meisten Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium ein gutes Ansprechen auf die gängige Therapie zeigen, ist die Rückfallquote aufgrund verbleibender mikroskopischer Tumorreste hoch (Menon und Jacobs, 2002).

Der einzige Biomarker, der für die Überwachung des Krankheitsverlaufs, nicht für die Diagnose, derzeit standardmäßig eingesetzt wird, ist CA125. Die Sensitivität und Spezifität von CA125 ist vor allem dazu geeignet, in Kombination mit anderen diagnostischen Tests gutartige von bösartigen Tumoren zu unterscheiden und das Ansprechen der Krankheit auf die Therapie zu verfolgen (Fritsche und Bast, 1998; Jacobs und Menon, 2004).

Die Pathogenese ist bislang noch weitgehend unbekannt und ein Progressionsmodell, wie es für kolorektale Karzinome beschrieben ist (Kinzler und Vogelstein, 1998), konnte noch nicht entwickelt werden. Ein besseres Verständnis der molekularen Zusammenhänge bei der Entstehung und Ausbreitung von Krebszellen kann dazu beitragen, neue Angriffsziele für Diagnostik und Therapiestrategien zu identifizieren. Vergleichende Analysen der Genexpressionsprofile von normalen Epithelzellen des Ovars mit Tumorzellen des gleichen Organs sind ein viel versprechender Ansatz, um biologische Marker der zellulären Transformation zu identifizieren (Ismail et al., 2000). Ein optimales Zielgen würde für ein Molekül kodieren, das entweder auf der Oberfläche von Tumorzellen zugänglich ist oder von den Tumorzellen in Serum oder Urin der Patientinnen abgegeben wird (Haviv und Campbell, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genexpressionsprofile von elf Ovar tumor-Zelllinien mit denen von zwei Zelllinien verglichen, welche aus normalem Oberflächenepithel des Ovars etabliert wurden. Um ein diagnostisches oder therapeutisches Zielgen zu identifizieren, welches die Tumorzellen kennzeichnet, wurden nur Gene berücksichtigt, die sich auf der Oberfläche der Tumorzellen befinden oder von diesen sezerniert werden.

## 1. Zelllinien-System

Bei den Zelllinien, die für diese Arbeit verwendet wurden, handelt es sich zum einen um immortalisierte Zelllinien, welche aus den Oberflächenepithel des Ovars isoliert wurden (IOSE), und zum anderen um Zelllinien, welche aus verschiedenen Karzinomen des Ovars etabliert wurden (s. Tab. 4 und 5, S. 27). Gewebe enthalten viele verschiedene Zellpopulationen, von denen jeder Zelltyp ein spezielles Genexpressionsmuster aufzeigt. Da die große Mehrheit der Tumoren des Eierstocks (80 - 90 %) aus Epithel-Gewebe hervorgeht (Auersperg et al., 1999; Lloyd und Yin, 2001) sollte der Vergleich mit nicht malignen Zellen des ovariellen Epithels geeignet sein, um Gene, welche die Krebszellen kennzeichnen und eventuell zu ihrer Malignität beitragen, zu identifizieren.

Epithelzellen stellen nur einen kleinen Teil der Zellpopulation des Ovars dar, da sie das Organ in einer einzelligen Schicht umgeben (s. Abb. 1, S. 2). Die Möglichkeit, humane Epithelzelllinien von normalem Gewebe und Karzinomen des Ovars zu kultivieren ermöglicht es, Zellen in großen Mengen zu erhalten, die frei von kontaminierenden Zellen sind. Das bietet den Vorteil gegenüber dem Vergleich von Geweben, differentielle Genexpression zwischen homogenen Populationen von normalen mit Tumor-abgeleiteten Zellen zu untersuchen. Diese Art des Vergleichs minimiert Genexpressionsunterschiede, welche die Anwesenheit nicht-epithelialer Zellen wie Stroma- oder Keimzellen in normalem Gewebe bzw. Immunzellen in Tumorgewebe widerspiegelt (Ismail et al., 2000). Epithelzellen des Eierstocks können ca. 15-mal passagiert werden (Auersperg et al., 1994). Durch Immortalisierung mit dem großen Antigen des Simian Virus-40 ist es möglich, die Zellen unbegrenzt in Kultur zu halten. Durch diese Modifizierung entstehen Zellen, welche denen in der frühen Phase der neoplastischen Progression ähneln, aber nicht tumorigen sind (Maines-Bandiera et al., 1992; Nitta et al., 2001). Durch den Vergleich dieser IOSE-Zellen mit Tumorzellen sollten also Gene identifiziert werden können, die nach dem Übergang zum Neoplasma dereguliert werden.

Die Ovar tumor-Zelllinien sind von Tumorzellen abgeleitet, die von Patientinnen mit histologisch unterschiedlichen Karzinomen des Ovars isoliert wurden (s. Tab. 4, S. 27). Da jede der Ovar tumor-Zelllinien von einer anderen Patientin abstammt, ergeben sich individuelle Unterschiede in der Genexpression. Um trotz dieser nicht Tumor-assoziierten Divergenzen die Gene zu identifizieren, welche die maligne Entartung der Tumorzellen im Gegensatz zu den IOSE-Zellen charakterisieren, wurden elf Ovar tumor-Zelllinien für diesen Vergleich verwendet. Durch diese Anzahl an malignen Zelllinien soll gewährleistet werden, dass Veränderungen in der Genexpression, die in einem Großteil dieser Zelllinien nachweisbar sind, auf den Prozess der Tumorentstehung und -progression zurückzuführen sind.

Da die Ovar tumor-Zelllinien von Patientinnen stammen, deren Tumoren sich in Merkmalen wie Histologie, Stadium der Erkrankung, Differenzierungsgrad und in der Herkunft der Zellen - aus

Aszites-Flüssigkeit bzw. soliden Tumoren - unterscheiden, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt (s. Abb. 4, S. 61). Dabei wurden die Zelllinien basierend auf Variationen in der Genexpression der 300 selektierten Gene gruppiert. So sollte untersucht werden, ob sich verschiedene Merkmale des Karzinoms wie Histologie, Stadium der Erkrankung, Differenzierungsgrad oder die Herkunft der Zellen in der Genregulierung widerspiegeln. Es konnten nur Unterschiede bezüglich der Herkunft der Zellen erkannt werden, wie es auch in anderen Clusteranalysen beschrieben wurde (Schaner et al., 2003). Zellen, die aus soliden Tumoren bzw. aus der Pleuralflüssigkeit isoliert wurden, wurden auch anhand der Deregulierung ihrer Gene zusammen gruppiert. Zellen, die aus der Aszitesflüssigkeit gewonnen wurden, zeigten dagegen kein separates Cluster, sondern bildeten zwei Gruppen, in denen jeweils eines der schon erwähnten Cluster enthalten war. Der Differenzierungsgrad, das Stadium bzw. die Histologie des Ursprungstumors spiegeln sich in der Gruppierung der Zelllinien nicht wider. Daraus lässt sich schließen, dass ein Markergen, welches über die gewählten Kriterien selektiert wurde, allgemein anwendbar ist, und nicht nur für einen bestimmten histologischen Subtyp bzw. Stadium epithelialer Ovarialtumoren dienen kann.

## **2. Identifizierung Tumor-assoziiertes Gene**

Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, deren Proteinprodukte zum einen die Tumorzellen des Eierstocks auf ihrer Oberfläche von normalen Epithelzellen unterscheiden und damit gezielte Moleküle für histologische Diagnostik bzw. eine Antikörper-basierende Antikrebs-Therapie darstellen, oder zum anderen von den Tumorzellen sezerniert werden und als Tumormarker dienen könnten. Deshalb wurden die Kriterien der Affymetrix-Analyse so festgelegt, dass in diesen Kategorien eine gewisse Auswahl an Genen identifiziert werden konnte, welche in der Mehrheit der getesteten Ovarialtumor-Zelllinien signifikant überexprimiert sind. In der Kategorie „Sezernierte Proteine“ wurden 13, in der Kategorie „Transmembran-Rezeptoren“ 31 überexprimierte Gene identifiziert (s. Tab. 11 und 12, S. 58 und S. 59). Die Zuverlässigkeit der Affymetrix-Analyse wurde in der Bestätigung von sieben ausgewählten Genen mittels semiquantitativer RT-PCR gezeigt (s. Abb. 7, S. 64-66). Die Deregulierung der Gene im Vergleich zu den IOSE-Zelllinien konnte in jedem Fall bestätigt werden. Die Stärke der Expression zeigte in einigen Fällen Abweichungen zwischen beiden Methoden. Diese resultieren möglicherweise aus der Wahl der Primer für die RT-PCR, welche im ORF der Gene gewählt wurden, bzw. der Oligonukleotid-Sequenzen auf dem Genchip, welche vorwiegend im 3'-untranslatierten Bereich der Gene gewählt und zum Nachweis der cDNA bzw. cRNA verwendet wurden. Zum anderen können auch durch unterschiedliche reverse Transkription mit poly-T-Primern bzw. Zufallshexamer-Primern leichte Schwankungen entstehen. Diese Unterschiede zeigen, dass eine stringente Auswahl der Gene in der Affymetrix-Analyse von entscheidender Bedeutung ist, um verlässliche Daten bezüglich einer

signifikanten Deregulierung von Genen zu filtern.

Einige der aufgelisteten Gene sind bereits im Zusammenhang mit Karzinomen des Ovars beschrieben worden, andere wurden zum ersten Mal in diesem Kontext identifiziert. Im Folgenden sind Gene aus den genannten Kategorien beschrieben, die bereits im Zusammenhang mit Ovarkarzinomen bekannt sind und in unserer Analyse als überexprimiert identifiziert worden sind. Anhand dieser Gene kann beurteilt werden, ob sich das verwendete Zelllinien-System eignet, um Gene zu identifizieren, deren Überexpression mit der Tumorgenese des Ovarkarzinoms verbunden ist. In den beiden folgenden Kapiteln werden diese Gene im Zusammenhang mit diesem Krankheitsbild diskutiert.

## 2.1 Bekannte sezernierte Ovarkarzinom-Antigene

In der Kategorie der sezernierten Proteine wurden folgende Gene bereits im Kontext mit Karzinomen des Ovars beschrieben.

Die Überexpression von verschiedenen IGF-Bindeproteinen (*Insulin-like Growth Factor*) in Karzinomen des Ovars, darunter auch IGFBP-2 (*IGF Binding Protein*) ist von Hofmann et al. beschrieben worden (1994). IGF-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Sie werden durch die IGFBP-Proteine, von denen bisher 6 verschiedene identifiziert wurden, reguliert. IGFBP-2 bewirkt einen inhibitorischen Effekt auf Zellwachstum und Proliferation in der Mehrheit der Gewebe, aber in einigen Tumorzellen, wie beispielsweise in adrenokortikalen Karzinomzellen und Prostatakrebszellen, konnte ein stimulatorischer Effekt nachgewiesen werden (Hoefflich et al., 2000; Moore et al., 2003). Kanety et al. zeigten, dass erhöhte IGFBP-2-Spiegel mit der Aggressivität von Ovarialtumoren korreliert (1996), und Baron-Hay et al. konnten nachweisen, dass der IGFBP-2-Spiegel von Patientinnen mit Ovarkarzinom schon zum Zeitpunkt der Diagnose erhöht ist und als prognostischer Marker dienen kann (2004).

HE4, das zuerst in epithelialen Zellen aus humanem Nebenhoden (*Human Epididymis*) entdeckt wurde und einer heterogenen Gruppe kleiner Säure- und Hitze-stabiler Proteine divergenter Funktion zugeschrieben wurde, wird in Ovarkarzinomen überexprimiert (Hough et al., 2001; Schummer et al., 1999). Hellström et al. identifizierten HE4 als möglichen diagnostischen Marker bei Ovarkarzinom-Patientinnen (2003). Die Funktion des Proteins ist bislang unbekannt.

Die Antileukoprotease SLPI, ein Inhibitor, der epitheliale Gewebe vor Serinproteasen schützt, ist stark überexprimiert in Karzinomen des Ovars und anderen epithelialen Tumoren (Hough et al., 2001; Shigemasa et al., 2001; Garver et al., 1994). Der Promotor dieses Gens enthält gewebespezifische regulatorische Sequenzen und ist in Tumorgewebe stark exprimiert, während seine Aktivität in normalem Gewebe deutlich reduziert ist. Dadurch ist dieser Promotor für den Einsatz in der Gentherapie von Ovarkarzinomen von besonderer Bedeutung (Barker et al., 2003). Einige proteolytische Systeme tragen über (anti-) adhäsive und migratorische Prozesse zur Tumorprogression und Metastasierung bei (s. auch Kap. I.4.2.1, S.20). Die Rolle von Protease-Inhibitoren bei diesen Vorgängen ist nicht eindeutig geklärt. Obwohl verschiedene Serinprotease-Inhibitoren das Tumorstadium und die Verbreitung der Tumorzellen verhindern können (Liotta et al., 2001), resultiert die Überexpression von anderen Mitgliedern dieser Enzymklasse in einer Verstärkung der Malignität (Bajou et al., 1998; Devoogdt et al., 2003; Suminami et al., 2001).

Midkine ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor, der in einer Vielzahl von menschlichen Tumoren, darunter auch in Ovarkarzinomen, überexprimiert ist. Midkine Antisense Oligonukleotide resultierten in verringerter Tumorigenese in Rektalkarzinomzellen der Maus *in vivo* (Takei et al., 2001). Der biologische Mechanismus ist noch nicht völlig geklärt, aber Ohuchida et al. beschrieben Midkine als antiapoptotischen Faktor, der TRAIL-vermittelte Apoptose über Herabregulierung von Caspase-3-Aktivität reguliert (2004).

Chow et al. beschrieben die Überexpression von TGF $\alpha$  (*Transforming Growth Factor*) in Karzinomen des Ovars (Chow et al., 1996). Der Phänotyp von unterschiedlichen malignen epithelialen Tumoren einschließlich Ovarkarzinomen ist mit der Aktivierung des EGFR/TGF $\alpha$ -Signalwegs (EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*) assoziiert, wodurch die Zelle mitogen stimuliert wird (Niikura et al., 1997). TGF $\alpha$ -exprimierende Ovarkarzinome zeigten in einer Studie hohe Ansprechraten auf Chemotherapeutika, während TGF $\alpha$ -negative Tumoren keine Änderung oder fortschreitenden Krankheitsverlauf nach Chemotherapie zeigten (Bauknecht et al., 1991).

Die Überexpression von Apolipoprotein E, das in die Lipid-Homöostase involviert ist, wurde durch SAGE-Analyse von Ovarkarzinomen identifiziert (Hough et al., 2001). Eine Funktion wurde noch nicht postuliert.

## 2.2 Bekannte membranständige Ovarkarzinom-Antigene

Unter den überexprimierten Transmembranrezeptoren wurde die Rezeptor-Tyrosinkinase HER3 (ERBB3), ein Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR) identifiziert. Die Funktion des HER3-Rezeptors in Ovarkarzinomen ist weniger gut definiert als die des HER2-Rezeptors, der zum Wachstum von Tumorzellen beiträgt und dessen Überexpression in Ovarkarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Slamon et al., 1989; Berchuck et al., 1990). Es wurde aber eine Korrelation der Überexpression von HER3 mit einer schlechten Prognose bei Patientinnen mit endometrioidem Karzinomen des Eierstocks beschrieben (Leng et al., 1997).

Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4) ist der einzige von 14 bekannten Chemokin-Rezeptoren, der in Ovartumorzellen exprimiert ist. Interaktion dieses Rezeptors mit seinem Liganden CXCL12 könnte die Migration von Tumorzellen in das Peritoneum beeinflussen und damit ein Angriffsziel in der Bekämpfung der Dissemination von Tumorzellen darstellen (Scotton et al., 2001, Scotton et al., 2002).

Claudin-3 und Claudin-4, sogenannte Tight Junction-Proteine, die stabile Zell-Zell-Kontakte ausbilden und durch diese physikalischen Barrieren den parazellulären Transport regulieren, sind häufig in Ovarkarzinomen überexprimiert (Schummer et al., 1999; Hough et al., 2000; Shridhar et al., 2001; Ismail et al., 2000; Sawiris et al., 2002). Ihre Funktion in bösartigen Tumoren ist aber bislang ungeklärt (Rangel et al., 2003).

Ep-CAM (TACSTD1), ein Transmembranrezeptor, der homophile Zelladhäsion vermittelt, ist in Ovarkarzinomen und vielen Karzinomen anderen Ursprungs überexprimiert (Hough et al., 2001; Balzar et al., 1999). Ep-CAM ist in Signalwege der Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert und fördert Invasion und Metastasierung (Gumbiner, 1996; Litvinov et al., 1997; Balzar et al., 1999). Ep-CAM Autoantikörper sind in Seren von Ovarkarzinom-Patientinnen verglichen mit Seren von Patientinnen mit gutartigen gynäkologischen Krankheiten und gesunden Frauen erhöht, was Ep-CAM als Tumormarker indiziert (Kim et al., 2003). Inzwischen ist Ep-CAM ein klinisch validiertes Zielmolekül für Antikörper-basierende Krebstherapie (Schwartzberg, 2001).

Mucin-1 ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein, das in Karzinomen des Ovars überexprimiert wird und die Metastasierung beeinflusst (Dong et al., 1997; Hough et al., 2000). Eine hohe Expression von Mucin-1 trägt zu einer schlechten Prognose bei diesem Krankheitsbild bei (Dong et al., 1997;

Feng et al., 2002). In Mamma- und Kolon-Karzinomen korreliert die Mucin-1-Expression mit fortgeschrittenem Erkrankungs-Stadium (McGuckin et al., 1995 ; Hanson et al., 2001; Nakamori et al., 1994).

Die Expression von E-Cadherin in Tumorzellen wird in der Literatur widersprüchlich beschrieben. E-Cadherin-Expression ist in vielen Epithelgeweben zu finden, aber seine Expression ist sehr niedrig oder abwesend in undifferenzierten und invasiven Tumorzellen, was eine mögliche Funktion als Tumorsuppressor anzeigt (Birchmeier et al., 1991; Okegawa et al., 2002). Zellen aus dem Oberflächen-Epithel des Ovars (OSE, *Ovarian Surface Epithelium*) zeigen keine oder eine sehr schwache Expression von E-Cadherin (Maines-Bandiera und Auersperg, 1997). In Ovarkarzinomen wurde aber eine starke Expression von E-Cadherin nachgewiesen, welche durch die Aufrechterhaltung von epithelialen Eigenschaften der Tumorzellen erklärt werden könnte (Sundfeldt et al., 1997). Ein Wechsel zwischen Hoch- und Herab-Regulierung der E-Cadherin-Expression könnte die Proliferation und wiederholte Invasion von Tumorzellen fördern (Sundfeldt, 2003).

Die Rezeptor-Tyrosinkinase DDR1 (*Discoidin Domain Receptor*) wurde erstmals aus einer cDNA-Bank isoliert, welche aus einer epithelialen Ovar tumor-Zelllinie (SKOV-3) generiert wurde. DDR1 war in dieser im Vergleich zu normalem Ovargewebe, gutartigen und Borderline Tumoren überexprimiert (Laval et al., 1994) und wurde als möglicher Tumormarker in CNS-Tumoren beschrieben (Weiner et al., 2000). Zudem wurde DDR1 als wichtiger Regulator der Proliferation in Karzinomen des Oesophagus identifiziert (Nemoto et al., 1997).

Die Überexpression des TGFbeta3-Rezeptors ist widersprüchlich beschrieben, da TGFbeta-Rezeptoren auf Ovar tumor-Zellen einen direkten inhibitorischen Effekt zeigten (Jakowlew et al., 1997). Die Expression des TGFbeta3-Rezeptors scheint aber das Fortschreiten des Tumors zu verstärken, korreliert mit fortgeschrittenem Stadium und senkte die Überlebensrate von Patientinnen mit TGFbeta3-positivem Ovar tumor (Bartlett et al., 1997).

Die Überexpression der Rezeptor-Tyrosinkinase FGFR2 in Ovarkarzinomen in Vergleich zu normalem Oberflächenepithel ist von Steele et al. beschrieben worden (2001) und ist im Zusammenhang mit dem komplexen epithelialen Phänotyp diskutiert worden, welchen Ovarkarzinome beibehalten (Maines-Bandiera und Auersperg, 1997; Sundfeldt et al., 1997).

### 2.3 Ausgewählte Kandidatengene

Für die Auswahl der Kandidatengene erschienen die Gene besonders interessant, die möglicherweise zur Malignität der Tumorzellen beitragen. Bei den ausgewählten Genen handelt es sich zum einen um ein sezerniertes Neuropeptid und zum anderen um zwei Transmembranrezeptoren, welche selbst noch nicht mit Ovarkarzinom in Verbindung gebracht wurden, die aber in ihrer Genfamilie Mitglieder haben, denen eine Funktion in Tumorzellen zugeschrieben wird.

NMU ist ein sezerniertes aus 25 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, das von einem größeren Vorläufer-Peptid gespalten wird (Minamino et al., 1988). NMU ist an der Kontraktion der glatten Muskulatur und der Steigerung des Blutdrucks beteiligt (Minamino et al., 1985; Chu et al., 2002). Außerdem ist bekannt, dass das Peptid den Ionentransport im Magen modifiziert und dadurch möglicherweise über die Regulation der sekretorischen Funktion an der Aufrechterhaltung der Mukosa beteiligt ist (Brown und Quito, 1988; Hedrick et al., 2000). Zudem unterdrückt NMU die Nahrungsaufnahme bei Ratten (Howard et al., 2000) und induziert die Freisetzung von Stressvermittelnden Molekülen wie adrenokortikotropes Hormonen (ACTH) und Kortikosteronen (Hanada et al., 2001; Wren et al., 2002). NMU ist der Ligand für zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: NMU1R (FM-3), der in peripheren Geweben exprimiert wird, und NMU2R (FM-4), der in spezifischen Regionen des Gehirns exprimiert wird (Howard et al., 2000; Fujii et al., 2000; Szekeres et al., 2000; Kojima et al., 2000). Einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind an der Regulation der Zellproliferation beteiligt und führen durch chronische Stimulierung oder konstitutive Aktivierung bedingt durch Mutationen zu onkogener Transformation (Whitehead et al., 2001). Verschiedene Mitglieder von Neuropeptid-Familien wie Bombesin-verwandte Peptide, Gastrin oder Neurotensin sind als Wachstumsfaktoren in die Tumorgenese involviert. Autokrine und parakrine Effekte von Neuropeptiden sind in Lungen-, Magen-, Kolorektal-, Pankreas- und Prostatakrebs beschrieben (Chave et al., 2000; Heasley, 2001; Moody et al., 2003; Reubi, 2003).

JAG2 ist ein Mitglied der DSL(*Delta-Serrate-Lag-2*)-Familie membranständiger Liganden, welche Signalwege über Notch-Rezeptoren regulieren. Die extrazelluläre Domäne dieser Liganden enthält eine konservierte sogenannte DSL-Domäne, die für die Bindung an Notch essentiell ist (Luo et al., 1997). Notch-vermittelte Signalwege sind an vielen essentiellen zellulären Vorgängen wie Wachstum, Differenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt und sind auch bei einigen Krebsarten von Bedeutung (Baron, 2003). Konstitutiv aktive Formen von Notch sind mit Leukämie beim Menschen und epithelialen Tumoren bei Mäusen assoziiert (Aster und Pear, 2001; Jhappan et al., 1992). Komponenten des Notch-Signalweges sind bei Zervix-Karzinomen hochreguliert



(Zagouras et al., 1995). Verkürzte Formen von Notch-Rezeptoren vermitteln transformierende Aktivität *in vitro* und *in vivo* (Capobianco et al., 1997). JAG1 und JAG2 werden durch die Mitglieder der p53-Genfamilie p63 und p73 hochreguliert (Sasaki et al., 2002). JAG2 wurde bislang noch nicht im Zusammenhang mit Krebs beschrieben. Die Aktivierung des JAG2/Notch-Signalwegs induziert kontinuierlichen Zellzyklus in konfluenten Fibroblasten von Kaninchen, welche für Dichte-abhängige Inhibierung des Zellzyklus sensitiv sind (Cereseto und Tsai, 2000).

Das dritte Kandidatengen kodiert für das Zelladhäsionsmolekül L1CAM, das ein 200-220 Typ I-membranständiges Glykoprotein der Immunglobulin-Super-Familie ist. Es ist aus sechs Amino-terminalen Ig-Domänen, gefolgt von fünf Fibronectin-Typ III-ähnlichen Domänen, einer Transmembran-Region und einer zytoplasmatischen Domäne aufgebaut (Hortsch, 1996). In neuronalen Zellen ist es an diversen Prozessen beteiligt wie Migration, Myelinisierung, und Axon-Wachstum (Brummendorf et al., 1998; Hortsch, 1996). Die Bedeutung von L1CAM bei der Entwicklung des Nervensystems wird durch schwere neurologische Defekte untermauert, die auf Mutationen des L1CAM-Gens zurückzuführen sind (Weller und Gartner, 2001).

L1CAM wurde zuerst im Nervensystem charakterisiert und wurde dort besonders intensiv untersucht. Seine Expression wurde aber auch in blutbildenden und bestimmten epithelialen Zellen (Kowitz et al., 1992; Ebeling et al., 1996; Pancook et al., 1997; Debiec et al., 1998), sowie in einer Reihe von humanen Tumorzelllinien wie Neuroblastome, Melanome und Karzinome der Lunge nachgewiesen (Linnemann und Bock, 1989; Patel et al., 1991; Reid und Hemperly, 1992; Katayama et al., 1997). L1CAM vermittelt Zell-Zell-Adhäsion durch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige homophile Interaktion der Amino-terminalen Ig-Domänen des Proteins (Hall et al., 1997; Jacob et al., 2002), bindet aber auch heterophil an andere Adhäsionsmoleküle wie N-CAM (Kadmon et al., 1990), TAG-1/axonin (Kuhn et al., 1991) oder Integrine (Kadmon und Altevogt, 1997).

Neben der Lokalisation auf der Zelloberfläche kann L1CAM durch Spaltung als lösliches Molekül freigesetzt werden (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000). Die Spaltstelle der Matrix-Metalloprotease ADAM10 befindet sich im Bereich nahe der Zellmembran und führt zu einem aminoterminalen Fragment von 180 kD und einem Membran-assoziierten 30 kD-Fragment (Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001). Durch diese Spaltung wird Integrin-vermittelte Zelladhäsion gefördert und Migration auf Fibronectin und Laminin durch Bindung des löslichen L1CAMs an  $\alpha\beta_5$ -Integrine stimuliert (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001). Eine weitere Spaltstelle wird von der Serin-Protease Plasmin erkannt und befindet sich in der dritten FNIII-ähnlichen Domäne. Spaltung führt zu einem löslichen 140 kD und einem membranständigen Fragment von 85 kD. Dadurch werden Zell-Zell-Kontakte, vermittelt durch homophile Bindung von L1CAM, aufgelöst (Nayeem et al., 1999).

## 2.4 mRNA-Expression der Kandidatengene in Tumorgewebeproben des Ovars

Zelllinien behalten zwar die Transkriptionsprofile ihres ursprünglichen Gewebes weitgehend bei, zeigen aber aufgrund der veränderten Umgebung in Kultur gewisse Variationen in der Genexpression (Liotta und Kohn, 2003; Hampton und Frierson, 2003). Aus diesem Grund wurde die Expression der drei Kandidatengene auf RNA-Ebene in 38 humanen Gewebeproben von Ovarkarzinomen untersucht (s. Abb. 9, S. 68). Als Kontrolle wurde RNA verwendet, die aus normalem Gewebe des Ovars isoliert wurde. Es konnte eine signifikante Überexpression von NMU (24/38), JAG2 (25/38) und L1CAM (16/38) festgestellt werden. Die Deregulierung der getesteten Gene, welche im Zelllinien-System ermittelt wurde, konnte also auf RNA aus Tumorgewebeproben erweitert werden.

## 2.5 Studien zur Expression des L1CAM-Moleküls

Obwohl die Messung der mRNA eine etablierte Methode zur Identifizierung neuer molekularer Marker darstellt, korreliert mRNA-Abundanz nicht zwangsläufig mit Protein-Abundanz (Anderson und Seilhamer, 1997; Griffin et al., 2002; Chen et al., 2002). Zudem kann aufgrund der Überexpression der mRNA-Sequenz nicht vorhergesagt werden, ob die subzelluläre Lokalisierung des Proteins korrekt erfolgt (Griffin et al., 2002). Der Nachweis des Proteins und seiner Lokalisierung ist deswegen erforderlich.

Die Antikörper für NMU und JAG2 zeigten keine ausreichende Spezifität in Ovartumorzelllysaten bzw. -überständen und waren aus diesem Grund für weitere Untersuchungen in Gewebeproben bzw. Patientenseren ungeeignet. Die Spezifität des verwendeten L1CAM-Antikörpers UJ127 konnte in der Ovartumor-Zelllinie GG mittels Westernblot-Analyse gezeigt werden (s. Abb. 11, S. 71). Die Deregulierung und Lokalisierung des L1CAM-Proteins in den Zelllinien GG und IOSE 144 wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (s. Abb. 12, S. 72). In diesem Vergleich korrelierte die deutliche Überexpression von L1CAM in der Zelllinie GG mit der zuvor festgestellten mRNA-Abundanz des L1CAM-Transkripts in der Ovartumor-Zelllinie. Die Lokalisierung war eindeutig in der Plasmamembran zu erkennen. In Zytoplasma war eine schwache Fluoreszenzfärbung zu sehen, die aber aufgrund des verwendeten nicht-konfokalen Fluoreszenzmikroskops nicht eindeutig als zytoplasmatisch identifiziert werden konnte, da die starke Fluoreszenz der Plasmamembran durch mehrere Ebenen hindurch sichtbar sein kann.

Die Expression des L1CAM-Moleküls wurde anschließend immunhistochemisch in Paraffinschnitten humaner Gewebeproben des Ovars untersucht. Auch im Tumorgewebe war die Expression des Moleküls auf der Plasmamembran der Tumorzellen nachzuweisen. In epithelialen Zellen eines Paraffinschnitts von normalem Ovargewebe war keine Expression von L1CAM

nachzuweisen (s. Abb. 13, S. 73). Da das Molekül auch in hämatopoietischen Zellen exprimiert wird, zeigten die Blutgefäße L1CAM-Färbung (Pancook et al., 1997).

Um die Expression von L1CAM in verschiedenen Tumoren des Ovars zu untersuchen, wurde zunächst ein Tumorgewebe-Array getestet, auf dem 58 Ovartumormproben vertreten waren (s. Tab. 13, S. 74). Diese wurden in epitheliale und nicht-epitheliale Tumoren eingeordnet, da epitheliale Tumoren den Hauptteil der malignen Tumoren des Ovars ausmachen und deswegen in dieser Arbeit im Vordergrund stehen. Unter den Karzinomen wurden die Borderline-Tumoren aufgrund ihres geringen malignen Potenzials gesondert betrachtet. Auf dem Array waren auch vier Metastasen vertreten, die L1CAM-negativ waren. In malignen Tumoren nicht epithelialen Ursprungs war L1CAM nicht nachweisbar. Der Gewebe-Array enthielt vier Gewebeschnitte von Fibromen, von denen zwei L1CAM-Färbung aufwiesen.

L1CAM war in der Mehrheit der getesteten Karzinome exprimiert (63 %). In den acht Borderline-Tumoren war keine L1CAM-Expression nachweisbar. Borderline-Tumoren haben eine sehr gute Prognose und entwickeln sich nur in ca. 2 % zu malignen Karzinomen (Zanetta et al., 2001). Deshalb ist die L1CAM-Expression in dieser Sonderform der epithelialen Tumoren sowohl in Bezug auf L1CAM als prognostischer oder diagnostischer Marker, als auch in Bezug auf eine mögliche Funktion bei der Tumorgenese oder Progression gesondert zu erwähnen.

Nach der Analyse des Tumorgewebe-Arrays wurden die Untersuchungen auf Gewebeschnitte von 22 Ovarkarzinomen und 17 Borderline-Tumoren des Ovars ausgeweitet, um zu klären, ob L1CAM möglicherweise als Marker zur Abgrenzung der Borderline-Tumoren von den Ovarkarzinomen dienen könnte (s. Tab. 15, S. 77). Da sich die Therapie dieser Sonderform zwischen gut- und bösartigen Tumoren von derjenigen der Karzinome unterscheidet, könnte ein Marker zur Abgrenzung hilfreich sein, welche bis jetzt nicht eindeutig zu vollziehen ist. In dieser Analyse konnte aber gezeigt werden, dass L1CAM auch in Borderline-Tumoren nachweisbar ist (5/17), wenn auch in geringerem Maß als in den getesteten Karzinomen (16/22). In den Borderline-Tumoren, welche auf dem Gewebe-Array analysiert wurden, war keine L1CAM-Expression nachzuweisen. Möglicherweise ist das darauf zurückzuführen, dass die Tumorausschnitte mit 2 mm Durchmesser wesentlich kleiner sind als die Gewebeschnitte durch den gesamten Tumor (1 - 2 cm Durchmesser). Auch die Anzahl an positiven Karzinomen war in den einzelnen Gewebeschnitten mit 74 % etwas höher als in den Proben auf dem Gewebe-Array (63 %), was aus den gleichen Gründen resultieren kann.

Fogel et al. zeigten zeitgleich zu unseren IHC-Analysen, dass L1CAM in Karzinomen des Ovars und des Uterus überexprimiert ist und mit kurzer Überlebenszeit korreliert (2003). L1CAM-positive Tumoren des Uterus waren assoziiert mit hohem Risiko des Fortschreitens der Erkrankung sogar in Tumorarten, die normalerweise eine gute Prognose haben. In der genannten Studie konnte L1CAM in gutartigen Tumoren, nicht epithelialen bösartigen Tumoren und in gesundem Gewebeproben des Ovars nicht nachgewiesen werden. Zudem fanden Fogel et al. heraus, dass L1CAM-Expression bei Patientinnen mit Adenokarzinomen des Endometriums im frühen Stadium, denen üblicherweise eine sehr gute Prognose erstellt wird, mit einem Rezidiv und kurzer Überlebenszeit korrelierte (2004). Da in der vorliegenden Arbeit zu den getesteten Gewebeproben keine Daten zur Patientengeschichte verfügbar waren, konnte keine Korrelation zwischen L1CAM-Expression und dem Verlauf der Erkrankung ermittelt werden. Die Ergebnisse der Studie von Fogel et al. bestätigten nicht nur die Überexpression von L1CAM in Karzinomen des Ovars, sondern zeigen L1CAM als Marker mit prognostischem Wert in verschiedenen gynäkologischen Tumoren. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass L1CAM auch in Borderline-Tumoren exprimiert wird. Möglicherweise kann L1CAM auch bei Borderline-Tumoren als diagnostischer Marker für seltene invasive Varianten dienen. Eine erweiterte Studie mit Tumorproben von Borderline-Tumoren mit Daten zur Patientengeschichte könnte den prognostischen Wert von L1CAM-Expression auf diese Sonderform von epithelialen Tumoren ausweiten. Unter den getesteten nicht-epithelialen Tumoren auf dem Gewebe-Array war in zwei von vier Fibromen L1CAM-Protein nachweisbar. Da sich die L1CAM-Expression in allen übrigen getesteten Paraffinschnitten auf die epithelialen Zellen beschränkte, war die Expression in den Stromazellen unerwartet. Fogel et al. konnten keine L1CAM-Expression in gutartigen Tumoren feststellen (2003). Allerdings geht aus ihren Daten nicht hervor, welche Histologie diese Tumoren aufwiesen. Obwohl Fibrome zu den gutartigen Tumoren zählen, sind 10 – 15 % aller Ovarfibrome, die größer als 10 cm sind, von Aszites oder Pleuralerguss begleitet (Spinelli et al., 1999; Pfeleiderer, 2002). Die Ursache dieses sogenannten Meigs-Syndroms ist unbekannt. Erhöhte Serumspiegel des Tumormarkers CA125 korrelieren zwar stark mit malignen Erkrankungen des Ovars, sind aber auch beim Meigs-Syndrom beschrieben worden (Timmerman et al., 1995). Möglicherweise bildet auch L1CAM hier eine Ausnahme, deren Ursache noch unbekannt ist. Auch hier können erweiterte Untersuchungen mit ausführlichen Patientendaten der Tumorproben mögliche Zusammenhänge von L1CAM mit Symptomen bösartiger Tumorerkrankungen wie der Aszitesbildung klären.

### 3. *In vitro* Untersuchungen zum Einfluß der ektopisch exprimierten Isoform L1CAM $_{\Delta 2,27}$ auf Ovar tumor-Zellen

Proteine, welche in Tumoren überexprimiert sind, müssen nicht unbedingt eine Rolle bei der Entstehung oder Progression des Tumors einnehmen. Durch die Anhäufung von Mutationen und wachsender Instabilität des Genoms im Prozess der Tumorentstehung und -progression entstehen zahlreiche Veränderungen in der Genexpression, die nur teilweise zum malignen Phänotyp der entarteten Zellen beitragen. Da sich L1CAM als neuer Biomarker für eine schlechte Prognose bei Karzinomen des Uterus, Endometriums und Ovars erwiesen hat (Fogel et al., 2003; Fogel et al., 2004), stellt sich die Frage, ob L1CAM zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen kann.

L1CAM ist als Vermittler von Zelladhäsion und Migration in Neuronen, aber auch in Melanomzellen beschrieben (Hortsch, 1996; Montgomery et al., 1996). Gerade bei der Entwicklung von Karzinomen des Ovars spielt die Adhäsion und Invasion der Tumorzellen im Bauchraum, die häufigste Art der Metastasierung, eine entscheidende Rolle. Die verstärkte Expression von L1CAM in Tumorzellen des Ovars könnte also den malignen Zellen einen Vorteil bei der Ausbreitung der Krankheit bieten. Vergleichende Untersuchungen einer stabil L1CAM-transfizierten Ovar tumor-Zelllinie, die eine sehr schwache endogene L1CAM-Expression zeigt, mit Vektor-Transfektanten könnten Aufschluss darüber geben, ob L1CAM bei diesen Prozessen eine Rolle spielt.

Bei der Klonierung von L1CAM stellte sich durch Sequenzierung der Konstrukte heraus, dass nur eine bestimmte Isoform von L1CAM aus den Ovar tumor-Zelllinien isoliert werden konnte, in der die Exons 2 und 27 alternativ gespleißt werden (s. Abb. 18 und 19, S. 81). Verschiedene Isoformen von L1CAM wurden zum ersten Mal von Miura et al. (1991) und Harper et al. (1991) beschrieben. Neben der kompletten Form von L1CAM (L1CAM<sub>FL</sub>) wurde eine Isoform des Moleküls entdeckt, der vier Aminosäuren in der zytoplasmatischen Domäne fehlen. Während diese Isoform in Zellen des peripheren Nervensystems und einer Melanomzelllinie gefunden wurde, wurde die Expression des Exon 27, das für die vier Aminosäuren kodiert (RSLE) als Neuronen-spezifisch beschrieben (Miura et al., 1991; Harper et al., 1991; Reid und Hemperly, 1992). Jouet et al. entdeckten in B-Zellen eine weitere Isoform von L1CAM, in der zusätzlich zu Exon 27 auch Exon 2 deletiert war, das für fünf Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Moleküls kodiert (YEGHH) (1995). Diese Variante wird exklusiv auch in renalen Karzinomzellen sowie in nicht-neuronalen Zellen wie Astrozyten, Schwannschen Zellen und Oligodendrozyten exprimiert (Meli et al., 1999; Takeda et al., 1996). Die Anwesenheit von Exon 2 führt zu einem YEGHHV-Motiv anstelle eines Leucin-Rests im N-terminalen Bereich vor der ersten Ig-Domäne (s. Abb. 19, S. 81). L1CAM $_{\Delta 2}$  bildet keine homophilen Bindungen aus, bindet nur schwach an L1CAM<sub>FL</sub> und zeigt eine signifikant reduzierte homophile Bindung zu TAX-1/TAG-1/Axonin und Contactin/F3/F11 (De Angelis et al.,

2001; Jacob et al., 2002). Da in Mutationsanalysen des YEGHHV-Motivs keine Effekt auf das Bindungsverhalten beobachtet werden konnte, scheint es wahrscheinlicher, dass dieses Motiv die Hufeisen-Struktur, die zwischen den Ig-Domänen 4 und 5 liegt, stabilisiert. Die Region, die vor der IG-Domäne 1 liegt und das YEGHHV-Motif enthält, wird in Nachbarschaft zur Verbindung der Ig-Domänen 4 und 5 vermutet (De Angelis et al., 2001; Su et al., 1998).

Die Präsenz des Exon 27 erzeugt die Sequenz YRSL, die von dem Clathrin-assoziierten Adaptor-Molekül AP-2 erkannt wird und zur Clathrin-vermittelten Endozytose von L1CAM<sub>FL</sub>, aber nicht von L1CAM<sub>Δ27</sub> führt (Kamiguchi und Lemmon, 1998). Das zeigt Auswirkungen auf die Zell-Zell-Adhäsion von L1CAM-exprimierenden Zellen, da L1CAM<sub>FL</sub> bei homophiler Bindung internalisiert wird und die Zell-Zell-Adhäsion dadurch vermindert wird (Long et al., 2001). Außer dem Binde-Motiv von AP-2 erzeugt Exon 27 die Tyrosin-Phosphorylierungsstelle YRSL in L1CAM<sub>FL</sub> (Wong et al., 1996). Clathrin-vermittelte L1CAM<sub>FL</sub>-Endozytose kann durch Phosphorylierung von Tyr1176 im YRSL-Motiv verhindert werden (Long et al., 2001). Neben der Zell-Zell-Adhäsion hat Exon 27 auch Auswirkungen auf die Migration von L1CAM. L1CAM<sub>Δ27</sub>-transfizierte Zellen zeigen eine geringere Migration auf Laminin als L1CAM<sub>FL</sub>-transfizierte Zellen (Takeda et al., 1996). Der genaue Mechanismus der Migration durch L1CAM ist nicht bekannt, aber Interaktionen der zytoplasmatischen Domäne von L1CAM mit Proteinen des Zytoskeletts spielen dabei eine Rolle. Eine Phosphorylierung der RSLE-Sequenz könnte auch hier Interaktionen mit Proteinen des Zytoskeletts und damit die Migration regulieren (Takeda et al., 1996).

### **3.1 Einfluß stabiler L1CAM<sub>Δ2,27</sub>-Expression auf die Adhäsionsfähigkeit**

Die extrazelluläre Matrix ist aus zwei Kompartimenten zusammengesetzt. Die Basalmembran, die Epithel- und Endothelzellen vom interstitiellen Bindegewebe trennt, besteht vorwiegend aus Kollagen Typ IV, Laminin, Perlecan und Entactin. Das interstitielle Bindegewebe ist hauptsächlich aus Kollagenen (Typ I und III), Fibronectin, Elastin, Proteoglykanen und Hyaluronsäure aufgebaut. Die Adhäsionsfähigkeit an fünf verschiedene Substrate aus beiden Kompartimenten von fünf L1CAM<sub>Δ2,27</sub>-exprimierenden Klonen wurde mit der von drei Vektor-Transfektanten verglichen (s. Abb. 22, S. 85-87). Die Bindung von neuronalem L1CAM über die Ig-Domänen an Laminin wurde von Hall et al. demonstriert (1997). Diese Bindung könnte in der Isoform L1CAM<sub>Δ2,27</sub> verändert sein, da durch die Deletion des Exons 2 das Bindungsverhalten des Moleküls modifiziert ist (De Angelis et al., 2001; Jacob et al., 2002). Es zeigten ca. 10 - 20 % der Transfektanten Adhäsion an Laminin in Vergleich zu ca. 5 % bei den Vektor-transfizierten Zellen. Verglichen mit der Adhäsion an weitere Substrate der EZM wie Kollagen I und IV, Fibronectin und Vitronectin, bei denen keine deutliche Veränderung der Adhäsion festgestellt werden konnte, war die Adhäsionsrate relativ gering. Da die Adhäsion der Vektor-Transfektanten an die anderen vier Substraten mit ca. 30 – 60

% insgesamt höher war, ist ein zusätzlicher Effekt von L1CAM $_{\Delta 2,27}$  hier eventuell nicht mehr eindeutig nachweisbar. Ob die Adhäsion an Laminin bei der Dissemination der Ovar tumor-Zellen im Bauchraum eine Rolle spielt, kann aber nur *in vivo* eindeutig bestimmt werden, da L1CAM durch viele äußere Einflüsse sein Adhäsionsverhalten ändern kann, wie die Regulation der Internalisierung (Long et al., 2001) und die Abspaltung der extrazellulären Domäne durch Plasmin und Metalloproteinasen gezeigt hat (Nayeem et al., 1999; Gutwein et al., 2000).

### 3.2 Einfluß stabiler L1CAM-Expression auf die Invasionsfähigkeit

Die Interaktion von Tumorzellen mit Laminin ist ein Schlüsselereignis bei Tumorinvasion und Metastasierung (Menard et al., 1997; Malinda und Kleinman, 1996; Pupa et al., 2002). Einer der Mechanismen, durch die Laminin zur Invasivität und metastatischen Verbreitung beiträgt, ist die Induktion proteolytischer Aktivität. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass L1CAM $_{\Delta 2,27}$  Adhäsion an Laminin vermittelt (s. Abb. 22, S. 87). Um zu ermitteln, ob durch die Interaktion der L1CAM $_{\Delta 2,27}$ -Transfektanten mit Laminin ein erhöhtes invasives Potential resultiert, wurden die Transfektanten auf ihr Invasionspotential im Matrigel-Assay getestet (s. Abb. 23, S. 88). Matrigel besteht aus den Hauptkomponenten der Basalmembran wie Laminin, Entaktin, Heparan-Sulfat-Proteoglykan (Perlekan) und Kollagen IV (Kleinman et al., 1986). Wenn die Bindung von L1CAM $_{\Delta 2,27}$  an Laminin oder an eine andere Komponente im Matrigel die Aktivität von Proteasen verstärkt, sollte dies durch eine erhöhte Invasion der L1CAM $_{\Delta 2,27}$ -Transfektanten im Vergleich zu dem Vektor-Transfektanten nachzuweisen sein. Dieser Effekt konnte aber nicht beobachtet werden. Auch die Motilität, die sowohl bei der Invasion, als auch bei der Migration eine große Rolle spielt, war in den Transfektanten im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen unverändert. Die Expression von L1CAM $_{\Delta 2,27}$  reicht also nicht aus, um einen invasiven Phänotyp in OV-MZ-2-Zellen zu erzeugen.

## 4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei potentiellen Ovar tumorantigene NMU, JAG2 und L1CAM identifiziert. Weitere Analysen zur Proteinexpression von JAG2 in Tumorgewebeproben und NMU in Patientenserum bzw. im Urin sind nötig, um deren Potenzial als Tumormarker zu belegen. Auch ihre Funktion in Tumorzellen muss in ausführlichen Studien näher charakterisiert werden, um eine mögliche therapeutische Anwendung postulieren zu können.

Da schon für einige Neuropeptide gezeigt wurde, dass sie über autokrine Schleifen die Zellproliferation fördern (Heasley, 2001), könnte auch NMU möglicherweise auf diese Art das Wachstum der Tumorzellen fördern. Dazu müsste gezeigt werden, dass einer der beiden Rezeptoren für diesen Liganden auf der Oberfläche der Zellen nachweisbar ist. Da diese Rezeptoren (NMU1R/FM-3, NMU2R/FM-4) erst kürzlich identifiziert wurden (Howard et al., 2000; Fujii et al., 2000), waren sie nicht auf dem analysierten Genchip enthalten. Außerdem sind die Signalwege, die NMU über die Rezeptoren beeinflusst, weitgehend unbekannt. Ob NMU einen wachstumsstimulierenden Einfluss auf Zellen ausübt, die einen NMU-Rezeptor exprimieren, könnte in vergleichenden Studien mit NMU-Rezeptor-positiven bzw. -negativen Zellen getestet werden. Da NMU über die Freisetzung des Kortikotropin-freisetzendem Hormons (CRH, *Corticotropin Releasing Hormon*) die Nahrungsaufnahme beeinflusst (Wren et al., 2002; Hanada et al., 2003), könnte seine erhöhte Sezernierung aus Tumorzellen Auswirkungen auf den Allgemeinzustand der Patientinnen haben. Derartige Zusammenhänge könnten durch eine entsprechende Anamnese in Korrelation mit der NMU-Expression des Tumorgewebes ermittelt werden.

Die Funktion von JAG2 im Notch-Signalweg ist noch nicht ausführlich untersucht worden. Cereseto und Tsai konnten zeigen, dass ektopische Expression von JAG2 in Fibroblasten von Kaninchen keinen Einfluss auf die Wachstumsrate oder den Zellzyklus in exponentiell wachsenden Zellen ausübt (Cereseto und Tsai, 2000). Erst in konfluenten Kulturen induziert JAG2 über den Notch-Signalweg einen kontinuierlichen Zellzyklus und hebt die Dichte-abhängige Inhibierung auf. Da der Verlust dieses Kontrollmechanismus oft in transformierten Zellen festgestellt wird, könnte die Aktivierung des JAG2/Notch-Signalwegs die neoplastische Transformation fördern (Cereseto und Tsai, 2000). JAG2 ist von Luo et al. als Ligand für Notch1 identifiziert worden (1997). Wenn die Expression dieses Rezeptors, der nicht auf dem Genchip repräsentiert war, auf den Ovar tumorzellen nachgewiesen werden kann, könnten die Zellen möglicherweise über eine autokrine Schleife die Dichte-abhängige Inhibierung überwinden. Der Notch3-Rezeptor konnte mit dem Genchip erfasst werden und war in sechs der elf verwendeten Zelllinien signifikant überexprimiert ( $\text{CHGF} \geq 2$ ). Möglicherweise kann JAG2 auch über Notch3-Signalwege induzieren



und den Tumorzellen einen proliferativen Vorteil vermitteln. Ikeuchi und Sisodia beschrieben 2003, dass JAG2 intramembranös von Presenilin-abhängiger  $\gamma$ -Sekretase gespalten werden kann und das resultierende zytosolische Fragment im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirken kann. Dadurch könnte dieses Molekül sowohl als Ligand als auch als Rezeptor Signalwege beeinflussen. Die Effekte und genauen Mechanismen dieses Spaltprodukts von JAG2 sind aber noch nicht erforscht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit den Erkenntnissen von Fogel et al. zeigen, dass L1CAM in Karzinomen des Ovars überexprimiert ist und mit einer schlechten Prognose korreliert (2003). Die Überexpression von Zelladhäsionsmolekülen in malignen Tumoren wird kontrovers diskutiert. Um sich vom *Karzinoma in situ* abzulösen müssen Tumorzellen den Zell-Zellkontakt unterbrechen. Damit sich diese Zellen in anderer Stelle wieder anheften können, um dort eventuell eine Metastase durch invasives Wachstum auszubilden, müssen sie in der Lage sein, an Komponenten der EZM zu binden. Gerade beim Ovarkarzinom ist aufgrund der freien Lage des Ovars in der Bauchhöhle die Dissemination im Bauchraum für die Tumorprogression von entscheidender Bedeutung. E-Cadherin beispielweise gilt als Tumorsuppressor, da es den Zell-Zellkontakt verstärkt und in invasiven Tumoren häufig herabreguliert ist (Sundfeldt, 2003). Die Korrelation des Zelladhäsions-Moleküls L1CAM mit dem Fortschreiten des Ovarkarzinoms ist möglicherweise mit der Überexpression der Isoform L1CAM $\Delta_{2,27}$  zu erklären, die keine homotypische Bindung eingeht (Jacob et al., 2002). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist diese Isoform jedoch in der Lage, Adhäsion an Laminin, eine Komponente der Basalmembran, zu vermitteln. Das durch die ektopische Expression von L1CAM $\Delta_{2,27}$  die Invasionsfähigkeit der Transfektanten nicht erhöht wurde, kann mit dem *in vitro*-Experiment zusammenhängen. Für die Invasionsfähigkeit ist die Induktion von Proteasen entscheidend. Diese werden in vielen Fällen von den benachbarten Stromazellen durch Induktion der Tumorzellen produziert (Coussens und Werb, 1996), so dass ein *in vitro*-Versuch diese Möglichkeit nicht erfasst.

L1CAM unterliegt aufgrund seiner vielfältigen Aufgaben einer sehr komplexen Regulierung. So kann die Anwesenheit der extrazellulären Domäne auf der Zelloberfläche durch Änderung der Expressionsstärke, Internalisierung und durch Abspaltung durch Proteasen reguliert werden (Fogel et al., 2003; Long et al., 2002; Nayeem et al., 1999; Mechtersheimer et al., 2001). Die Abspaltung durch Proteasen führt zu einem löslichen L1CAM-Fragment, das im Serum von Patientinnen mit Karzinomen des Uterus und des Ovars nachweisbar ist und als diagnostischer Serummarker dienen könnte (Fogel et al., 2004). L1CAM-Spaltung durch die ADAM10-Protease führt zu erhöhter Migration von CHO-Fibroblasten über die Interaktion mit  $\alpha v$ -Integrinen (Mechtersheimer et al., 2001). Fogel et al. konnten zeigen, dass L1CAM durch die Vermittlung von Adhäsion und Migration die Tumorprogression von malignen Melanomen fördern kann (2003). Da auch in

Ovarkarzinomen lösliches L1CAM nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass auch hier L1CAM in die Migration von Tumorzellen involviert ist. Die Motilität, die auch bei der Migration der Zellen eine Rolle spielt, wird von L1CAM $_{\Delta 2,27}$  nicht verändert, wie im Matrigel-Versuch nachgewiesen wurde. Die Bindung an Integrine ist möglicherweise hauptsächlich für die Migrationsfähigkeit verantwortlich.

Neben einer diagnostischen bzw. prognostischen Anwendung der deregulierten L1CAM-Expression ist auch eine Anwendung in der Therapie denkbar. Da die meisten Gene, die am Wachstum von Tumorzellen beteiligt sind, auch für das Wachstum von normalen Zellen essentiell sind, ist der Einsatz von wachstumshemmenden Antikörpern meist problematisch. Ein geeignetes Angriffsziel wären also Gene, die nur in Tumorzellen für Wachstum und Proliferation benötigt werden. Primiano et al. konnten nachweisen, dass monoklonale Antikörper gegen L1CAM die Proliferation von Tumorzellen, nicht aber von normalen Zellen verhinderten (2003). In der gleichen Studie wurde beobachtet, dass eine induzierbare Hemmung der L1CAM-Expression über GSE-Elemente (*Genetic Suppressor Elements*) zu Apoptose in diesen Zellen führte. Diese Ergebnisse zeigen, dass monoklonale Anti-L1CAM-Antikörper als potentielle therapeutische Agentien in der Tumorbekämpfung dienen könnten.

Ein weiterer Ansatz in der Anti-L1CAM-Antikörper-basierenden Therapie ist durch die Expression verschiedener Spleißvarianten denkbar. Die Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen die Isoform, die in Tumorzellen exprimiert wird und in Nervenzellen nicht vorkommt, könnte den therapeutischen Einsatz spezifizieren (Meli et al., 1999).

Zusammenfassend ist mit der Überexpression von L1CAM in Ovarkarzinomen ein Zielmolekül mit vielfältigem Anwendungspotential identifiziert worden, das sowohl die Diagnostik als auch die Therapie dieser Erkrankung verbessern könnte.

## V. Zusammenfassung

Unzureichende Möglichkeiten in Diagnose und Behandlung von epithelialen Ovarialtumoren führen zu einer niedrigen Überlebensrate der Patientinnen. Die molekularen Zusammenhänge, die der Progression dieser Krankheit zugrunde liegen, sind noch weitgehend unbekannt und erschweren Verbesserungen in der Früherkennung und Therapie.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Affymetrix GeneChip-Technologie die Genexpressionsprofile von elf Ovarialtumor-Zelllinien mit denen von zwei IOSE-Zelllinien, die aus normalen Epithelzellen des Ovars etabliert wurden, verglichen. So sollten Gene identifiziert werden, welche die Tumorzellen von den normalen Zellen unterscheiden und eventuell als diagnostischer Marker oder als Zielgen für therapeutische Zwecke dienen können.

Mit besonderem Augenmerk auf Transmembran- bzw. sezernierte Proteine wurden zunächst 21 bzw. sieben Gene in den beiden Gruppen identifiziert, deren Überexpression in Karzinomen des Ovars zum ersten Mal ermittelt wurde. Die Ergebnisse der Affymetrix-Analyse wurden mittels RT-PCR in sieben ausgewählten Genen bestätigt. Die Expressionsanalysen von drei ausgewählten Genen, NMU, JAG2 und L1CAM, wurden auf Ovarialtumor-Gewebeproben ausgeweitet und eine mögliche Rolle in der Tumorgenese des Ovarialkarzinoms diskutiert.

Da für L1CAM spezifische Antikörper zur Verfügung standen, konnte gezeigt werden, dass die Abundanz der L1CAM-mRNA mit der Protein-Abundanz korrelierte und die Lokalisierung in der Zelle wie erwartet in der Plasmamembran erfolgte. Die Expression von L1CAM konnte immunhistochemisch in Paraffinschnitten von Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden. Zu einem geringeren Prozentsatz konnte das Zelladhäsionsmolekül auch in Borderline-Tumoren, die in der Regel durch eine gute Prognose gekennzeichnet sind, und Fibromen identifiziert werden. In malignen Ovarialtumoren nicht epithelialer Herkunft konnte keine L1CAM-Expression festgestellt werden. Zeitgleich wurde die Überexpression von L1CAM in Ovarialkarzinomen beschrieben und das Molekül als prognostischer Marker in Karzinomen des Ovars, Uterus und des Endometriums identifiziert.

Durch funktionelle Analysen sollte die Funktion von L1CAM in Ovarialtumorzellen untersucht werden. Bei der Klonierung von L1CAM wurde festgestellt, dass aus den verwendeten Ovarialtumor-Zelllinien nur eine Isoform des Gens isoliert werden konnte, in der die Exons 2 und 27 deletiert sind. In stabilen L1CAM $_{\Delta 2,27}$ -Transfektanten konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser Isoform zu erhöhter Adhäsion an Laminin im Vergleich zu Vektor-Transfektanten führt. Die Invasionsfähigkeit der Transfektanten wurde durch die ektopische L1CAM $_{\Delta 2,27}$ -Expression nicht verändert.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit unter der Verwendung der Genchip-Technologie die zwei potenziellen Markergene NMU und JAG2 identifiziert, die in weiteren Analysen auf ihre Bedeutung in Ovarkarzinomen untersucht werden müssen. LICAM wurde in immunhistochemischen Studien als Marker identifiziert, dessen prognostischer Wert in Zukunft die Diagnose und Therapie dieser aggressiven Erkrankung verbessern könnte. Zudem bieten die vielfältigen Funktionen von LICAM Möglichkeiten bei der therapeutischen Intervention durch monoklonale Antikörper, die durch die Expression einer Spleißvariante in Ovaratumorzellen spezifiziert werden könnte.

## VI. Literaturverzeichnis

Aarnio, M., Sankila, R., Pukkala, E., Salovaara, R., Aaltonen, L. A., de la Chapelle, A., Peltomaki, P., Mecklin, J. P., and Jarvinen, H. J. (1999). Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 81, 214-218.

Adams, M. D., Dubnick, M., Kerlavage, A. R., Moreno, R., Kelley, J. M., Utterback, T. R., Nagle, J. W., Fields, C., and Venter, J. C. (1992). Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature* 355, 632-634.

Almadrones, L. A. (2003). Treatment advances in ovarian cancer. *Cancer Nurs* 26, 16S-20S.

Anderson, L., and Seilhamer, J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18, 533-537.

Andreasen, P. A., Egelund, R., and Petersen, H. H. (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57, 25-40.

Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72, 1117-1130.

Aster, J. C., and Pear, W. S. (2001). Notch signaling in leukemia. *Curr Opin Hematol* 8, 237-244.

Auersperg, N., Maines-Bandiera, S. L., Dyck, H. G., and Kruk, P. A. (1994). Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest* 71, 510-518.

Auersperg, N., Pan, J., Grove, B. D., Peterson, T., Fisher, J., Maines-Bandiera, S., Somasiri, A., and Roskelley, C. D. (1999). E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6249-6254.

Bajou, K., Noel, A., Gerard, R. D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N. E., Carmeliet, P., Collen, D., and Foidart, J. M. (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 4, 923-928.

Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J., and Litvinov, S. V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 77, 699-712.

Barker, S. D., Coolidge, C. J., Kanerva, A., Hakkarainen, T., Yamamoto, M., Liu, B., Rivera, A. A., Bhoola, S. M., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., *et al.* (2003). The secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) promoter for ovarian cancer gene therapy. *J Gene Med* 5, 300-310.

Barnes, M. N., and Pustilnik, T. B. (2001). Current strategies in gene therapy for ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 13, 47-51.

Baron, M. (2003). An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 14, 113-119.

Baron-Hay, S., Boyle, F., Ferrier, A., and Scott, C. (2004). Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 as a prognostic marker in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 10, 1796-1806.

Bartlett, J. M., Langdon, S. P., Scott, W. N., Love, S. B., Miller, E. P., Katsaros, D., Smyth, J. F., and Miller, W. R. (1997). Transforming growth factor-beta isoform expression in human ovarian tumours. *Eur J Cancer* 33, 2397-2403.

Bast, R. C., Yu, Y., Xu, F. J., Le, X. F., and Mills, G. B. (2000). Molecular approaches to management of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 10, 2-7.

Bauknecht, T., Kommos, F., Birmelin, G., von Kleist, S., Kohler, M., and Pfliederer, A. (1991). Expression analysis of EGF-R and TGF $\alpha$  in human ovarian carcinomas. *Anticancer Res* 11, 1523-1528.

Beer, S., Oleszewski, M., Gutwein, P., Geiger, C., and Altevogt, P. (1999). Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci* 112 ( Pt 16), 2667-2675.

Bell, D. A., Weinstock, M. A., and Scully, R. E. (1988). Peritoneal implants of ovarian serous borderline tumors. Histologic features and prognosis. *Cancer* 62, 2212-2222.

Berchuck, A., Kamel, A., Whitaker, R., Kerns, B., Olt, G., Kinney, R., Soper, J. T., Dodge, R., Clarke-Pearson, D. L., Marks, P., and et al. (1990). Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 50, 4087-4091.

Berek, J. S., Markman, M., Stonebraker, B., Lentz, S. S., Adelson, M. D., DeGeest, K., and Moore, D. (1999). Intraperitoneal interferon-alpha in residual ovarian carcinoma: a phase II gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 75, 10-14.

Berek, J. S., Schultes, B. C., and Nicodemus, C. F. (2003). Biologic and immunologic therapies for ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21, 168-174.

Birchmeier, W., Behrens, J., Weidner, K. M., Frixen, U. H., and Schipper, J. (1991). Dominant and recessive genes involved in tumor cell invasion. *Curr Opin Cell Biol* 3, 832-840.

Bolis, G., Colombo, N., Pecorelli, S., Torri, V., Marsoni, S., Bonazzi, C., Chiari, S., Favalli, G., Mangili, G., Presti, M., and et al. (1995). Adjuvant treatment for early epithelial ovarian cancer: results of two randomised clinical trials comparing cisplatin to no further treatment or chronic phosphate (32P). G.I.C.O.G.: Gruppo Interregionale Collaborativo in Ginecologia Oncologica. *Ann Oncol* 6, 887-893.

Boyd, J. (2003). Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know. *Gynecol Oncol* 88, S8-10; discussion S11-13.

Brown, D. R., and Quito, F. L. (1988). Neuromedin U octapeptide alters ion transport in porcine jejunum. *Eur J Pharmacol* 155, 159-162.

Brown, M. R., Blanchette, J. O., and Kohn, E. C. (2000). Angiogenesis in ovarian cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14, 901-918.

Brummendorf, T., Kenwrick, S., and Rathjen, F. G. (1998). Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol* 8, 87-97.

Buller, R. E., Shahin, M. S., Horowitz, J. A., Runnebaum, I. B., Mahavni, V., Petrauskas, S., Kreienberg, R., Karlan, B., Slamon, D., and Pegram, M. (2002). Long term follow-up of patients with recurrent ovarian cancer after Ad p53 gene replacement with SCH 58500. *Cancer Gene Ther* 9, 567-572.

Burghardt, E., Pickel, H., and Stettner, H. (1984). Management of advanced ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 5, 155-159.

Burke, W., Daly, M., Garber, J., Botkin, J., Kahn, M. J., Lynch, P., McTiernan, A., Offit, K., Perlman, J., Petersen, G., *et al.* (1997a). Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. *Jama* 277, 997-1003.

Burke, W., Petersen, G., Lynch, P., Botkin, J., Daly, M., Garber, J., Kahn, M. J., McTiernan, A., Offit, K., Thomson, E., and Varricchio, C. (1997b). Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. I. Hereditary nonpolyposis colon cancer. Cancer Genetics Studies Consortium. *Jama* 277, 915-919.

Cannistra, S. A. (1993). Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 329, 1550-1559.

Capobianco, A. J., Zagouras, P., Blaumueller, C. M., Artavanis-Tsakonas, S., and Bishop, J. M. (1997). Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. *Mol Cell Biol* 17, 6265-6273.

Cereseto, A., and Tsai, S. (2000). Jagged2 induces cell cycling in confluent fibroblasts susceptible to density-dependent inhibition of cell division. *J Cell Physiol* 185, 425-431.

Chave, H. S., Gough, A. C., Palmer, K., Preston, S. R., and Primrose, J. N. (2000). Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br J Cancer* 82, 124-130.

Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X. C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D. J., Morris, M. S., and Fodor, S. P. (1996). Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274, 610-614.

Chen, G., Gharib, T. G., Huang, C. C., Taylor, J. M., Misek, D. E., Kardia, S. L., Giordano, T. J., Iannettoni, M. D., Orringer, M. B., Hanash, S. M., and Beer, D. G. (2002). Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1, 304-313.

Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* 201, 134-139.

Chow, S. N., Chien, C. H., and Chen, C. T. (1996). Molecular biology of human ovarian cancer. *Int Surg* 81, 152-157.

Chu, C., Jin, Q., Kunitake, T., Kato, K., Nabekura, T., Nakazato, M., Kangawa, K., and Kannan, H. (2002). Cardiovascular actions of central neuromedin U in conscious rats. *Regul Pept* *105*, 29-34.

Conese, M., and Blasi, F. (1995a). Urokinase/urokinase receptor system: internalization/degradation of urokinase-serpin complexes: mechanism and regulation. *Biol Chem Hoppe Seyler* *376*, 143-155.

Conese, M., and Blasi, F. (1995b). The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion. *Baillieres Clin Haematol* *8*, 365-389.

Coussens, L. M., and Werb, Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* *3*, 895-904.

Crispens, M. A. (2003). Borderline ovarian tumours: a review of the recent literature. *Curr Opin Obstet Gynecol* *15*, 39-43.

Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* *265*, 1582-1584.

De Angelis, E., Brummendorf, T., Cheng, L., Lemmon, V., and Kenwrick, S. (2001). Alternative use of a mini exon of the L1 gene affects L1 binding to neural ligands. *J Biol Chem* *276*, 32738-32742.

De Nictolis, M., Garbisa, S., Lucarini, G., Goteri, G., Masiero, L., Ciavattini, A., Garzetti, G. G., Stetler-Stevenson, W. G., Fabris, G., Biagini, G., and Prat, J. (1996). 72-kilodalton type IV collagenase, type IV collagen, and Ki 67 antigen in serous tumors of the ovary: a clinicopathologic, immunohistochemical, and Serological study. *Int J Gynecol Pathol* *15*, 102-109.

Debiec, H., Christensen, E. I., and Ronco, P. M. (1998). The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J Cell Biol* *143*, 2067-2079.

Dedhar, S., Saulnier, R., Nagle, R., and Overall, C. M. (1993). Specific alterations in the expression of alpha 3 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in highly invasive and metastatic variants of human prostate carcinoma cells selected by in vitro invasion through reconstituted basement membrane. *Clin Exp Metastasis* *11*, 391-400.

Devoogdt, N., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Zhang, J., Brys, L., De Baetselier, P., and Revets, H. (2003). Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5778-5782.

Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., and Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 6025-6030.

Dong, Y., Walsh, M. D., Cummings, M. C., Wright, R. G., Khoo, S. K., Parsons, P. G., and McGuckin, M. A. (1997). Expression of MUC1 and MUC2 mucins in epithelial ovarian tumours. *J Pathol* *183*, 311-317.



Dunlop, M. G., Farrington, S. M., Carothers, A. D., Wyllie, A. H., Sharp, L., Burn, J., Liu, B., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 6, 105-110.

Ebeling, O., Duczmal, A., Aigner, S., Geiger, C., Schollhammer, S., Kemshead, J. T., Moller, P., Schwartz-Albiez, R., and Altevogt, P. (1996). L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol* 26, 2508-2516.

Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.

Emons, G., Ortmann, O., Pahwa, G. S., Hackenberg, R., Oberheuser, F., and Schulz, K. D. (1992). Intracellular actions of gonadotropic and peptide hormones and the therapeutic value of GnRH-agonists in ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 155, 31-38.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.

Feng, H., Ghazizadeh, M., Konishi, H., and Araki, T. (2002). Expression of MUC1 and MUC2 mucin gene products in human ovarian carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 32, 525-529.

Fisher, J. L., Field, C. L., Zhou, H., Harris, T. L., Henderson, M. A., and Choong, P. F. (2000). Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases--a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases. *Breast Cancer Res Treat* 61, 1-12.

Foekens, J. A., Peters, H. A., Look, M. P., Portengen, H., Schmitt, M., Kramer, M. D., Brunner, N., Janicke, F., Meijer-van Gelder, M. E., Henzen-Logmans, S. C., *et al.* (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 60, 636-643.

Fogel, M., Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, L., Ben-Arie, A., Huszar, M., and Altevogt, P. (2003). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362, 869-875.

Fogel, M., Huszar, M., Altevogt, P., and Ben-Arie, A. (2004). L1 (CD171) as a novel biomarker for ovarian and endometrial carcinomas. *Expert Rev Mol Diagn* 4, 455-462.

Fritsche, H. A., and Bast, R. C. (1998). CA 125 in ovarian cancer: advances and controversy. *Clin Chem* 44, 1379-1380.

Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Habata, Y., Hinuma, S., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2000). Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3. *J Biol Chem* 275, 21068-21074.

Garver, R. I., Jr., Goldsmith, K. T., Rodu, B., Hu, P. C., Sorscher, E. J., and Curiel, D. T. (1994). Strategy for achieving selective killing of carcinomas. *Gene Ther* 1, 46-50.

Garzetti, G. G., Ciavattini, A., Lucarini, G., Goteri, G., Romanini, C., and Biagini, G. (1996).

Increased serum 72 KDa metalloproteinase in serous ovarian tumors: comparison with CA 125. *Anticancer Res* 16, 2123-2127.

Ghosh, S., Wu, Y., and Stack, M. S. (2002). Ovarian cancer-associated proteinases. *Cancer Treat Res* 107, 331-351.

Grace, M., Youngster, S., Gitlin, G., Sydor, W., Xie, L., Westreich, L., Jacobs, S., Brassard, D., Bausch, J., and Bordens, R. (2001). Structural and biologic characterization of pegylated recombinant IFN-alpha2b. *J Interferon Cytokine Res* 21, 1103-1115.

Griffin, T. J., Gygi, S. P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L., and Aebersold, R. (2002). Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 1, 323-333.

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.

Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechtersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K., and Altevogt, P. (2000). Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem* 275, 15490-15497.

Hall, H., Carbonetto, S., and Schachner, M. (1997). L1/HNK-1 carbohydrate- and beta 1 integrin-dependent neural cell adhesion to laminin-1. *J Neurochem* 68, 544-553.

Hampton, G. M., and Frierson, H. F. (2003). Classifying human cancer by analysis of gene expression. *Trends Mol Med* 9, 5-10.

Hanada, R., Nakazato, M., Murakami, N., Sakihara, S., Yoshimatsu, H., Toshinai, K., Hanada, T., Suda, T., Kangawa, K., Matsukura, S., and Sakata, T. (2001). A role for neuromedin U in stress response. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 225-228.

Hanada, T., Date, Y., Shimbara, T., Sakihara, S., Murakami, N., Hayashi, Y., Kanai, Y., Suda, T., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2003). Central actions of neuromedin U via corticotropin-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 954-958.

Hanson, J. M., Browell, D. A., Cunliffe, W. J., Varma, J., Allen, A., Hemming, D., Shenton, B. K., Young, J. R., Higgs, M. J., Brotherick, I., and Pearson, J. P. (2001). MUC1 expression in primary breast cancer: the effect of tamoxifen treatment. *Breast Cancer Res Treat* 67, 215-222.

Harper, J. R., Prince, J. T., Healy, P. A., Stuart, J. K., Nauman, S. J., and Stallcup, W. B. (1991). Isolation and sequence of partial cDNA clones of human L1: homology of human and rodent L1 in the cytoplasmic region. *J Neurochem* 56, 797-804.

Hasenburg, A., Fischer, D. C., Tong, X. W., Rojas-Martinez, A., Kaufman, R. H., Ramzy, I., Kohlberger, P., Orlowska-Volk, M., Aguilar-Cordova, E., and Kieback, D. G. (2002). Adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy for recurrent ovarian cancer: expression of coxsackie-adenovirus receptor and integrins alphavbeta3 and alphavbeta5. *J Soc Gynecol Investig* 9, 174-180.

Haviv, I., and Campbell, I. G. (2002). DNA microarrays for assessing ovarian cancer gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 191, 121-126.

- Heasley, L. E. (2001). Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene* 20, 1563-1569.
- Hedrick, J. A., Morse, K., Shan, L., Qiao, X., Pang, L., Wang, S., Laz, T., Gustafson, E. L., Bayne, M., and Monsma, F. J., Jr. (2000). Identification of a human gastrointestinal tract and immune system receptor for the peptide neuromedin U. *Mol Pharmacol* 58, 870-875.
- Hellstrom, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J. A., Schummer, M., McIntosh, M., Drescher, C., Urban, N., and Hellstrom, K. E. (2003). The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 63, 3695-3700.
- Hird, V., Maraveyas, A., Snook, D., Dhokia, B., Soutter, W. P., Meares, C., Stewart, J. S., Mason, P., Lambert, H. E., and Epenetos, A. A. (1993). Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody. *Br J Cancer* 68, 403-406.
- Hoeflich, A., Fettscher, O., Lahm, H., Blum, W. F., Kolb, H. J., Engelhardt, D., Wolf, E., and Weber, M. M. (2000). Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res* 60, 834-838.
- Hofmann, J., Wegmann, B., Hackenberg, R., Kunzmann, R., Schulz, K. D., and Havemann, K. (1994). Production of insulin-like growth factor binding proteins by human ovarian carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 120, 137-142.
- Hortsch, M. (1996). The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17, 587-593.
- Hough, C. D., Cho, K. R., Zonderman, A. B., Schwartz, D. R., and Morin, P. J. (2001). Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res* 61, 3869-3876.
- Hough, C. D., Sherman-Baust, C. A., Pizer, E. S., Montz, F. J., Im, D. D., Rosenshein, N. B., Cho, K. R., Riggins, G. J., and Morin, P. J. (2000). Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 60, 6281-6287.
- Howard, A. D., Wang, R., Pong, S. S., Mellin, T. N., Strack, A., Guan, X. M., Zeng, Z., Williams, D. L., Jr., Feighner, S. D., Nunes, C. N., *et al.* (2000). Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature* 406, 70-74.
- Huang, L. W., Garrett, A. P., Bell, D. A., Welch, W. R., Berkowitz, R. S., and Mok, S. C. (2000). Differential expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and mRNA in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 77, 369-376.
- Ikeuchi, T., and Sisodia, S. S. (2003). The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "gamma-secretase" cleavage. *J Biol Chem* 278, 7751-7754.
- Ismail, R. S., Baldwin, R. L., Fang, J., Browning, D., Karlan, B. Y., Gasson, J. C., and Chang, D. D. (2000). Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Res* 60, 6744-6749.
- Jacob, J., Haspel, J., Kane-Goldsmith, N., and Grumet, M. (2002). L1 mediated homophilic binding

- and neurite outgrowth are modulated by alternative splicing of exon 2. *J Neurobiol* *51*, 177-189.
- Jacobs, I., and Bast, R. C., Jr. (1989). The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* *4*, 1-12.
- Jacobs, I. J., and Menon, U. (2004). Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics* *3*, 355-366.
- Jakowlew, S. B., Moody, T. W., and Mariano, J. M. (1997). Transforming growth factor-beta receptors in human cancer cell lines: analysis of transcript, protein and proliferation. *Anticancer Res* *17*, 1849-1860.
- Jhappan, C., Gallahan, D., Stahle, C., Chu, E., Smith, G. H., Merlino, G., and Callahan, R. (1992). Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev* *6*, 345-355.
- Jouet, M., Rosenthal, A., and Kenwrick, S. (1995). Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. *Brain Res Mol Brain Res* *30*, 378-380.
- Kadmon, G., and Altevogt, P. (1997). The cell adhesion molecule L1: species- and cell-type-dependent multiple binding mechanisms. *Differentiation* *61*, 143-150.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., and Schachner, M. (1990). Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol* *110*, 209-218.
- Kamiguchi, H., and Lemmon, V. (1998). A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J Neurosci* *18*, 3749-3756.
- Kanety, H., Kattan, M., Goldberg, I., Kopolovic, J., Ravia, J., Menczer, J., and Karasik, A. (1996). Increased insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) gene expression and protein production lead to high IGFBP-2 content in malignant ovarian cyst fluid. *Br J Cancer* *73*, 1069-1073.
- Karlan, B. Y. (1997). The status of ultrasound and color Doppler imaging for the early detection of ovarian carcinoma. *Cancer Invest* *15*, 265-269.
- Katayama, M., Iwamatsu, A., Masutani, H., Furuke, K., Takeda, K., Wada, H., Masuda, T., and Ishii, K. (1997). Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct Funct* *22*, 511-516.
- Kerbel, R. S., Vilorio-Petit, A., Okada, F., and Rak, J. (1998). Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol Med* *4*, 286-295.
- Kim, J. H., Herlyn, D., Wong, K. K., Park, D. C., Schorge, J. O., Lu, K. H., Skates, S. J., Cramer, D. W., Berkowitz, R. S., and Mok, S. C. (2003). Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res* *9*, 4782-4791.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* *280*, 1036-

1037.

Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W., and Martin, G. R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25, 312-318.

Kojima, M., Haruno, R., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Hanada, R., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2000). Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem Biophys Res Commun* 276, 435-438.

Kowitz, A., Kadmon, G., Eckert, M., Schirmacher, V., Schachner, M., and Altevogt, P. (1992). Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol* 22, 1199-1205.

Krainer, M., Silva-Arrieta, S., FitzGerald, M. G., Shimada, A., Ishioka, C., Kanamaru, R., MacDonald, D. J., Unsal, H., Finkelstein, D. M., Bowcock, A., *et al.* (1997). Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. *N Engl J Med* 336, 1416-1421.

Kuhn, T. B., Stoeckli, E. T., Condrau, M. A., Rathjen, F. G., and Sonderegger, P. (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* 115, 1113-1126.

Kuhn, W., Pache, L., Schmalfeldt, B., Dettmar, P., Schmitt, M., Janicke, F., and Graeff, H. (1994). Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* 55, 401-409.

Larcher, F., Robles, A. I., Duran, H., Murillas, R., Quintanilla, M., Cano, A., Conti, C. J., and Jorcano, J. L. (1996). Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res* 56, 5391-5396.

Lauffenburger, D. A. (1996). Cell motility. Making connections count. *Nature* 383, 390-391.

Laval, S., Butler, R., Shelling, A. N., Hanby, A. M., Poulson, R., and Ganesan, T. S. (1994). Isolation and characterization of an epithelial-specific receptor tyrosine kinase from an ovarian cancer cell line. *Cell Growth Differ* 5, 1173-1183.

Leng, J., Lang, J., Shen, K., and Guo, L. (1997). Overexpression of p53, EGFR, c-erbB2 and c-erbB3 in endometrioid carcinoma of the ovary. *Chin Med Sci J* 12, 67-70.

Liang, P., and Pardee, A. B. (1997). Differential display. A general protocol. *Methods Mol Biol* 85, 3-11.

Linnemann, D., and Bock, E. (1989). Cell adhesion molecules in neural development. *Dev Neurosci* 11, 149-173.

Linzer, D. I., and Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.

- Liotta, L. A., and Kohn, E. C. (2003). Cancer's deadly signature. *Nat Genet* 33, 10-11.
- Lisitsyn, N., and Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259, 946-951.
- Litvinov, S. V., Balzar, M., Winter, M. J., Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., Prins, F., Fleuren, G. J., and Warnaar, S. O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol* 139, 1337-1348.
- Liu, P. C., Benjamin, I., Morgan, M. A., King, S. A., Mikuta, J. J., and Rubin, S. C. (1997). Effect of surgical debulking on survival in stage IV ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 64, 4-8.
- Lloyd, K. O., and Yin, B. W. (2001). Synthesis and secretion of the ovarian cancer antigen CA 125 by the human cancer cell line NIH:OVCAR-3. *Tumour Biol* 22, 77-82.
- Long, K. E., Asou, H., Snider, M. D., and Lemmon, V. (2001). The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J Biol Chem* 276, 1285-1290.
- Luo, B., Aster, J. C., Hasserjian, R. P., Kuo, F., and Sklar, J. (1997). Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol* 17, 6057-6067.
- Lynch, H. T., and Lynch, J. F. (2002). Hereditary cancer: family history, diagnosis, molecular genetics, ecogenetics, and management strategies. *Biochimie* 84, 3-17.
- Maines-Bandiera, S. L., and Auersperg, N. (1997). Increased E-cadherin expression in ovarian surface epithelium: an early step in metaplasia and dysplasia? *Int J Gynecol Pathol* 16, 250-255.
- Maines-Bandiera, S. L., Kruk, P. A., and Auersperg, N. (1992). Simian virus 40-transformed human ovarian surface epithelial cells escape normal growth controls but retain morphogenetic responses to extracellular matrix. *Am J Obstet Gynecol* 167, 729-735.
- Makar, A. P., Kristensen, G. B., Borner, O. P., and Trope, C. G. (1992). CA 125 measured before second-look laparotomy is an independent prognostic factor for survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 45, 323-328.
- Malinda, K. M., and Kleinman, H. K. (1996). The laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 957-959.
- Markman, M., Iseminger, K. A., Hatch, K. D., Creasman, W. T., Barnes, W., and Dubeshter, B. (1996). Tamoxifen in platinum-refractory ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Ancillary Report. *Gynecol Oncol* 62, 4-6.
- Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R., and Mobashery, S. (1998). Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J* 12, 1075-1095.
- McGuckin, M. A., Walsh, M. D., Hohn, B. G., Ward, B. G., and Wright, R. G. (1995). Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum Pathol* 26, 432-439.
- McGuire, W. P., Hoskins, W. J., Brady, M. F., Kucera, P. R., Partridge, E. E., Look, K. Y., Clarke-

- Pearson, D. L., and Davidson, M. (1996). Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 334, 1-6.
- Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Postina, R., Fahrenholz, F., Fogel, M., Lemmon, V., and Altevogt, P. (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155, 661-673.
- Meden, H., and Fattahi-Meibodi, A. (1998). CA 125 in benign gynecological conditions. *Int J Biol Markers* 13, 231-237.
- Meli, M. L., Carrel, F., Waibel, R., Amstutz, H., Crompton, N., Jaussi, R., Moch, H., Schubiger, P. A., and Novak-Hofer, I. (1999). Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer* 83, 401-408.
- Menard, S., Castronovo, V., Tagliabue, E., and Sobel, M. E. (1997). New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. *J Cell Biochem* 67, 155-165.
- Menon, U., and Jacobs, I. (2002). Screening for ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16, 469-482.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
- Miller, D. G., Adam, M. A., and Miller, A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 10, 4239-4242.
- Minamino, N., Kangawa, K., Honzawa, M., and Matsuo, H. (1988). Isolation and structural determination of rat neuromedin U. *Biochem Biophys Res Commun* 156, 355-360.
- Minamino, N., Sudoh, T., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1985). Neuromedins: novel smooth-muscle stimulating peptides identified in porcine spinal cord. *Peptides* 6 Suppl 3, 245-248.
- Miura, M., Kobayashi, M., Asou, H., and Uyemura, K. (1991). Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing. *FEBS Lett* 289, 91-95.
- Mobus, V., Gerharz, C. D., Press, U., Moll, R., Beck, T., Mellin, W., Pollow, K., Knapstein, P. G., and Kreienberg, R. (1992). Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 52, 76-84.
- Mobus, V. J., Moll, R., Gerharz, C. D., Kieback, D. G., Weikel, W., Hoffmann, G., and Kreienberg, R. (1994). Establishment of new ovarian and colon carcinoma cell lines: differentiation is only possible by cytokeratin analysis. *Br J Cancer* 69, 422-428.
- Moldenhauer, G., Henne, C., Karhausen, J., and Moller, P. (1999). Surface-expressed invariant chain (CD74) is required for internalization of human leucocyte antigen-DR molecules to early endosomal compartments. *Immunology* 96, 473-484.

- Mondino, A., Resnati, M., and Blasi, F. (1999). Structure and function of the urokinase receptor. *Thromb Haemost 82 Suppl 1*, 19-22.
- Montgomery, A. M., Becker, J. C., Siu, C. H., Lemmon, V. P., Cheresch, D. A., Pancook, J. D., Zhao, X., and Reisfeld, R. A. (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol 132*, 475-485.
- Moody, T. W., Chan, D., Fahrenkrug, J., and Jensen, R. T. (2003). Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des 9*, 495-509.
- Moore, M. G., Wetterau, L. A., Francis, M. J., Peehl, D. M., and Cohen, P. (2003). Novel stimulatory role for insulin-like growth factor binding protein-2 in prostate cancer cells. *Int J Cancer 105*, 14-19.
- Moser, T. L., Young, T. N., Rodriguez, G. C., Pizzo, S. V., Bast, R. C., Jr., and Stack, M. S. (1994). Secretion of extracellular matrix-degrading proteinases is increased in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer 56*, 552-559.
- Munkarah, A. R., Hallum, A. V., 3rd, Morris, M., Burke, T. W., Levenback, C., Atkinson, E. N., Wharton, J. T., and Gershenson, D. M. (1997). Prognostic significance of residual disease in patients with stage IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol 64*, 13-17.
- Nagy, J. A., Morgan, E. S., Herzberg, K. T., Manseau, E. J., Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F. (1995). Pathogenesis of ascites tumor growth: angiogenesis, vascular remodeling, and stroma formation in the peritoneal lining. *Cancer Res 55*, 376-385.
- Nakamori, S., Ota, D. M., Cleary, K. R., Shirotani, K., and Irimura, T. (1994). MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology 106*, 353-361.
- Nathanson, K. L., Wooster, R., Weber, B. L., and Nathanson, K. N. (2001). Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med 7*, 552-556.
- Nayeem, N., Silletti, S., Yang, X., Lemmon, V. P., Reisfeld, R. A., Stallcup, W. B., and Montgomery, A. M. (1999). A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci 112 ( Pt 24)*, 4739-4749.
- Nemoto, T., Ohashi, K., Akashi, T., Johnson, J. D., and Hirokawa, K. (1997). Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology 65*, 195-203.
- Nicholson, S., Gooden, C. S., Hird, V., Maraveyas, A., Mason, P., Lambert, H. E., Meares, C. F., and Epenetos, A. A. (1998). Radioimmunotherapy after chemotherapy compared to chemotherapy alone in the treatment of advanced ovarian cancer: a matched analysis. *Oncol Rep 5*, 223-226.
- Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y. F., Carter, K. C., Ruben, S. M., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., and et al. (1994). Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature 371*, 75-80.
- Niikura, H., Sasano, H., Sato, S., and Yajima, A. (1997). Expression of epidermal growth factor-



related proteins and epidermal growth factor receptor in common epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* *16*, 60-68.

Nitta, M., Katabuchi, H., Ohtake, H., Tashiro, H., Yamaizumi, M., and Okamura, H. (2001). Characterization and tumorigenicity of human ovarian surface epithelial cells immortalized by SV40 large T antigen. *Gynecol Oncol* *81*, 10-17.

Nkondjock, A., and Ghadirian, P. (2004). Epidemiology of breast cancer among BRCA mutation carriers: an overview. *Cancer Lett* *205*, 1-8.

Ohuchida, T., Okamoto, K., Akahane, K., Higure, A., Todoroki, H., Abe, Y., Kikuchi, M., Ikematsu, S., Muramatsu, T., and Itoh, H. (2004). Midkine protects hepatocellular carcinoma cells against TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity. *Cancer* *100*, 2430-2436.

Okada, F., Rak, J. W., Croix, B. S., Lieubeau, B., Kaya, M., Roncari, L., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Kerbel, R. S. (1998). Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 3609-3614.

Okegawa, T., Li, Y., Pong, R. C., and Hsieh, J. T. (2002). Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol* *167*, 1836-1843.

Pancook, J. D., Reisfeld, R. A., Varki, N., Vitiello, A., Fox, R. I., and Montgomery, A. M. (1997). Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J Immunol* *158*, 4413-4421.

Patel, K., Kiely, F., Phimister, E., Melino, G., Rathjen, F., and Kemshead, J. T. (1991). The 200/220 kDa antigen recognized by monoclonal antibody (MAb) UJ127.11 on neural tissues and tumors is the human L1 adhesion molecule. *Hybridoma* *10*, 481-491.

Piccart, M. J., Du Bois, A., Gore, M. E., Neijt, J. P., Pecorelli, S., and Pujade-Lauraine, E. (2000). A new standard of care for treatment of ovarian cancer. *Eur J Cancer* *36*, 10-12.

Primiano, T., Baig, M., Maliyekkel, A., Chang, B. D., Fellars, S., Sadhu, J., Axenovich, S. A., Holzmayer, T. A., and Roninson, I. B. (2003). Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell* *4*, 41-53.

Pritchard, K. I. (2003). The best use of adjuvant endocrine treatments. *Breast* *12*, 497-508.

Pujade-Lauraine, E., Guastalla, J. P., Colombo, N., Devillier, P., Francois, E., Fumoleau, P., Monnier, A., Nooy, M., Mignot, L., Bugat, R., *et al.* (1996). Intraperitoneal recombinant interferon gamma in ovarian cancer patients with residual disease at second-look laparotomy. *J Clin Oncol* *14*, 343-350.

Pupa, S. M., Menard, S., Forti, S., and Tagliabue, E. (2002). New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol* *192*, 259-267.

Rangel, L. B., Agarwal, R., D'Souza, T., Pizer, E. S., Alo, P. L., Lancaster, W. D., Gregoire, L.,

Schwartz, D. R., Cho, K. R., and Morin, P. J. (2003). Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* 9, 2567-2575.

Rao, B. R., and Slotman, B. J. (1991). Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer. *Endocr Rev* 12, 14-26.

Rasmussen, H. S., and McCann, P. P. (1997). Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther* 75, 69-75.

Reid, R. A., and Hemperly, J. J. (1992). Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. *J Mol Neurosci* 3, 127-135.

Reubi, J. C. (2003). Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 24, 389-427.

Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H., and Schmitt, M. (1998). Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* 13, 893-906.

Ries, L. A., Wingo, P. A., Miller, D. S., Howe, H. L., Weir, H. K., Rosenberg, H. M., Vernon, S. W., Cronin, K., and Edwards, B. K. (2000). The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* 88, 2398-2424.

Rijcken, F. E., van der Sluis, T., Hollema, H., and Kleibeuker, J. H. (2003). Hyperplastic polyps in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 98, 2306-2311.

Rustgi, A. K., Nakagawa, H., and Yan, Y. X. (1994). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): new insights from genetic linkage. *Gastroenterology* 106, 815-817.

Salmi, M., Gron-Virta, K., Sointu, P., Grenman, R., Kalimo, H., and Jalkanen, S. (1993). Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* 122, 431-442.

Sargent, T. D. (1987). Isolation of differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 152, 423-432.

Sasaki, Y., Ishida, S., Morimoto, I., Yamashita, T., Kojima, T., Kihara, C., Tanaka, T., Imai, K., Nakamura, Y., and Tokino, T. (2002). The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J Biol Chem* 277, 719-724.

Sawiris, G. P., Sherman-Baust, C. A., Becker, K. G., Cheadle, C., Teichberg, D., and Morin, P. J. (2002). Development of a highly specialized cDNA array for the study and diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 2923-2928.

Schaner, M. E., Ross, D. T., Ciaravino, G., Sorlie, T., Troyanskaya, O., Diehn, M., Wang, Y. C., Duran, G. E., Sikic, T. L., Caldeira, S., *et al.* (2003). Gene expression patterns in ovarian carcinomas. *Mol Biol Cell* 14, 4376-4386.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene

expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.

Schildkraut, J. M., and Thompson, W. D. (1988). Familial ovarian cancer: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 128, 456-466.

Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Hofler, H., Janicke, F., and Graeff, H. (1997). Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 78, 285-296.

Schofield, K., D'Aquila, T., and Rimm, D. L. (1997). The cell adhesion molecule, E-cadherin, distinguishes mesothelial cells from carcinoma cells in fluids. *Cancer* 81, 293-298.

Schummer, M., Ng, W. V., Bumgarner, R. E., Nelson, P. S., Schummer, B., Bednarski, D. W., Hassell, L., Baldwin, R. L., Karlan, B. Y., and Hood, L. (1999). Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* 238, 375-385.

Schwartzberg, L. S. (2001). Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 40, 17-24.

Scotton, C. J., Wilson, J. L., Milliken, D., Stamp, G., and Balkwill, F. R. (2001). Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61, 4961-4965.

Scotton, C. J., Wilson, J. L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G. D., Fricker, S., Bridger, G., and Balkwill, F. R. (2002). Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 5930-5938.

Scully, R., Chen, J., Ochs, R. L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., and Livingston, D. M. (1997). Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90, 425-435.

Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., and Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 386, 804-810.

Sharma, R. A., Harris, A. L., Dalgleish, A. G., Steward, W. P., and O'Byrne, K. J. (2001). Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention. *Lancet Oncol* 2, 726-732.

Sherman, L., Sleeman, J., Dall, P., Hekele, A., Moll, J., Ponta, H., and Herrlich, P. (1996). The CD44 proteins in embryonic development and in cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 ( Pt 1), 249-269.

Shigemasa, K., Tanimoto, H., Underwood, L. J., Parmley, T. H., Arihiro, K., Ohama, K., and O'Brien, T. J. (2001). Expression of the protease inhibitor antileukoprotease and the serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE) is coordinated in ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer* 11, 454-461.

Shore, E. M., and Nelson, W. J. (1991). Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 266, 19672-19680.

Shridhar, V., Lee, J., Pandita, A., Iturria, S., Avula, R., Staub, J., Morrissey, M., Calhoun, E., Sen, A., Kalli, K., *et al.* (2001). Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors. *Cancer Res* *61*, 5895-5904.

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

Sperl, S., Mueller, M. M., Wilhelm, O. G., Schmitt, M., Magdolen, V., and Moroder, L. (2001). The uPA/uPA receptor system as a target for tumor therapy. *Drug News Perspect* *14*, 401-411.

Spinelli, C., Gadducci, A., Bonadio, A. G., Berti, P., and Miccoli, P. (1999). Benign ovarian fibroma associated with free peritoneal fluid and elevated serum CA 125 levels. *Minerva Ginecol* *51*, 403-407.

Stack, M. S., Ellerbroek, S. M., and Fishman, D. A. (1998). The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Oncol* *12*, 569-576.

Steele, I. A., Edmondson, R. J., Bulmer, J. N., Bolger, B. S., Leung, H. Y., and Davies, B. R. (2001). Induction of FGF receptor 2-IIIb expression and response to its ligands in epithelial ovarian cancer. *Oncogene* *20*, 5878-5887.

Stefansson, S., and Lawrence, D. A. (1996). The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* *383*, 441-443.

Stenman, U. H., Alfthan, H., Vartiainen, J., and Lehtovirta, P. (1995). Markers supplementing CA 125 in ovarian cancer. *Ann Med* *27*, 115-120.

Strobel, T., Swanson, L., Korsmeyer, S., and Cannistra, S. A. (1996). BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 14094-14099.

Struewing, J. P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S. M., Berlin, M., McAdams, M., Timmerman, M. M., Brody, L. C., and Tucker, M. A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* *336*, 1401-1408.

Su, X. D., Gastinel, L. N., Vaughn, D. E., Faye, I., Poon, P., and Bjorkman, P. J. (1998). Crystal structure of hemolin: a horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science* *281*, 991-995.

Suminami, Y., Nagashima, S., Murakami, A., Nawata, S., Gondo, T., Hirakawa, H., Numa, F., Silverman, G. A., and Kato, H. (2001). Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res* *61*, 1776-1780.

Sundfeldt, K. (2003). Cell-cell adhesion in the normal ovary and ovarian tumors of epithelial origin; an exception to the rule. *Mol Cell Endocrinol* *202*, 89-96.

Sundfeldt, K., Piontekowitz, Y., Ivarsson, K., Nilsson, O., Hellberg, P., Brannstrom, M., Janson, P.

- O., Enerback, S., and Hedin, L. (1997). E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary. *Int J Cancer* 74, 275-280.
- Szekeres, P. G., Muir, A. I., Spinage, L. D., Miller, J. E., Butler, S. I., Smith, A., Rennie, G. I., Murdock, P. R., Fitzgerald, L. R., Wu, H., *et al.* (2000). Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3. *J Biol Chem* 275, 20247-20250.
- Takeda, Y., Asou, H., Murakami, Y., Miura, M., Kobayashi, M., and Uyemura, K. (1996). A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J Neurochem* 66, 2338-2349.
- Takei, Y., Kadomatsu, K., Matsuo, S., Itoh, H., Nakazawa, K., Kubota, S., and Muramatsu, T. (2001). Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res* 61, 8486-8491.
- Tewari, K. S., and DiSaia, P. J. (2002). Radiation therapy for gynecologic cancer. *J Obstet Gynaecol Res* 28, 123-140.
- Timmerman, D., Moerman, P., and Vergote, I. (1995). Meigs' syndrome with elevated serum CA 125 levels: two case reports and review of the literature. *Gynecol Oncol* 59, 405-408.
- Tobacman, J. K., Greene, M. H., Tucker, M. A., Costa, J., Kase, R., and Fraumeni, J. F., Jr. (1982). Intra-abdominal carcinomatosis after prophylactic oophorectomy in ovarian-cancer-prone families. *Lancet* 2, 795-797.
- Toouli, C. D., Huschtscha, L. I., Neumann, A. A., Noble, J. R., Colgin, L. M., Hukku, B., and Reddel, R. R. (2002). Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 T-Antigen or by the telomerase catalytic subunit. *Oncogene* 21, 128-139.
- Tuxen, M. K., Soletormos, G., and Dombernowsky, P. (1995). Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 21, 215-245.
- van der Vange, N., Greggi, S., Burger, C. W., Kenemans, P., and Vermorken, J. B. (1995). Experience with hormonal therapy in advanced epithelial ovarian cancer. *Acta Oncol* 34, 813-820.
- Vasey, P. A. (2003). Role of docetaxel in the treatment of newly diagnosed advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21, 136-144.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-487.
- Venkitaraman, A. R. (2001). Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 114, 3591-3598.
- Verma, I. M., and Somia, N. (1997). Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.
- Vorburger, S. A., and Hunt, K. K. (2002). Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 7, 46-59.

- Watson, P., Butzow, R., Lynch, H. T., Mecklin, J. P., Jarvinen, H. J., Vasen, H. F., Madlensky, L., Fidalgo, P., and Bernstein, I. (2001). The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol* 82, 223-228.
- Weiner, H. L., Huang, H., Zagzag, D., Boyce, H., Lichtenbaum, R., and Ziff, E. B. (2000). Consistent and selective expression of the discoidin domain receptor-1 tyrosine kinase in human brain tumors. *Neurosurgery* 47, 1400-1409.
- Welsh, P. L., and King, M. C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10, 705-713.
- Weller, S., and Gartner, J. (2001). Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat* 18, 1-12.
- Wen, W. H., Reles, A., Runnebaum, I. B., Sullivan-Halley, J., Bernstein, L., Jones, L. A., Felix, J. C., Kreienberg, R., el-Naggar, A., and Press, M. F. (1999). p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol* 18, 29-41.
- Werness, B. A., Ramus, S. J., DiCioccio, R. A., Whittemore, A. S., Garlinghouse-Jones, K., Oakley-Girvan, I., Tsukada, Y., Harrington, P., Gayther, S. A., Ponder, B. A., and Piver, M. S. (2004). Histopathology, FIGO stage, and BRCA mutation status of ovarian cancers from the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry. *Int J Gynecol Pathol* 23, 29-34.
- Whitehead, I. P., Zohn, I. E., and Der, C. J. (2001). Rho GTPase-dependent transformation by G protein-coupled receptors. *Oncogene* 20, 1547-1555.
- Windbichler, G. H., Hausmaninger, H., Stummvoll, W., Graf, A. H., Kainz, C., Lahodny, J., Denison, U., Muller-Holzner, E., and Marth, C. (2000). Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br J Cancer* 82, 1138-1144.
- Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 878, 388-403.
- Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V., and Bartel, P. L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem* 272, 31941-31944.
- Wong, E. V., Schaefer, A. W., Landreth, G., and Lemmon, V. (1996). Casein kinase II phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 66, 779-786.
- Wren, A. M., Small, C. J., Abbott, C. R., Jethwa, P. H., Kennedy, A. R., Murphy, K. G., Stanley, S. A., Zollner, A. N., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2002). Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinology* 143, 4227-4234.
- Young, R. C., Brady, M. F., Nieberg, R. K., Long, H. J., Mayer, A. R., Lentz, S. S., Hurteau, J., and Alberts, D. S. (2003). Adjuvant treatment for early ovarian cancer: a randomized phase III trial of intraperitoneal 32P or intravenous cyclophosphamide and cisplatin--a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 21, 4350-4355.
- Young, R. C., Walton, L. A., Ellenberg, S. S., Homesley, H. D., Wilbanks, G. D., Decker, D. G.,

Miller, A., Park, R., and Major, F., Jr. (1990). Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med* 322, 1021-1027.

Young, T. N., Rodriguez, G. C., Rinehart, A. R., Bast, R. C., Jr., Pizzo, S. V., and Stack, M. S. (1996). Characterization of gelatinases linked to extracellular matrix invasion in ovarian adenocarcinoma: purification of matrix metalloproteinase 2. *Gynecol Oncol* 62, 89-99.

Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C. M., Carcangiu, M. L., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6414-6418.

Zanetta, G., Rota, S., Chiari, S., Bonazzi, C., Bratina, G., and Mangioni, C. (2001). Behavior of borderline tumors with particular interest to persistence, recurrence, and progression to invasive carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 19, 2658-2664.

Zeimet, A. G., Muller-Holzner, E., Schuler, A., Hartung, G., Berger, J., Hermann, M., Widschwendter, M., Bergelson, J. M., and Marth, C. (2002). Determination of molecules regulating gene delivery using adenoviral vectors in ovarian carcinomas. *Gene Ther* 9, 1093-1100.

Zeng, C., Toole, B. P., Kinney, S. D., Kuo, J. W., and Stamenkovic, I. (1998). Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers. *Int J Cancer* 77, 396-401.

Zheng, L., Annab, L. A., Afshari, C. A., Lee, W. H., and Boyer, T. G. (2001). BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9587-9592.

## VII. Anhang

### Danksagung

Frau Prof Weiß danke ich herzlich für die Erstellung des Erstgutachtens, ihre Betreuung und Interesse an der Arbeit sowie für Anregungen und Diskussion.

Herrn Prof. Weidle möchte ich für seine Betreuung der Arbeit und seine ständige Bereitschaft bei Fragen und Diskussionen sowie seine Unterstützung bei der Erstellung der Veröffentlichungen danken.

Frank Diehl (DKFZ, Heidelberg) danke ich für Anleitungen bei der Cluster-Analyse.

Herrn Dr. Deissler (Frauenklinik Ulm) danke ich für seine Hilfe bei der Auswertung des Tumorgewebe-Arrays und für die Bereitstellung der Tumorgewebe.

Bei Gabriele Dietmann und Rolf Juchem möchte ich mich für die praktische Anleitung und Diskussionen bei der Immunhistochemie herzlich bedanken.

Bernhard Kirchner danke ich für hilfreiche Tipps bei der Immunhistochemie.

Erika Herzmann und Georg Fertig danke ich besonders für die freundliche Hilfe in der Zellkultur.

Bei Heike Seul und Olaf Mundigl möchte ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung bei der Immunzytochemie bedanken.

Helmut Burtscher, Ute Baer und Claudia Vetter danke ich für ihre Unterstützung bei den Affymetrix-Analysen und die „Leihgabe“ des LightCycler Gerätes.

Meinen Laborkollegen Vesna Evtimova, Nesrine Tarbe, Marina Schwirzke, die stets für alle Fragen ein offenes Ohr hatten, und besonders Robert de Lange, der bis zum Schluß mit mir die Stellung gehalten hat, danke ich für die gegenseitige Unterstützung und das außergewöhnlich gute Laborklima.

Tanja Schneider und besonders Kirsten Dettmar danke ich für ihre Hilfe beim Korrekturlesen der Arbeit und viele schöne Plauderstunden.

Meinen Eltern, vorallem meinem Vater, gilt mein besonderer Dank für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht während des Studiums und der Promotion.

Bei meinem Freund Marc möchte ich mich ganz besonders für seine ständige geduldige Unterstützung und seinem Glauben an mich bedanken. Ohne Dich hätte ich es nicht geschafft!



**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
AC	<i>Accession Number</i>
Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
Avg Diff	<i>Average Difference</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i> , Zelladhäsionsmolekül
CHGF	<i>Change Factor</i>
Cy3	Indocarbocyanin
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EZM	Extrazelluläre Matrix
<i>et al.</i>	und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , Durchflußzytometrie
FKS	fötales Kälberserum
x g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
Hyg	Hygromycin
IVT	In vitro Transkription
Kap.	Kapitel
kD	Kilodalton

---

M	molar
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
mJ	Millijoule
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MW	Molekulargewicht
NMU	Neuromedin U
N-	Amino-
o.D.	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , offener Leserahmen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>Sodiumchlorid Sodiumcitrat</i> , Zitrat gepufferte Kochsalzlösung
SV40 large T	Simianvirus 40 großes T-Antigen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	<i>Untranslated Region</i> , untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geboren am	8. Juni 1973
In	München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Ausbildungsdaten

Schulbildung	9/79-7/83	Grundschule Gauting
	9/83-7/87	Gymnasium Pullach (Pater-Ruppert-Mayer)
	9/87-6/93	Gymnasium Tutzing
	6/93	Abitur
Studium	11/93-7/00	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität; München Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Humangenetik, Biochemie, Pharmakologie/Toxikologie
	9/99	Diplomprüfung
	11/99-7/00	Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Bandlow am Institut für Genetik Thema: „Suche nach Interaktionspartnern der G $\alpha$ - Untereinheit Gpa2p von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “
Promotion	11/00-4/04	Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwig- Maximilians-Universität München. Durchführung der praktischen Arbeiten bei der Roche Diagnostics GmbH, Pharma Forschung Penzberg, unter der Anleitung von Prof. Dr. U. H. Weidle zum Thema: „Identifizierung von Zielgenen für die Therapie und Diagnose von Ovarkarzinomen“.

## **Veröffentlichungen**

Nicole Euer, Marina Schwirzke, Vesna Evtimova, Helmut Burtscher, Michael Jarsch, David Tarin and Ulrich H. Weidle: *Identification of Genes Associated with Metastasis of Mammary Carcinoma in Metastasis Versus Non-metastatic Cell Lines*, Anticancer Research 22: 733-740 (2002).

Nicole I. Euer, Sepp Kaul, Robert Zeillinger, Ulrich H. Weidle: *Identification of LICAM, JAG2 and Neuromedin U as ovarian-cancer associated antigens*, Oncol Rep. 13(3):375-87 (2005)

## Liste deregulierter Gene aus der Affymetrix-Analyse

Genbezeichnung	OV-MZ-2	OV-MZ-1	DW	GG	HB	HI	OC	OV-MZ-15	OV-MZ-30	OV-MZ-6	OV-MZ-9
<b>Transmembran-Proteine</b>											
ITGB4, Hs.85266	55	18	17	18	6	52	15	37	13	99	22
ITGB8, Hs.52620	2	1	9	14	2	4	-3	14	-3	0	2
TSPAN-1, Hs.38972	4	6	41	365	94	66	17	356	16	30	44
TJP3, Hs.25527	1	7	1	9	16	17	43	9	3	7	11
CLDN3, Hs.25640	-5	0	18	28	162	68	66	14	0	1	20
CLDN4, Hs.5372	0	0	149	141	776	34	464	770	0	0	154
CLDN7, Hs.278562	0	0	9	58	82	80	42	68	1	3	21
PRAME, Hs.30743	35	73	266	21	46	659	66	0	204	61	52
KCNK1, Hs.79351	-2	2	18	15	2	5	2	25	6	75	15
NBMPR (ENT2), Hs.32951	6	8	3	9	7	6	18	3	0	3	2
MUC1, Hs.89603	0	-7	-2	29	147	0	53	4	2	24	14
CELSR3, Hs.55173	4	7	4	1	5	4	19	0	25	4	8
TACSTD1,Ep-CAM,Hs.692	10	6	131	433	392	288	275	359	1	51	239
ABCA2, Hs.94806	0	4	3	-2	4	11	24	2	21	12	26
SORL1, Hs.82845	33	14	5	3	33	13	42	19	23	6	1
CXCR4, Hs.89414	1	0	6	12	6	1	0	81	5	15	28
DDR1, Hs.75562	3	3	3	3	5	5	9	4	8	5	4
TGFBR3, Hs.79059	71	44	-1	1	12	9	1	51	7	19	16
FGFR2, Hs.278581	145	74	0	6	75	79	31	0	0	0	108
FGFR3Hs.1420	21	25	3	0	7	57	7	1	0	4	17
SLC6A8, Hs.187958	63	60	7	0	2	79	23	42	22	23	36
IL6R, Hs.193400	10	19	2	4	4	4	0	2	0	3	0
CDH1 (E-cad) Hs.194657	14	19	24	182	181	252	405	200	0	14	18
ERBB3 (HER3, Hs.199067	0	1	5	79	206	25	440	91	4	36	59
FAT2, Hs.158159	0	0	3	8	5	7	1	2	1	4	3
GPC4, Hs.58367	14	14	14	24	37	126	0	7	0	1	2
UPK1B, Hs.271580	19	3	2	6	47	80	0	7	-5	11	-1
EFNA3, Hs.37054	2	2	1	1	4	2	6	3	3	3	4
NEO1, Hs.90408	54	34	2	-2	15	17	-2	6	19	16	7
JAG2:jagged 2, Hs.166154	4	11	2	12	14	11	12	3	7	11	12
LICAM, Hs.1757	-1	7	27	17	10	24	1	5	-3	15	4
CDH2 (N-cad), Hs.161	-5	-1	-2	-14	-3	-3	-61	-7	-46	-44	-28
CDH4 (R-cad), Hs.89484	-2	-2	-3	-6	-4	-4	-1	1	-3	-3	-16
ICAM1, Hs.168383	-137	-137	-1	-25	-15	0	-137	-5	-137	2	-137
PLXNC1, Hs.286229	-2	-3	-4	-5	-3	0	-5	-2	-9	0	-12
ROR1, Hs.274243	-57	-3	-1	-1	-6	-3	-57	-7	-1	-1	-6
EPHB2, Hs.125124	-6	-9	-1	0	-9	-1	-153	-1	-4	-3	-52
IL7R, Hs.237868	-3	-1	-1	-3	-3	-4	-3	-3	-4	-1	-4
ITGA2, Hs.271986	-48	-48	-5	0	-48	-48	-7	1	-1	0	-48
SLC16A3, Hs.85838	-5	-8	0	-3	-45	-2	-5	-1	0	-1	-5
SLC16A4, Hs.23590	-7	-27	0	-27	-4	-6	0	-17	-15	-27	-8
ADORA2B, Hs.45743	-6	-3	-3	-2	-25	-63	-12	-1	0	-3	-8
F2RL1, Hs.154299	-8	-16	-2	0	-2	-5	-5	3	-2	-8	-8
VLDLR, Hs.73729	-31	-31	-31	0	1	0	-31	0	-31	-31	-2
HLA-F, Hs.110309	-63	-35	-8	-3	-531	-24	-7	-4	-1	0	-4
F2R, Hs.128087	-14	-4	-3	-4	-7	-18	-25	0	1	-6	-4
F2RL1, Hs.168102	-103	-29	-2	1	-4	-11	-6	2	-1	-14	-11
PROCR, Hs.82353	-1	-1	-7	-5	-18	-7	-6	0	-3	-1	-17
MRC OX-2, Hs.79015	-14	-11	-8	-7	-4	0	-18	-121	-25	-17	-16
OSMRB, Hs.238648	-3	-4	-3	-2	-3	-3	-4	0	1	0	-8
B2, Hs.239809	0	2	0	-35	-6	-10	-4	-10	-8	-2	-20
FLRT2, Hs.48998	1	2	-2	-4	-7	-5	-2	-4	-5	-2	-4
TIA-2, Hs.135150	1	1	-1	-10	-18	-3	-24	-2	-16	-19	-27

Genbezeichnung	OV-MZ-2	OV-MZ-1	DW	GG	HB	HI	OC	OV-MZ-15	OV-MZ-30	OV-MZ-6	OV-MZ-9
GPRC5B, Hs.242407	-15	-15	-10	-23	-5	-7	-47	-6	-38	-11	-24
PMP-22 (Gas-3), Hs.103724	-1	-2	-2	-3	-3	-2	-5	-5	1	-1	0
EMP3, Hs.9999	-7	-3	0	-4	-100	-6	-171	-1	0	0	-13
<b>Sezernierte Proteine</b>											
APOE, Hs.169401	378	753	0	46	76	681	333	0	0	0	9
TGFA, Hs.170009	1	1	12	24	1	4	4	12	6	11	-1
FGF18, Hs.49585	14	13	121	100	0	258	0	27	0	0	11
SERPINB1, Hs.183583	14	0	91	216	34	190	8	149	73	352	64
SERPINI1, Hs.78589	0	12	7	11	0	31	35	6	26	1	13
SLPI, Hs.169793	270	405	409	980	765	862	43	853	14	715	15
CTSH, Hs.288181	18	15	1	2	2	5	3	1	0	2	3
CTSL2, Hs.87417	67	32	3	4	3	52	5	2	-4	5	11
NMU, Hs.2841	1	10	17	79	25	47	20	22	0	3	13
MDK, Hs.82045	10	14	4	-46	3	10	-3	2	-46	-1	9
IGFBP2, Hs.162	24	23	18	28	76	64	11	34	-13	-1	1
HBP17, Hs.1690	1	-1	89	57	1	26	9	445	3	230	114
WFDC2, Hs.2719	0	0	138	40	645	292	3	279	0	69	0
BDNF, Hs.56023	-4	-7	-3	-1	-18	-10	-44	-2	-6	-9	-47
TGFBI, Hs.118787	-160	-973	-2	-1	-973	-347	-973	-1	-463	-2	-973
IGFBP5, Hs.103391	-1	-1	-57	-625	-625	-10	-1	-625	-625	-625	-625
IGFBP7, Hs.119206	-47	-25	-1	-1	-4	-3	-36	0	-115	-324	-155
IL8, Hs.624	-598	-598	0	0	-7	-598	-598	0	-2	1	-58
PTX3, Hs.2050	-546	-33	-1	-2	-31	-125	-546	-23	-546	0	-546
CXCL1, Hs.789	-25	-42	0	0	-657	-2	-657	0	-657	1	-657
SCYA5, Hs.241392	-10	-7	-12	-7	-9	-15	-11	-12	-8	-6	-15
SPUVE, Hs.325820	-493	-493	-6	-13	-5	-2	-493	-1	-1	-11	-493
ADAMTS3, Hs.27916	1	1	-4	0	-8	-4	-5	0	-22	-4	-4
C1R, Hs.1279	-1	-1	-4	-244	-3	-5	-25	-9	-5	-1	-11
WNT5A, Hs.152213	1	1	-1	-258	-5	-1	-28	-14	-258	-166	-44
DKK1, Hs.40499	-242	-49	-47	-27	-242	-242	-1	-1	-1	0	-242
PLAU, Hs.77274	-22	-25	0	0	-24	-28	-50	0	-26	1	-3
SERPINE1, Hs.82085	-48	-72	-2	-114	-172	-35	-274	-4	-9	-38	-113
SERPING1, Hs.151242	-1	0	-5	-3	-2	0	-5	-7	-14	-1	-3
MMP1, Hs.83169	-30	-3	-33	-20	-83	-102	-213	-96	-231	-13	-13
BMP1, Hs.1274	0	0	-4	-5	-3	-3	-5	-1	-1	-2	-8
QSCN6, Hs.77266	-263	-32	-2	-7	-4	-2	-263	-5	-2	-16	-263
SPARC, Hs.111779	0	-1	0	-8	-79	-1	-558	-17	-309	-38	-71
EFEMP1, Hs.76224	-2	-2	-9	-13	-32	-7	-1	-2	-72	-127	-63
STC2, Hs.155223	-6	-24	-8	-7	-8	-55	0	1	-8	-9	-8
FN1, Hs.118162	-40	-55	0	0	-989	-6	-26	-1	-989	-287	-989
PRG1, Hs.1908	-14	-288	-1	-122	-55	-40	-12	0	-275	-102	-137
HXB, Hs.289114	-577	-577	-2	-4	-45	-5	-262	-22	-577	0	-577
SCG2, Hs.75426	-1	-25	-3	-48	-8	-6	-48	-2	-48	-2	-48
SLIT2, Hs.29802	-8	-3	-1	-8	0	-4	-22	-11	-21	-1	-17
FGF2, Hs.284244	-17	-6	-10	-7	-19	-9	-26	-1	-2	-102	-23
TGFBI, Hs.1103	-3	-4	-2	-3	-17	-2	-8	-2	0	-5	-2
VEGF, Hs.73793	-4	-7	-1	-3	-1	-2	-4	-4	1	-3	-1
DTR, Hs.799	-78	-78	-78	0	-78	-25	-78	0	-5	-60	-78
IL6, Hs.93913	-81	-180	-1	0	-624	-23	-624	0	-20	-3	-624
CCL2, Hs.303649	-16	-23	-66	-41	-7	-51	-63	-4	-70	-3	-62
CYR61, Hs.8867	-23	-25	-3	-1	-3	-1	-5	0	0	-17	-29
<b>Enzyme</b>											
CKB, Hs.173724	21	20	1	12	7	3	3	2	2	14	13
SAH, Hs.512678	-1	5	3	5	9	3	25	8	2	8	10
ASS, Hs.160786	11	9	7	3	15	9	2	1	-2	9	1
ATP9A, Hs.70604	2	2	2	5	2	13	1	6	-4	0	-1
AKRIC3, Hs.78183	-1	0	33	5	0	7	1	16	67	183	96
POLR2J, Hs.80475	17	14	28	0	26	65	0	35	90	0	0
IMPA2, Hs.5753	6	5	6	5	3	3	8	2	21	12	7
NUDT3, Hs.4815	8	5	2	3	3	1	3	1	2	3	2

Genbezeichnung	OV-MZ-2	OV-MZ-1	DW	GG	HB	HI	OC	OV-MZ-15	OV-MZ-30	OV-MZ-6	OV-MZ-9
CDS1, Hs.380684	32	36	14	135	36	115	132	75	11	3	18
PIB5PA, Hs.21492	16	21	8	0	38	0	56	15	0	0	30
HASJ4442, Hs.155020	5	4	4	1	18	2	5	2	3	1	2
GSTZ1, Hs.26403	3	2	10	-3	7	6	12	4	6	11	-3
ALDH5A1, Hs.5299	13	15	2	3	21	10	6	1	-4	4	4
FABGL, Hs.288354	3	4	1	5	4	6	20	1	3	4	2
GALNT3, Hs.55823	-1	-3	5	26	22	23	21	24	0	-2	4
BCKDHB, Hs.1265	3	3	0	1	4	2	2	2	3	2	5
UGT2B7, Hs.10319	2	1	3	124	72	59	0	85	25	60	2
GMDS, Hs.105435	4	1	3	3	52	10	5	2	7	6	7
ACY1, Hs.334707	1	0	3	2	1	3	4	2	2	3	2
NDUFB7, Hs.661	1	-5	4	9	6	6	-9	2	3	2	3
CA2, Hs.155097	-1	-2	6	182	2	146	-1	37	3	5	-1
UBE2L6, Hs.169895	-5	-4	-2	-3	-2	0	-2	-1	-286	-2	-16
UBE1L, Hs.16695	-2	-4	-1	-4	-2	-1	-3	-2	-3	-2	-4
P4HA2, Hs.3622	-3	-4	-2	0	-2	-3	-5	-1	0	-1	-4
LOX, Hs.102267	-1	-3	-15	-8	-28	-7	-24	0	-35	-29	-27
SAC2, Hs.52463	-29	-29	-1	-4	-7	-6	-2	-1	-1	-1	-3
UAP1, Hs.21293	-4	-2	-3	-1	-2	-3	-2	-4	-3	-1	-4
GBE1, Hs.1691	-4	-3	-1	-1	-2	-3	-2	-5	0	-1	-8
PLSCR1, Hs.198282	-2	-3	-4	-1	-3	-1	-7	-1	-4	-3	-20
DPYSL3, Hs.74566	0	0	0	-9	-4	-23	-427	-6	-427	-427	-427
NMT2, Hs.122647	-4	-3	0	-3	-6	-5	-3	-3	-2	-2	-3
MYLK, Hs.211582	-42	-18	-1	0	-5	0	-116	0	-116	-14	-116
ALDH1A3, Hs.75746	-55	-98	-1	-1	-10	-4	-22	0	-181	1	-15
CA12, Hs.5338	-44	-8	-2	-73	-10	-1	6	-8	-73	-41	-73
PSMB9, Hs.9280	-4	-5	-5	-2	-11	-5	-5	-2	-1	-1	-10
OAS2, Hs.264981	-7	-10	-16	-10	-12	-5	-12	-10	-12	-12	-13
DRADA2b, Hs.85302	-5	-2	-15	-4	-1	-12	-15	-3	-2	-2	-3
<b>Intrazelluläre Signalmoleküle</b>											
TPD52, Hs.2384	5	1	3	11	7	4	-1	6	5	4	15
SFN, Hs.184510	0	0	7	8	2	3	6	8	5	8	10
PEPP3, Hs.241161	4	-1	4	15	7	8	32	4	6	5	-1
PDE9A, Hs.18953	8	22	0	19	107	18	0	12	0	11	0
RAGD, Hs.235634	8	16	5	6	48	10	4	27	0	45	43
EPAC, Hs.8578	0	0	26	83	56	251	0	15	0	3	4
CNP, Hs.150741	7	4	3	4	5	6	6	5	14	5	6
SPRY1, Hs.88044	2	3	5	24	6	21	4	15	3	2	38
JUP, Hs.2340	2	1	3	6	5	6	4	5	0	0	1
DVL1, Hs.74375	5	2	2	2	5	2	1	3	2	1	5
MADH6, Hs.153863	16	23	8	4	9	34	-3	3	16	6	11
MAPKAPK3, Hs.227789	-6	-29	6	8	3	2	4	6	7	3	0
MAPK8IP2, Hs.80545	3	8	2	-2	-2	2	4	2	-2	-2	2
PTK6, Hs.51133	0	3	13	4	1	4	38	2	10	13	4
SH3BGR, Hs.47438	4	4	3	0	1	2	10	1	5	3	6
ARHGEF4, Hs.6066	2	4	29	6	0	3	0	43	30	103	12
ARHGAP8, Hs.102336	4	9	2	17	22	26	27	32	0	11	35
DUSP3, Hs.181046	7	0	15	9	3	30	25	12	32	10	6
PTPRM, Hs.154151	1	0	8	13	7	13	-4	25	15	20	0
ARHD, Hs.15114	85	0	0	281	0	231	227	241	197	36	15
FYN, Hs.169370	0	0	-2	-1	-2	-4	-255	-3	-255	-8	-3
ARHE, Hs.6838	-6	-5	0	-1	-16	0	-6	0	-4	-2	-6
SYNJ2, Hs.61289	-1	-1	0	-4	-7	-7	-3	-2	-9	0	-12
MAPRE2, Hs.78335	-8	0	-15	-86	-121	-21	-13	-2	-4	-8	-8
DLC-1, Hs.8700	-4	-6	-16	-2	-443	-28	-443	-1	-55	-4	-443
LNK, Hs.13131	-4	-3	1	-3	-4	-4	-5	-1	1	0	-2
RAB32, Hs.32217	-7	-5	0	-3	-18	-1	-1	-2	-2	-4	-135
ADCY7, Hs.172199	-31	-8	-2	0	-13	-3	-66	-1	-5	-2	-1
CASP6, Hs.3280	0	0	-2	-3	-11	-11	0	0	-3	-90	-2

Genbezeichnung	OV-MZ-2	OV-MZ-1	DW	GG	HB	HI	OC	OV-MZ-15	OV-MZ-30	OV-MZ-6	OV-MZ-9
STK18, Hs.172052	-2	-3	-1	-2	-9	-7	-2	-4	-1	-5	-3
GPRK5, Hs.211569	2	0	-3	-8	-9	-16	-9	1	-1	-3	-5
JIK, Hs.12040	-10	-23	-4	-4	-2	-6	-1	-4	-1	-1	-12
IRF7, Hs.166120	-9	-51	-4	-2	-9	-28	-8	-6	-1	-4	-1
QKI, Hs.15020	-6	-10	2	-2	-11	-12	-23	-1	-14	-2	-10
<b>Zellzyklus-Regulatoren</b>											
CCNE1, Hs.9700	1	0	3	30	8	8	2	3	7	1	11
MAP-1, Hs.24719	1	2	1	3	6	7	2	5	1	4	7
E2F5, Hs.2331	4	6	1	10	3	1	4	6	5	1	4
BTG2, Hs.75462	8	9	0	0	9	6	1	5	0	4	3
MIG2, Hs.75260	0	0	-2	-4	-7	-6	-2	-4	-1	-1	-5
GAS6, Hs.78501	-49	-9	0	0	-7	-2	-16	9	0	-27	-49
CCNA1, Hs.79378	-92	-4	2	2	-1	1	-25	-14	-92	-11	-3
CDKN1A, Hs.179665	-5	-5	-2	-26	-28	-2	-2	2	0	0	-3
DAB2 (DOC-2), Hs.81988	-57	-6	-13	-20	-158	-13	-182	-10	-103	-4	-48
TSC403, Hs.10887	-105	-105	-7	-4	-39	-1	-105	-10	-105	-5	-61
<b>EZM-Proteine</b>											
PKP3, Hs.26557	-4	-9	5	9	12	12	13	8	10	3	1
LAMB3, Hs.75517	-1	-9	25	19	5	3	-1	19	1	32	2
COL5A2, Hs.82985	-8	-6	-16	-589	-51	-63	-141	-24	-186	-59	-237
COL6A3, Hs.80988	-17	-24	-3	-4	-10	-24	-14	-14	-1	-11	-14
COL7A1, Hs.1640	2	0	4	-6	-19	-5	-6	-8	-7	-2	-5
COL8A1, Hs.114599	-14	-11	-4	-3	-14	-11	-14	-14	-27	-9	-32
FBN1, Hs.750	-6	-4	-3	-2	-183	-4	-183	-16	-11	-183	-183
EFEMP2, Hs.6059	-1	-1	-2	-7	-5	1	-16	-2	-10	-5	-12
MATN3, Hs.234386	-4	0	-3	-2	-37	-26	0	-3	-37	-37	-25
LPXN, Hs.49587	-5	-4	-6	-7	-6	-5	-4	-7	-6	-7	-4
LUM, Hs.79914	5	10	-9	-7	-5	-9	-2	-11	-8	-6	-14
BGN, Hs.821	-5	-2	-4	-8	-5	-6	-13	-8	-6	-7	-5
TIA-2, Hs.135150	1	1	-5	-23	-267	-2	-267	-4	-267	-267	-267
KALL, Hs.3730	-4	-4	-2	-4	0	0	-6	-2	-3	-32	-3
<b>Transkriptionsfaktoren</b>											
ZIC1, Hs.41154	289	381	56	25	1	89	0	0	2	11	1
ZNF212, Hs.108139	24	20	2	0	71	30	28	16	41	6	0
ZNF165, Hs.55481	0	0	15	164	27	27	37	84	75	22	28
LOC58495, Hs.71935	0	13	18	54	37	51	55	47	18	22	62
H2BFE, Hs.182432	3	7	3	2	15	5	12	-6	2	6	10
H2BFC, Hs.137594	2	3	3	2	17	6	9	-2	2	6	13
MTA1, Hs.101448	89	89	17	25	96	22	40	32	3	18	24
Rad17-like, Hs.16184	-2	1	3	2	3	1	4	3	10	2	2
CREG, Hs.5710	20	14	2	6	10	20	25	4	10	8	8
SATB1, Hs.74592	8	117	31	11	7	5	276	49	0	18	0
Pig7, Hs.76507	2	3	2	4	1	3	4	9	-1	3	0
ATDC, Hs.82237	18	10	3	4	7	15	4	3	0	9	1
MYBL1, Hs.300592	-5	-3	-3	0	-3	-3	2	-1	0	-2	-3
SIM2, Hs.27311	-32	-3	-2	-2	-6	-28	-7	1	-6	0	-5
UKLF, Hs.21599	-12	-6	-5	-5	-16	-3	-3	-2	-1	-2	-1
KLF7, Hs.21599	-101	-6	-12	-12	-101	-34	-20	-2	-5	-3	-11
TNRC3, Hs.21858	-8	-3	0	-3	-42	-43	-39	-8	-2	0	-16
HNF-3 alpha, Hs.299867	-34	-34	-7	-34	0	-2	10	0	-34	-20	-3
AML1, Hs.129914	-54	-54	-1	-54	-54	-54	-7	1	-54	0	-54
MEIS2, Hs.104105	0	1	-4	-23	-3	-6	-10	-24	-70	-5	-70
HOXA5, Hs.37034	-1	-1	-4	-62	-6	-167	-29	-9	0	-167	-167
HOXC6, Hs.820	-1	0	-3	-66	-2	-3	0	-5	-3	-2	-4
NR3C1, Hs.75772	-4	-5	-1	0	-4	-2	-51	-2	0	-1	-51
SP-100, Hs.77617	-15	-93	-3	0	-4	-3	-4	-5	-3	-2	-31
Nrf3, Hs.404741	-20	-4	-2	0	-11	-2	-6	-2	0	-2	-10
NEDD4, Hs.1565	-8	-5	-2	-4	-35	-35	-2	4	-1	0	-4
OTK18, Hs.119014	-7	-7	-4	-5	-3	-22	-17	-5	-2	-5	-7
ELL2, Hs.173334	-3	-6	-4	-4	-15	-1	-3	-2	0	-2	-8



Genbezeichnung	OV-MZ-2	OV-MZ-1	DW	GG	HB	HI	OC	OV-MZ-15	OV-MZ-30	OV-MZ-6	OV-MZ-9
<b>Zytoskelett-Proteine</b>											
EMAPL, Hs.12451	2	2	2	0	5	5	2	3	7	1	3
EMD, Hs.2985	5	5	8	0	4	5	0	2	5	1	7
TNNI3, Hs.120036	28	24	0	6	66	15	11	5	0	0	113
ABLIM, Hs.158203	57	29	11	54	162	458	50	86	0	21	44
PPL, Hs.74304	17	7	30	19	7	37	20	18	-8	5	1
MTM1, Hs.75302	0	3	10	0	8	9	13	6	6	0	1
KRT19, Hs.182265	4	2	2	6	5	6	7	5	1	3	2
DMD, Hs.169470	1	-1	-24	-2	-3	-4	0	-9	-20	-27	-41
TPM1, Hs.77899	-3	-3	-2	-1	-1	-2	-2	0	-6	-12	-11
TPM2, Hs.300772	-11	-8	0	-1	-29	0	-608	-126	-347	-65	-47
FLNC, Hs.58414	2	1	-4	-5	-181	0	-35	0	-26	-10	-16
ACTA2, Hs.195851	-245	-16	-5	-380	-71	-19	-6	-1	-13	-1	-126
MYRL2, Hs.9615	0	-1	-2	-103	-358	0	-4	-358	-358	-18	-1
<b>Proteine anderer Funktion</b>											
TM7SF2, Hs.31130	23	26	3	6	46	61	67	16	19	20	16
INADL, Hs.321197	0	2	1	4	12	4	6	4	2	2	2
EEF1A2, Hs.2642	3	13	3	-3	-1	9	10	1	-2	17	2
UCP2, Hs.80658	2	2	1	10	15	19	10	8	6	1	3
MT1L, Hs.94360	-1	-1	13	15	-1	11	-1	10	43	5	99
CRIP1, Hs.17409	38	32	62	45	0	184	119	-2	0	12	92
RPS25, Hs.113029	2	4	3	0	2	2	1	6	4	3	9
CYP1A1, Hs.72912	2	2	8	14	8	21	3	3	62	13	45
CRABP2, Hs.183650	117	-1	-1	6	105	72	133	18	0	13	-1
PARD6A, Hs.112933	0	1	2	5	-1	3	18	5	3	7	11
APIG2, Hs.8991	15	2	3	0	1	18	5	13	5	6	-3
PEX7, Hs.79993	4	6	9	1	12	19	10	3	10	6	17
DLG3, Hs.272438	0	0	16	5	24	17	24	26	3	5	31
LAK-4p, Hs.16165	-11	1	3	2	6	11	11	3	8	25	7
ETFB, Hs.74047	17	2	30	-1	51	95	54	17	78	56	93
IF2, Hs.158688	0	-1	-2	-1	-3	-1	-2	-4	-4	-2	-6
ANXA8, Hs.87268	7	6	-5	-2	-119	-2	-119	-43	-2	-1	-119
SRPX, Hs.15154	-4	-6	-3	-4	-7	-12	-6	0	-16	-5	-7
FEZ1, Hs.79226	-3	-1	0	-17	-15	-16	-1	1	-96	-96	-43
TAGLN, Hs.75777	-2	-4	-6	-18	-2	-1	-10	-5	-22	-16	-5
DNAJB5, Hs.237506	-1	-3	-7	0	1	-7	-7	-7	1	-2	-5
SEL1L, Hs.181300	-5	-5	-5	-5	3	0	4	-2	-2	3	-5
PDLIM1, Hs.75807	-2	-5	-1	-3	-4	-3	-3	0	-31	-4	-16
SEC24D, Hs.19822	-3	-2	-1	-2	-2	-1	-5	-2	-1	-3	-2
P311, Hs.142827	-1	0	-3	-4	-1	-3	-13	-7	-98	-8	-46
UTX, Hs.13980	0	0	-2	-4	-3	-11	-2	-3	-1	-3	0
TRIM14, Hs.179703	-2	-3	-2	-3	-8	-3	-3	-2	-1	-2	-4
GIP2, Hs.833	-11	-10	-24	-1	-30	-1	-139	-4	-1	-4	-1
IFI16, Hs.155530	0	0	-7	-10	-2	-4	-51	-1	-60	-1	-160
IFIT1, Hs.20315	-47	-24	-68	-6	-27	-2	-27	-7	-2	-11	-31
RIG-G, Hs.181874	-345	-59	-42	-5	-40	-5	-156	-2	-6	-24	-605
IFP35, Hs.50842	-5	-13	-2	-6	-19	-2	-4	-10	-3	-2	-76
LEU13, Hs.146360	-514	-197	0	-3	-1	-1	-11	-12	-514	-2	-17
MTAP44, Hs.82316	-30	-38	-22	-3	-9	-3	-24	-21	-15	-2	-35
SAMHD1, Hs.371264	-7	-46	-5	-5	-6	-4	-7	-11	-1	-5	-22
RTVP1, Hs.64639	-5	-8	-3	-2	-22	-6	-11	-1	-18	-13	-18
SEP2, Hs.90998	-2	-1	-1	-5	-2	-39	-7	-3	-4	-1	-1
GBP1, Hs.62661	-16	-10	-13	-4	-1	-2	-13	-3	-104	-6	-104
RI58, Hs.27610	-2	-3	-17	-2	-3	-2	-12	0	0	-2	-10
APIS2, Hs.40368	-6	-6	-1	-11	-5	-33	-1	0	-2	-1	-3
<b>Proteine unbekannter Funktion</b>											
KIAA0626, Hs.178121	0	0	4	0	12	6	6	4	22	7	4
KIAA0633, Hs.33010	116	211	13	23	45	18	85	131	0	42	26
MGC2650, Hs.61273	9	13	2	0	11	6	4	4	2	5	8
DKFZp564O222, Hs.94795	18	11	4	0	4	3	1	3	-4	2	-5

Genbezeichnung	OV-MZ-2	OV-MZ-1	DW	GG	HB	HI	OC	OV-MZ-15	OV-MZ-30	OV-MZ-6	OV-MZ-9
RG113D17, Hs.95594	54	63	0	81	8	51	4	31	0	0	0
KIAA1036, Hs.155182	4	4	1	0	3	2	5	1	2	4	-1
KIAA0906, Hs.56966	39	57	45	15	90	20	66	60	5	63	27
DKFZp761F2014, Hs.6434	6	42	3	0	0	21	21	0	0	54	12
AP001554, Hs.184093	7	4	9	23	5	11	0	48	2	45	7
DKFZp586F1318 Hs.25213	2	6	3	12	9	2	19	12	-4	4	7
KIAA0878, Hs.188006	-21	-21	-2	-5	-144	-1	-9	-1	-51	-23	-92
KIAA0084, Hs.79123	-3	-5	-4	-4	-25	-12	-140	-2	-78	-161	-71
KIAA1237, Hs.1049	-1	-1	-1	-19	-11	-5	-26	-5	-7	-15	-104
KIAA1010, Hs.23860	-3	-4	-1	-2	-1	-9	-7	1	-2	0	-92
KIAA0206, Hs.79299	-26	-10	-1	-2	-3	-4	-11	-4	-1	-1	-7
DKFZp564B222, Hs.100261	-39	-6	-2	0	-32	0	-129	1	-129	-5	-129
KIAA1237, Hs.10491	-1	-1	-1	-6	-3	-4	-13	-2	-3	-5	-11
KIAA0750, Hs.173416	-17	-146	0	0	-2	-3	-11	1	0	-146	-146
KIAA1487, Hs.437241	-2	-27	-2	-3	-13	-6	-2	-5	-1	-1	-11
KIAA1750, Hs.173094	1	1	-43	2	-36	1	-30	-43	-3	-43	-43
DKFZp586E1621, Hs.35861	-17	-5	-2	-15	-11	-8	-19	-7	0	-2	0

Tabelle 16: Liste aller Gene, die mittels Affymetrix Genchip Analyse in 7 von 11 Ovarialtumor-Zelllinien im Vergleich zu 2 IOSE-Referenz-Zelllinien mit einem CHGF von mind.  $\pm 2$  differentiell exprimiert sind. Die Gene sind in zehn Kategorien eingeordnet und nach der Unigene-Datenbank annotiert.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Penzberg, den 2004