

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat

**DAS EXPRESSIONSVERHALTEN DES
TUMORSUPPRESSORS MASPIN
BEIM OVARIALKARZINOM
UND SEINE PROGNOTISCHE BEDEUTUNG**

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

Vorgelegt von

MARION HABERMANN
aus Soltau

Kiel 2010

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Röcken, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 13.02.2012

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Allgemein	1
1.2 Karzinogenese	1
1.3 Das Ovarialkarzinom	2
1.3.1 Ätiologie	2
1.3.2 Histologie	4
1.3.3 Einteilung	6
1.3.4 Klinik	8
1.3.5 Therapie	9
1.4 Maspin	11
1.5 Fragestellung	11
2. Kollektiv, Materialien und Methoden	14
2.1 Patientenkollektiv	14
2.2 Materialien	17
2.2.1 Biochemikalien	17
2.2.2 Geräte	18
2.2.3 Verbrauchsmaterialien	19
2.2.4 Gebrauchsfertige Kits	19
2.2.5 Zellmaterial für die Real Time PCR	20
2.3 Methoden	21
2.3.1 Immunhistochemie	21
2.3.2 Zellkultur	26
2.3.3 Real Time PCR	28
3. Ergebnisse	32
3.1 Auswertung der immunhistochemischen Maspinfärbungen	32
3.2 Immunhistochemische Beispielbilder	36
3.3 Ergebnisse der Real Time PCR	38

4. Diskussion	40
4.1 Diskussion der Ergebnisse und Faktoren, die diese beeinflussen können	40
4.2 Ausblick	45
5. Zusammenfassung	47
6. Anhang	49
6.1 Abkürzungsverzeichnis	49
6.2 Klassifikation epithelialer Ovarialtumoren nach WHO	51
6.3 Literaturverzeichnis	52
7. Danksagung	59
8. Lebenslauf	60

1. Einleitung

1.1 Allgemein

In Deutschland stehen Krebserkrankungen mit 26,2% hinter Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (42,2%) an zweiter Stelle der Mortalitätsstatistik (Statistisches Bundesamt, 2010). Nach Schätzung des Robert Koch Institutes sind im Jahre 2006 426.800 Krebsneuerkrankungen (Männer: 229.200, Frauen: 197.600) aufgetreten. 2006 sind ca. 9.670 Frauen an einem Ovarialkarzinom erkrankt. Der Anteil der Ovarialkarzinome an allen malignen Tumoren der Frau entfällt somit auf etwa 4,9%, im Vergleich zum häufigsten malignen Tumor der Frau, dem Mammakarzinom, mit 29,3% (57.970 Neuerkrankungen in 2006) (Robert Koch Institut, 2010). Die Inzidenz hat sich mit 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen im Jahr in den letzten Jahrzehnten kaum geändert. Die Mortalität hat sich nur gering verbessert. Obwohl sich die Prognose in der Zwischenzeit leicht verbessert hat, ist sie dennoch als schlecht einzustufen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt zwischen 35% und 49% (Robert Koch Institut, 2010).

1.2 Karzinogenese

Für die Entstehung einer Krebserkrankung ist meist nicht nur eine einzige Ursache verantwortlich, sondern eine Kombination aus mehreren verschiedenen Faktoren. Die Karzinogenese ist ein Prozess, der in mehreren Schritten abläuft. Die daraus resultierende Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung geht davon aus, dass sich der maligne Tumor aus einer Reihe von Defekten in verschiedenen Genen über viele Jahre hinweg entwickelt. Die beiden wichtigsten Systeme, die bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen, stellen die Onkogene und Tumorsuppressorgene mit ihren Genprodukten dar. Onkogene sind normale Gene, die für Proteine codieren, die Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle regulieren. Störungen in diesem System, beispielsweise durch Mutationen, können zu veränderten Regulationsmechanismen führen. So können qualitativ veränderte Genprodukte eine eigenständige biologische Aktivität entfalten (man spricht in diesem Zusammenhang auch von konstitutiver Aktivierung) oder es kann zu einer übermäßigen Synthese bestimmter Proteine kommen. Folge sind deregulierte oder auch gesteigerte Funktionen des Gens bzw. des Genproduktes.

Tumorsuppressorgene codieren für Proteine, die den Onkogenen entgegenwirken. Es handelt sich um normale Gene, deren Genprodukte supprimierende Wirkung (z.B. auf das Zellwachstum) haben. Durch Mutationen kann es zur Inaktivierung von den Tumorsuppressorgenen kommen, was in der Folge mit einer deregulierten Proliferation einhergeht. Allgemein anerkannt ist die Aussage, dass sowohl die Aktivierung der Onkogene, als auch die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene für die Krebsentstehung erforderlich sind. Für das weitere Wachstum benötigt ein Tumor ab einer Größe von ca. 2 mm eine eigene Gefäßversorgung (Böcker et al., 2004). Bis zu einer Tumorgöße von 1-2 mm können die Tumorzellen per Diffusion aus der Umgebung ernährt werden. Um die Gefäßversorgung zu gewährleisten, müssen die Tumorzellen in der Lage sein, Gewebe zu infiltrieren. Durch Sekretion und Aktivierung von einer Reihe verschiedener Proteasen, wie zum Beispiel die Metallo- oder Serinproteasen, wird die Degradation ermöglicht. Zusätzlich werden u.a. der Tumor-Angiogenese-Faktor (TAF), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (β -FGF) und der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sezerniert. Dadurch wird das Einsprossen von Kapillaren und Fibroblasten ermöglicht, über die der Tumor dann ernährt werden kann und Stoffwechselprodukte abtransportiert werden.

Neben der Angiogenese kommt es durch die Degradation auch zum Einbruch in kleine Blutgefäße, Lymphgefäße und Körperhöhlen und somit zur Metastasierung, also Verschleppung von Tumorzellen an einen anderen Ort. Die Aktivität der Proteasen kann durch sogenannte Proteaseinhibitoren gehemmt werden, wodurch eine Degradation verhindert wird (Böcker et al., 2004).

1.3 Das Ovarialkarzinom

1.3.1 Ätiologie

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist bisher noch weitgehend unklar. Mehr als 90% der Neuerkrankungen treten sporadisch auf, bei den restlichen Karzinomen findet sich eine genetische Komponente (Gerber et al., 2006). Epidemiologische Daten stützen die Hypothese der „incessant ovulation“. Nach dieser Theorie begünstigt die wiederholte Ruptur und Proliferation des Oberflächenepithels im Rahmen der Wundheilung nach der Ovulation durch häufige Zellteilung das Mutationsrisiko und somit die Entstehung eines Ovarialkarzinoms. Terry et al zeigten in ihrer Arbeit 2007, dass ein stark positiver Trend zwischen der Anzahl der Ovulationen und dem Risiko der Entwicklung eines Ovaralkarzinoms besteht (Terry et al., 2007).

Daher geht eine geringe Anzahl an Ovulationen mit einem verminderten Karzinomrisiko einher. Zu den risikoreduzierenden Faktoren zählen somit Schwangerschaften (Risikominderung um 13-19% pro ausgetragener Schwangerschaft), die Einnahme von Ovulationshemmern (Risikominderung je nach Einnahmedauer um 30-80%), eine späte Menarche und eine frühe Menopause. Auch eine Hysterektomie oder Tubenligatur scheint mit einem verminderten Risiko für ein Ovarialkarzinom einherzugehen, da hierdurch ein möglicher retrograder Transport von Karzinogenen (z.B. aufsteigenden Infektionen) unterbunden wird. Dem gegenüber stehen als Risikofaktoren eine geringe Anzahl an Schwangerschaften bzw. Nulliparität, frühe Menarche, späte Menopause, aber auch andere Faktoren, wie zum Beispiel das Alter oder Adipositas (Gerber et al., 2006; Stauber et al., 2005). Das Lebenszeitrisko einer Frau ein Ovarialkarzinom zu entwickeln, beträgt bei negativer Familienanamnese 1,6%. Das Risiko erhöht sich auf über 5%, wenn bei einer Verwandten ersten Grades ein Ovarialkarzinom aufgetreten ist und auf über 7% wenn zwei oder mehr Verwandte betroffen sind (siehe Tabelle 1).

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

Tab. 1 Ovarialkarzinomrisiko bei positiver Familienanamnese (aus Gerber et al., 2006)

Hinsichtlich der genetischen Komponente sind zwei Syndrome zu nennen, die mit einem erhöhten Risiko für das Ovarialkarzinom einhergehen. Hierbei handelt es sich um das Mamma-Ovarialkarzinom-Syndrom und das Lynch-Syndrom II.

Für 85-90% aller erblich bedingten Krebsfälle ist das Mamma-Ovarialkarzinom-Syndrom (HBOC = hereditary breast-ovarian cancer) verantwortlich. Ursächlich liegt dem eine inaktivierende Mutation zugrunde, vor allem des BRCA1-Gens (80%), seltener ist das BRCA2-Gen (15%) betroffen. Beide Gene sind an den Mechanismen der DNA-Reparatur beteiligt, so dass ein Ausfall die maligne Entartung von Zellen fördert. Bei einer Mutation des BRCA1-Gens beträgt das Risiko für ein Ovarialkarzinom bis zum 70. Lebensjahr etwa 75% (Gerber et al., 2006; Stauber et al., 2005). Das Lynch-Syndrom II (oder auch HNPCC = hereditäres nichtpolypöses Kolorektalkarzinom-Syndrom), nach dem amerikanischen Chirurgen Henry T. Lynch, zeichnet sich durch frühzeitig auftretende Kolorektalkarzinome und einem erhöhten Risiko für verschiedene andere Tumoren, wie beispielsweise dem Endometrium, Magen, Dünndarm und Ureter aus (Lynch et al., 1997). Bei 5-10% der HNPCC-Patienten tritt ein Ovarialkarzinom auf. Grundlage für das Lynch-Syndrom sind Mutationen von DNA-Mismatch-Repair-Genen, vor allem von MSH2, MLH1 und PMS2 (Gerber et al., 2006; Stauber et al., 2005).

1.3.2 Histologie

Das Ovar ist ein paarig angelegtes Organ der Frau im kleinen Becken und besteht aus drei Zelltypen: Keimzellen, Stromazellen und epithelialen Zellen. Je nach Ursprung des Tumors werden somit Keimzelltumore, Stromazelltumore und Tumoren der epithelialen Zellen unterschieden. Zwei Drittel der Tumoren des Ovars gehen aus dem Epithel hervor (Tsunehisa et al., 2003). Nur ca 6% aus den Stromazellen und 25-30% aus den Keimzellen (siehe Abbildung 1). Desweiteren gibt es Tumoren, die sich in keine der genannten Kategorien wiederfinden, da beispielsweise die Histogenese unbekannt ist oder diese Tumoren auch in anderen Organen vorkommen können.

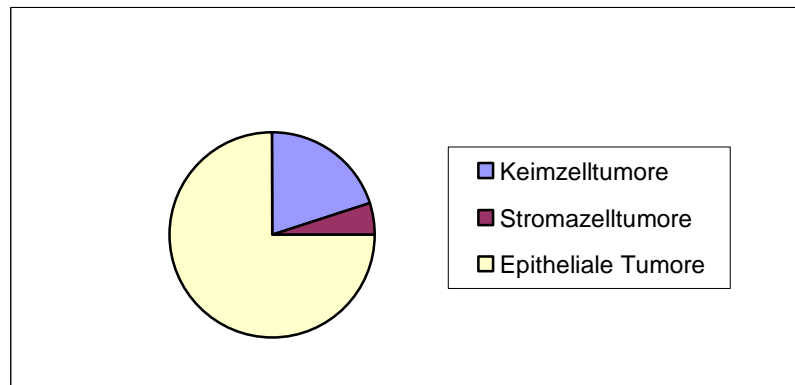


Abb. 1 Darstellung der Verteilung der Ovarialtumoren nach ihrem Ursprung

Die international anerkannten Empfehlungen der WHO (World Health Organization) zur Klassifikation des Ovarialkarzinoms erfolgt anhand histologischer Kriterien (Tabelle 10 im Anhang). Die WHO stellt eine Sonderorganisation der Vereinten Nationen für das international öffentliche Gesundheitswesen dar. Diese unterscheidet beispielsweise bei den epithelialen Tumoren zwischen serösen, muzinösen, endometrioiden und klarzelligen Tumoren, weiterhin zwischen Brenner Tumoren, gemischten und undifferenzierten Tumoren (Baltzer et al., 2004). Der seröse Zelltyp tritt in allen Altersstufen und meist doppelseitig auf. Desweiteren neigt er frühzeitig zu einer Peritonealkarzinose und Metastasierung. Die muzinösen Tumoren kommen auch in allen Altersstufen vor, allerdings eher einseitig. Der endometrioiden Zelltyp tritt überwiegend während der Geschlechtsreife und doppelseitig in Erscheinung. In 20% der Fälle besteht gleichzeitig ein Endometriumkarzinom (Baltzer et al., 2004; Feige et al., 2006). Eine Sonderstellung nehmen die Borderline-Tumoren ein. Dabei handelt es sich um sogenannte LMP-Tumoren (low malignant potency), also Tumoren mit niedrig maligner Potenz. Bezüglich ihrer Prognose und Dignität sind sie zwischen den benignen Tumoren und den Karzinomen einzustufen und machen ungefähr 10-15% der malignen epithelialen Tumoren des Ovars aus (Tropé et al., 1998). Ähnlich wie beim Ovarialkarzinom weisen die Borderline-Tumoren vermehrt Mitosen mit Zell- und Kernpolymorphien auf, jedoch ohne destruierende Stromainvasion. In 20-46% der Fälle sind bei Erstdiagnose bereits sogenannte peritoneale Implantate nachweisbar. Über 80% dieser Implantate sind nichtinvasiv. In wenigen Fällen weisen sie jedoch eine invasive Morphologie auf.

Die nichtinvasiven Implantate scheinen prognostisch eher unbedeutsam zu sein. Invasive Implantate zählen demgegenüber zu wichtigen Risikofaktoren für das Gesamtüberleben und das Auftreten eines Rezidivs (Bauerschlag et al., 2006). Das mittlere Erkrankungsalter der Borderline-Tumoren liegt 10 Jahre vor dem des invasiven Ovarialkarzinoms. In gut 90% der Fälle werden die Borderline-Tumoren im FIGO Stadium I entdeckt, was die hohe 5-Jahres-Überlebensrate von ca 80% erklärt. Die Inzidenz ist mit 2-4 pro 100.000 Frauen pro Jahr geringer als beim Ovarialkarzinom. Therapeutisch steht die operative Sanierung im Vordergrund. Von einer adjuvanten Chemotherapie wird beim Borderline-Tumor eher abgesehen (siehe Seite 10) (Stauber et al., 2005; Bauerschlag et al., 2006).

1.3.3 Einteilung

Anhand seiner typischen Ausbreitung im Bauchraum erfolgt die Stadieneinteilung anhand der FIGO-Kriterien (siehe Tabelle 2). Im Stadium 1 nach FIGO ist der Tumor auf die Ovarien begrenzt, im Stadium 2 breitet er sich im kleinen Becken aus, Stadium 3 beschreibt die Ausbreitung über das kleine Becken hinaus und im Stadium 4 nach FIGO bestehen bereits Fernmetastasen. FIGO ist die französische Abkürzung für „Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique“, also „Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe“. Neben dem Ovarialkarzinom werden auch andere gynäkologische Tumoren nach FIGO auf der Basis ihres chirurgischen Stagings klassifiziert (www.figo.org). Neben der FIGO-Klassifikation werden die Ovarialkarzinome, so wie alle anderen Tumoren, histopathologisch nach dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen beurteilt, der unter anderem von der Mitoseanzahl und Kernpleomorphie abhängt.

G1 dieses sogenannten Gradings beschreibt gut differenzierte Tumorzellen mit einer guten Prognose. Im Gegensatz dazu wird ein G4-Tumor als undifferenziert bezeichnet und weist eine schlechte Prognose auf (Tabelle 2; Nennstiel, 2009).

Histologisches Grading	Definition
Gx	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar
G1	Gute Differenzierung
G2	Mittelgradige Differenzierung
G3	Schlechte Differenzierung
G4	Keine Differenzierung (anaplastisch)

Tab. 2 Übersicht zum Grading (nach Nennstiel, 2009)

In etwa 75% der Fälle hat das Ovarialkarzinom bei der Erstdiagnosestellung das kleine Becken bereits überschritten und ist den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III oder IV (Tabelle 3) zuzuordnen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die FIGO-Stadien I bis IIA dem frühen Ovarialkarzinom und die FIGO-Stadien IIB bis IV dem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom zuzuordnen sind (du Bois et al., 2005). Würde man die Karzinome schon im Frühstadium (Stadium FIGO I) entdecken, so ließe sich die Mortalität erheblich reduzieren. Die 5-Jahresüberlebensrate für das FIGO Stadium III beträgt lediglich 25%, wohingegen die 5-Jahresüberlebensrate für das Stadium I 70-80% beträgt (Stauber et al., 2005; Mermarzadeh et al., 2001).

FIGO I	Karzinom auf die Ovarien begrenzt
IA	Nur ein Ovar befallen, kein Aszites, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche
IB	Beide Ovarien befallen, sonst wie IA
IC	Tumor auf Ovaroberfläche oder Kapselruptur oder positiver Aszites oder positive Peritoneallavage
FIGO II	Ausdehnung des Karzinoms im kleinen Becken
IIA	Ausdehnung auf Uterus oder Tuben
IIB	Ausdehnung auf andere Organe im kleinen Becken (z.B. Blase)
IIC	Stadium IIA oder IIB mit Tumor auf der Ovaroberfläche oder Kapselruptur oder positivem Aszites oder positiver Peritoneallavage
FIGO III	Karzinom mit Metastasierung außerhalb des kleinen Beckens
IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des kleinen Beckens
IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen weniger 2 cm Größe
IIIC	Makroskopische Metastasen > 2cm im Durchmesser und/oder Befall retroperitonealer oder inguinaler Lymphknoten
FIGO IV	Fernmetastasen

Tab. 3 Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms nach FIGO-Kriterien (modifiziert nach Stauber et al., 2005)

1.3.4 Klinik

Das Ovarialkarzinom, das aus dem Epithel des Ovars hervorgeht, ist eine Tumorart mit einer ungünstigen Prognose. Einerseits bedingt durch eine meist schnelle Proliferation, andererseits durch das Fehlen typischer Symptome erfolgt die Diagnosestellung in über 70% der Fälle erst in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III und IV. Vor allem die frühen Stadien verlaufen durch die oft vorherrschende freie Beweglichkeit der Ovarialtumoren im kleinen Becken und der Fähigkeit von Harnblase und Darm, dem Tumor auszuweichen, unauffällig. Als erste Hinweise auf ein fortgeschrittenes Ovarialkarzinom bemerken Patientinnen meist eine Zunahme des Leibesumfanges und, durch verdrängendes oder infiltratives Wachstum, Miktions- bzw. Defäkationsbeschwerden.

Desweiteren können uncharakteristische Symptome, wie Gewichtszunahme (z.B. durch Aszites), Gewichtsabnahme bei Tumorkachexie, Übelkeit, Völlegefühl, Bauchschmerzen, beispielsweise durch Zug an den Ligamenta rotunda, oder auch in 25% der Fälle vaginale Blutungen auftreten (Stauber et al., 2005). Bis heute gibt es keine zuverlässigen Screening-Methoden, um ein Ovarialkarzinom frühzeitig zu entdecken. Die Vaginalsonografie ermöglicht, im Vergleich zur Abdomensonografie, frühzeitig den Nachweis suspekter Kriterien, wie beispielsweise heterogene Binnenechos. Jedoch ist sie aufgrund der geringen Sensitivität nicht als generelle Screening-Methode heranzuziehen. Auch die Erweiterung der Sonographie mittels Dopplersonographie, zur Darstellung der Vaskularisation suspekter Adnexprozesse, eignet sich nicht für das Screening. Ebenso weisen Blutuntersuchungen, wie z.B. CA 125 oder andere Tumormarker, keine ausreichende Sensitivität oder Spezifität auf, um als Screening-Methode dienen zu können. Bei massiver Erhöhung dieser Tumormarker und der histopathologischen Bestätigung eines Ovarialkarzinoms lassen sich diese Werte eher als Verlaufsparemeter unter Therapie nutzen (Feige et al., 2006).

1.3.5 Therapie

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht in erster Linie aus der radikalen Entfernung des Tumors mit makroskopisch tumorfreiem Operationsgebiet und einer anschließenden Chemotherapie (Salani et al., 2007). Die chirurgische Intervention stellt nach wie vor einen bedeutenden Aspekt in der Vorgehensweise zum Management des Ovarialkarzinoms dar. Sie beinhaltet die Diagnosesicherung, das Staging und die initiale Tumorreduktion. Eine radikale chirurgische Tumorentfernung geht mit einem besseren Ansprechen auf Chemotherapie, einem längeren rezidivfreien Intervall und einem verbesserten Gesamtüberleben einher (Hoskins, 1994). Bei Tumorresten über 2 cm beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate weniger als 10% (Feige et al., 2006). In der Regel werden bei der radikalen Operation beide Adnexe, der Uterus, das pelvine Peritoneum und Teile des Netzes entfernt. Auch tumorbefallene Anteile von Blase und Darm, sowie die paraaortalen und pelvinen Lymphknoten, sollten entfernt werden. Die Lymphonodektomie ist allerdings nur sinnvoll, wenn intraperitoneal eine weitgehende Tumorreduktion mit Tumorresten von maximal 1-2 cm möglich ist (Stauber et al., 2005).

In der Chemotherapie haben sich platinhaltige Substanzen (z.B. Carboplatin) am wirksamsten erwiesen. Heutzutage werden sie in Kombination mit Taxanen (z.B. Paclitaxel) eingesetzt. Platinverbindungen setzen Platin frei, das sich an die DNS bindet. Dadurch ist das korrekte Ablesen der Erbinformation nicht möglich (Lüllmann et al., 2001). Taxane gehören zu den Mitosehemmstoffen. Sie verhindern durch Bindung an eine Tubulinuntereinheit den Abbau des Spindelapparates und blockieren die G2- und M-Phase des Zellzyklus, wodurch die Apoptose der Zelle induziert wird (Burgis, 2005). Seit Jahren gilt als Standardchemotherapeutikum in der Primärtherapie des Ovarialkarzinoms die Kombination aus Paclitaxel und Carboplatin (Jänicke, 1999; Stauber et al., 2005; Gerber et al., 2006). Obwohl der Großteil der Patientinnen auf dieses therapeutische Vorgehen anspricht, entwickeln ca. 60% der Patientinnen nach zwei bis drei Jahren ein Krankheitsrezidiv (Salani et al., 2007; Pfisterer, 2004). Beim Auftreten eines Rezidivs unterscheidet man Patientinnen mit einer platinresistenten Erkrankung von Patientinnen mit einer platin-sensiblen Erkrankung. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht in dem Zeitintervall der durchgeführten Chemotherapie und dem Auftreten des Rezidivs. Während platinresistente Patientinnen nicht auf die Chemotherapie ansprechen bzw. das Rezidiv innerhalb der ersten sechs Monate nach Beendigung der Chemotherapie auftritt, besteht bei den platin-sensiblen Patientinnen mindestens ein sechs Monate rezidivfreies Intervall (Pfisterer, 2004). Ein großes Problem in der Therapie des Ovarialkarzinoms stellt das Auftreten von Resistenzen gegenüber Chemotherapie dar. Untersuchungen haben gezeigt, dass platin-sensible Patientinnen, bei denen ein Rezidiv frühestens sechs Monate nach abgeschlossener first-line Chemotherapie auftritt, von einer sekundären Chemotherapie oder auch von einem sekundären chirurgischen Vorgehen profitieren. Diesen Benefit zeigen platinresistente Patientinnen nicht. In diesen Fällen bleibt nur die symptombezogene Therapie zur Verbesserung der Lebensqualität (Pfisterer, 2004; Thomssen et al., 2002). Obwohl eine Hormon- bzw. antihormonelle Therapie beim Ovarialkarzinom eher nicht in Betracht gezogen wird, kann in dieser Palliativsituation die Gabe von Tamoxifen bei nur geringem Nebenwirkungspotenzial bei ca. 10-20% der Patientinnen zu einer klinischen Stabilität, teilweise über Monate, führen (Petru et al., 2009). Nach der Primärtherapie sollte aufgrund der starken proliferativen Aktivität eine intensive Nachsorge erfolgen.

Im Vergleich zu den invasiven Ovarialkarzinomen scheint eine adjuvante Chemotherapie bei LMP-Tumoren, auch in fortgeschrittenen Stadien, derzeit nicht indiziert. Die Therapie besteht in erster Linie aus einer möglichst radikalen operativen Zytoreduktion in Abhängigkeit von klinischen Parametern und Lebensumständen, wie beispielsweise Kinderwunsch. Jedoch kann in Einzelfällen, beispielsweise beim Auftreten invasiver Implantate, eine Kombinationschemotherapie diskutiert werden (Bauerschlag et al., 2006).

1.4 Maspin

Ein seit den '90er Jahren bekannter und für Krebserkrankungen interessanter Marker ist Maspin. Maspin ist ein Protein, das zur Gruppe der Serin-Protease-Inhibitoren, den Serpinen, gehört und von Zou durch Substraktive Hybridisierung im normalen Mammaepithel nachgewiesen wurde (Zou et al., 1994). Der Verlauf der malignen Transformation von normalem Mammaepithel zum Karzinom geht mit einer herabregulierten Maspinexpression einher (Maass et al., 2001), so dass Maspin in diesem Fall den Tumorsuppressorgenen zugeordnet werden kann. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Maspin in der Lage ist, die Invasion durch Mammakarzinomzellen durch Hemmung der Zellmotilität zu inhibieren (Sheng et al., 1996). Interessanterweise exprimiert physiologisches humanes Pankreasgewebe, im Vergleich zum Mammaepithel, kein Maspin, während es bei der Karzinogenese des Pankreas zu einem Anstieg der Maspinexpression kommt (Fitzgerald et al., 2003; Maass et al., 2001). Sood und Kollegen waren die Ersten, die sich mit der Maspinexpression des Ovars beschäftigt haben. Sie untersuchten sowohl das Expressionsverhalten in normalem Gewebe des Ovars, als auch in Karzinomzelllinien und kamen zu dem Ergebnis, dass eine Überexpression mit einer schlechten Prognose einhergeht (Sood et al., 2002).

1.5 Fragestellung

Mit wachsendem Interesse wird die klinische Relevanz des Protease-Inhibitors Maspin verfolgt. Maspin zeigt in verschiedenen Karzinomen ein unterschiedliches Expressionsmuster. In normalem Pankreasgewebe wird kein Maspin oder nur sehr wenig exprimiert, während beim Pankreaskarzinom ein erhöhtes Expressionslevel nachgewiesen werden konnte (Maass et al., 2001).

Die Brust zeigt physiologisch eine hohe Maspinbildung in den Epithelzellen. Beim Mammakarzinom kommt es zu einer Abnahme der Expressionsrate, die mit einer Tumorprogression und einem erhöhten Risiko für Metastasenbildung einhergeht (Maass et al., 2001). Im Vergleich dazu, korreliert eine hohe Expression beim Plattenepithelkarzinom des Mundes mit einem besseren Gesamtüberleben (Xia et al., 2000). Obwohl ständig neue Erkenntnisse bezüglich des molekularen Einfluss von Maspin auf verschiedene Gewebearten und Tumoren gewonnen werden, lagen zu Beginn der Arbeit wenige Daten zum Expressionsverhalten von Maspin beim Ovarialkarzinom vor. Aufgrund des meist bestehenden fortgeschrittenen Tumorstadiums bei Diagnosestellung besteht der Bedarf, molekulare Marker zu identifizieren, die zur Abschätzung des Krankheitsverlaufes und zur Optimierung der Therapie herangezogen werden können. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung der Bedeutung der Maspinexpression beim Ovarialkarzinom. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Maspinexpression beim Ovarialkarzinom und Tumoreigenschaften bzw. dem Gesamtüberleben der Patientinnen, so dass sich dieser Wert als prognostischer Marker nutzen lässt.

Unter Umständen geht ein unterschiedliches Expressionsmuster mit einem divergenten Ansprechen auf Chemotherapie einher, so dass im Vorfeld schon Patientinnen bestimmt werden könnten, die von der Therapie profitieren. Patientinnen, die sich auf diese Weise als chemoresistent erweisen, könnten die Nebenwirkungen der Zytostatikatherapie somit erspart bleiben. Methodisch wurden Expressionsanalysen auf molekularer Ebene und Proteinebene mittels Real-Time PCR und Immunhistochemie durchgeführt. Bei der immunhistochemischen Untersuchung wurde sowohl das zytoplasmatische, als auch das nukleäre Expressionsmuster ermittelt.

Die Auswertung sollte folgende Fragen klären:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Maspinexpression und klinisch pathologischen Tumorparametern, wie FIGO Stadium, Tumorgrad und histologischer Subtyp?
2. Wie verhält sich die Maspinexpression in Bezug auf die Platinsensibilität?
3. Wie korreliert die Maspinexpression mit den klinischen follow up Daten bzw. gibt es Unterschiede im medianen Überleben, so dass sich Maspin möglicherweise als prognostischer Marker nutzen lässt?

2. Kollektiv, Materialien und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für den immunhistochemischen Teil der vorliegenden Arbeit wurden die an der Universitätsfrauenklinik Kiel und dem Pathologischen Institut der Universitätsklinik Kiel angefertigten Gewebeblöcke von insgesamt n=87 Patientinnen herangezogen, die in dem Zeitraum zwischen 1993 und 2002 aufgrund eines Ovarialtumors in der Universitätsfrauenklinik Kiel operiert wurden. Hierzu gehören n=73 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom, n=6 Patientinnen mit einem ovariellen Borderline Tumor und n=8 Patientinnen mit einem benignen Ovarialtumor. 67 Patientinnen mit Ovarialkarzinom erhielten eine platin-basierte Chemotherapie. Von diesen Patientinnen waren 18 (26,9%) platin-resistent mit einer Progression unter laufender Chemotherapie oder einem Rezidiv nach weniger als 6 Monaten. Bei 11 Patientinnen (16,4%) kam es zu einem Krankheitsrezidiv nach 6-12 Monaten und bei 29 Patientinnen (43,3%) nach 12 Monaten. Bei 9 Patientinnen, die Chemotherapie erhielten, konnten keine Angaben zur Platinsensibilität evaluiert werden. Alle Patientinnen erklärten sich mit der wissenschaftlichen Verwendung der Gewebeproben einverstanden. Das intraoperativ gewonnene Tumormaterial wurde in Formalin fixiert und zur Archivierung in Paraffin eingebettet. Von diesen Präparateblöcken konnten dann für die Färbungen Schnittpräparate, wie auf Seite 23 beschrieben, angefertigt werden. Histologisch betrachtet dominierte im Kollektiv bei den malignen Tumoren der serös/papilläre Subtyp mit 72,4% (63/79). Die klinischen Daten zu diesen Patientinnen wurden in einer Excel Datenbank gesammelt und freundlicherweise von Herrn PD Dr. med. F. Hilpert zur Verfügung gestellt. Das mediane Erkrankungsalter lag bei 63 Jahren (siehe Abbildung 2), wobei die jüngste Patientin bei Diagnosestellung 26 Jahre alt war und die älteste Patientin 89 Jahre. Es zeigt sich ein typischer Häufigkeitsgipfel bei 61-70 Jahren.

Im Rahmen der retrospektiven Analyse wurden folgende klinische und pathologische Parameter erfasst:

- a.) Tumorart
- b.) Tumorstadium (FIGO)
- c.) Histologie
- d.) Tumordifferenzierung (Grading)
- e.) Platinsensibilität

Die Charakteristika des untersuchten Kollektivs sind der Tabelle 4 und der Abbildung 2 zu entnehmen.

Das Zellmaterial für die Gewinnung der RNA für die Real Time PCR entstammte der Zellbank des onkologischen Labors der Universitätsfrauenklinik Kiel und wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. N. Maass und Prof. Dr. rer. nat. N. Arnold zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um die Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3, OVCAR-3, OVCAR-8 und HEY, sowie Ovarialkarzinomzellen der Zelllinie HEY, bei denen eine Resistenz gegen Docetaxel und Paclitaxel induziert wurde. Desweiteren wurden die Mammakarzinomzelllinien MCF 7 und MDA-MB 231, die Pankreaskarzinomzelllinie BXPC 3 und Normalepithel aus dem Ovar (siehe Tabelle 5) in die Arbeit mit einbezogen. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte durch die sogenannte Kryokonservierung. Durch Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff können diese über einen langen Zeitraum erhalten werden und bei Bedarf für die weitere Verarbeitung, in diesem Fall zur Zellkultur, wieder aufgetaut werden (siehe Seite 26).

Kollektiv			
	Beschreibung	Anzahl	Prozentualer Anteil
Tumor	Total	87	100,0
	OVCA	73	83,9
	LMP	6	6,9
	Benigne	8	9,2
Tumorstadium (FIGO) (OVCA+LMP)	Total	79	100,0
	I	13	16,4
	II	4	5,1
	III	47	59,5
	IV	15	19,0
Histologische Differenzierung	Total	87	100,0
	Serös-papillär	63	72,4
	Endometrioid	9	10,3
	Andere maligne Tumore	7	8,1
	Benigne Tumore	8	9,2
Tumordifferenzierung/ Grading (OVCA+LMP)	Total	79	100,0
	G1	10	12,7
	G2	32	40,5
	G3	37	46,8
Platinbasierte Chemotherapie des OVCAs	Total	67	100,0
	Rezidiv < 6 Monate	18	26,9
	Rezidiv 6-12 Monate	11	16,4
	Rezidiv > 12 Monate	29	43,3
	Keine Angabe zur Platinsensibilität	9	13,4

Tab. 4 Darstellung der Tumorcharakteristika des untersuchten Kollektivs der Universitätsfrauenklinik Kiel

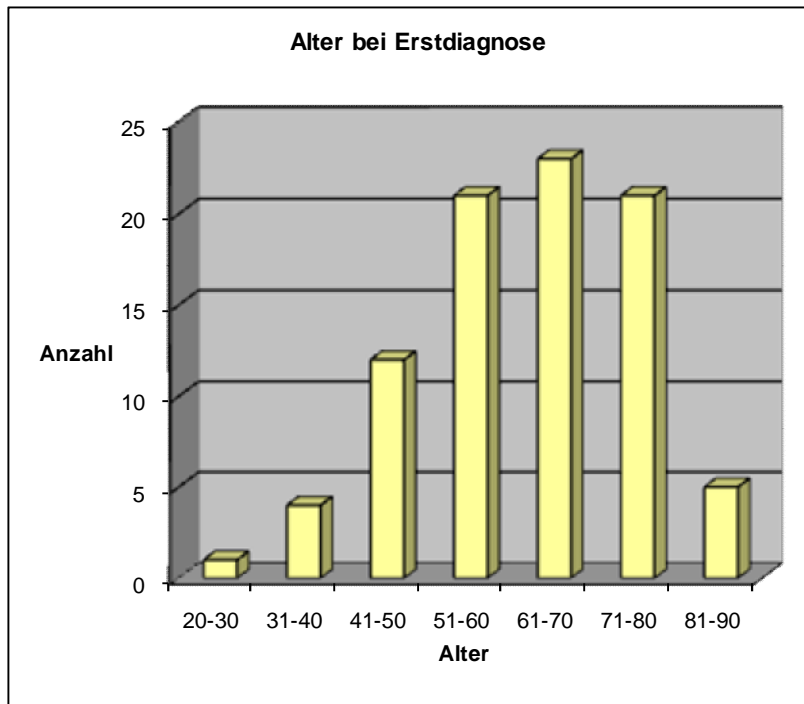


Abb. 2
Altersverteilung bei
Erstdiagnose:

Median: 63 Jahre
Mittelwert: 62,3 Jahre

2.2 Materialien

2.2.1 Biochemikalien

Chemikalie

B-Mercaptoethanol

(Produktnummer: M6250)

BSA (Art. 80762)

DAB+ Chromogen und Substrat Puffer

(Dako Real™ DAB+ Chromogen, Dako Real™

Substrate Buffer)

Docetaxel

(Produktnummer: 01885)

Eindeckmedium

FKS (Fetales Kälberserum/Foetal bovine serum,

Kat. Nr. 10270-106)

Firma

SIGMA, St. Louise, MO, USA

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Dako GmbH, Hamburg,
Deutschland

SIGMA, St. Louise, MO, USA

Leica Instruments GmbH,
Nussloch, Deutschland

Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
Deutschland

HRP-konjugierter Sekundärantikörper (Dako Real™ Envision/HRP, Rabbit/Mouse)	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Maspin Primer forward/reverse (QuantiTect Primer Assays, Kat. Nr. QT01149890)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paclitaxel (Produktnummer: T7191)	SIGMA, St. Louise, MO, USA
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Peroxidase Blocking Reagent S2001	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Primärantikörper (Anti-Human Maspin Monoclonal Antibody, clone: G167-70, Art. Nr.: 554292)	BD Bioscience, Pharmingen, CA, USA
RLT-Puffer (Bestandteil des RNeasy Mini Kit, Kat. Nr. 74104)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Waschpuffer	Onkologisches Labor der Universitätsfrauen Klinik, Kiel
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co. KG; Hamburg, Deutschland
2.2.2 Geräte	
<u>Gerät</u>	<u>Firma</u>
iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mikroskop (Axiovert 25C)	Zeiss GmbH, Hamburg Deutschland

Mikrotom 2050 Supercut	Reichert und Jung, Nussloch, Deutschland
Mikrowelle R-332	Sharp Electronics, Hamburg, Deutschland
Peltier Thermal Cyclers PTC-200	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
QIAshredder	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
UV-Spektrophotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Zentrifuge (Rotina 48 RC)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Material

Falcon-Tube 50ml

Objektträger

Real Time PCR plate 96 well für iCycler
(Kat. Nr. 2239441)

T75-Kulturflasche
(Tissue Culture Flask 75cm²)

Firma

Becton Dickinson GmbH,
Heidelberg, Deutschland

Marienfeld Superior, Lauda-
Königshofen, Deutschland

Bio-Rad Laboratories GmbH,
München, Deutschland

Sarstedt AG & Co.,
Nümbrecht, Deutschland

2.2.4 Gebrauchsfertige Kits

Kit

QuantiTect Reverse Transcription Kit
(Kat. Nr. 205311)

QuantiTect SYBR® Green PCR Kit
(Kat. Nr. 204143)

Firma

Qiagen GmbH, Hilden
Deutschland

Qiagen GmbH, Hilden,
Deutschland

Rneasy Mini Kit
(Kat. Nr. 74104)

Qiagen GmbH, Hilden,
Deutschland

2.2.5 Zellmaterial für die Real Time PCR

Zelllinie	Beschreibung
SKOV-3	Humanes Adenokarzinom aus dem Ovar. 1973 gewonnen aus dem malignen Aszites einer 64-jährigen Patientin. Die Zelllinie weist resistente Eigenschaften gegenüber dem Tumor Nekrosefaktor, Diphtherietoxin, Cisplatin und Adriamycin auf (Morimoto et al., 1991).
OVCAR-3	Humanes Adenokarzinom aus dem Ovar. Gewonnen 1982 aus dem malignen Aszites einer 60-jährigen Patientin. Es besteht ein positiver Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. Zusätzlich weist die Zelllinie eine Resistenz gegenüber Adriamycin, Melphalan und Cisplatin auf (Hamilton et al., 1983).
MCF 7	Humanes Adenokarzinom der weiblichen Brustdrüse, gewonnen aus dem malignen Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin. Expression des Östrogenrezeptors und des WNT7B-Onkogens. Das Wachstum der MCF 7 Zellen kann durch den Tumor Nekrose Faktor Alpha inhibiert werden (Huguet et al., 1994).
MDA-MB 231	Humanes Adenokarzinom der weibl. Brustdrüse, gewonnen aus einem malignen Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin. Diese Zelllinie exprimiert Rezeptoren für den epidermal growth factor (EGF) und transforming growth factor alpha (TGF alpha) (http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-26&Template=cellBiology).
BXPC 3	Humanes Adenokarzinom des Pankreas einer 61-jährigen Frau. Die Zellen produzieren Muzine, pancreas cancer associated antigen (PCAA) und carcinoembryonic antigen (CEA) (http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1687&Template=cellBiology) .
OVCAR-8	Humanes Karzinom aus dem Ovar.
HEY	Xenograft eines humanen mäßig differenzierten Adenokarzinoms des Ovars, ursprünglich gewonnen aus der Peritonealkarzinose. Es besteht eine gewisse Resistenz gegenüber Cisplatin (Buick RN et al., 1985).
HEY DOC	Klon der HEY-Zelllinie, eine Karzinomzelllinie aus dem Ovar, bei der eine Resistenz gegen Docetaxel nach Protokoll induziert wurde (Bräutigam et al., 2009).
HEY PAC	Klon der HEY-Zelllinie, eine Karzinomzelllinie aus dem Ovar, bei der eine Resistenz gegen Paclitaxel nach Protokoll induziert wurde (Bräutigam et al., 2009).
Normalepithel	Physiologisches Epithel aus dem Ovar.

Tab. 5 Informationen zu den in der Arbeit genutzten Zelllinien; Zellbank des onkologischen Labors der Universitätsfrauenklinik, Kiel

2.3 Methoden

2.3.1 Immunhistochemie

Theoretischer Hintergrund

Immunhistochemische Untersuchungen sind heutzutage weit verbreitet und stellen wichtige unterstützende Maßnahmen in der histopathologischen Diagnostik dar.

Das Grundprinzip der Immunhistochemie basiert auf der Affinität von Antikörpern zu korrespondierenden Antigenen im Gewebe als Antigen-Antikörper-Reaktion.

Es erfolgt die Darstellung von zell- und gewebespezifischen Antigenen, die mit Hilfe der Antikörper markiert und visualisiert werden. Antikörper gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die als Immunglobuline bezeichnet werden und sich in fünf Hauptklassen einteilen lassen: Immunglobulin G (IgG), IgA, IgM, IgD und IgE. Diese fünf Isotypen kommen in unterschiedlichen Kompartimenten vor und haben verschiedene Aufgaben. Gemeinsam ist allen, dass sie zwei identische schwere Ketten und zwei identische leichte Ketten aufweisen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 3).

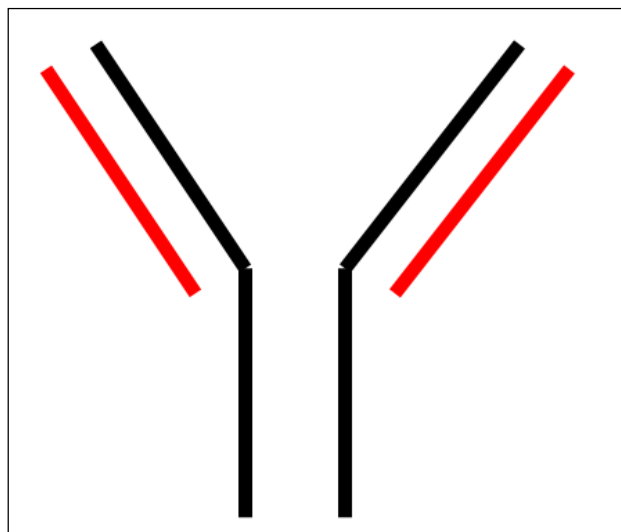


Abb. 3 Vereinfachte Darstellung der Struktur eines Antikörpers (Ak). Jeder Ak besteht aus zwei identischen schweren (hier schwarz) und zwei identischen leichten (hier rot) Ketten. Disulfidbrücken (hier nicht dargestellt) tragen zur Struktur und Stabilität innerhalb des Moleküls bei. (Graphik eigene Darstellung)

Desweiteren lassen sich polyklonale Antikörper von monoklonalen Antikörpern unterscheiden. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen Zellen gebildet, sind daher immunchemisch verschieden und reagieren mit verschiedenen Epitopen eines Antigens. Monoklonale Antikörper werden von einem Zellklon gebildet. Die Antikörper eines Zellklons sind immunchemisch identisch und reagieren nur mit einem Epitop eines Antigens (Boenisch et al., 2006). Da monoklonale Antikörper in der Immunhistochemie gegenüber den polyklonalen Antikörpern gewisse Vorteile aufweisen, wie beispielsweise ihre kaum vorhandenen Qualitätsschwankungen, kam in dieser Arbeit ein monoklonaler Maus Anti-Human Maspin Antikörper zur Anwendung (siehe Materialien, Seite 16). Zur Visualisierung stehen verschiedene Methoden zur Auswahl, bei denen in unterschiedlich vielen Schritten durch Enzymreaktionen sichtbare Farbstoffe entstehen. Heutzutage kommen sehr häufig die Avidin-Biotin-Methoden zum Einsatz, die auf einer hohen Affinität von Streptavidin und Avidin für Biotin basieren. Dabei wird auf den unkonjugierten Primärantikörper ein biotinmarkierter Sekundärantikörper gegeben. Im nächsten Schritt wird entweder ein Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Methode = Avidin-Biotin-Complex) oder enzymmarkiertes Streptavidin (LSAB-Methode = Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode) aufgetragen, welche an die Biotinmoleküle des sekundären Antikörpers binden (Boenisch et al., 2006). Da bisher im onkologischen Labor der Universitätsfrauenklinik gute Ergebnisse mit der ABC-Methode erzielt werden konnten, kommt in der vorliegenden Arbeit diese Methode zum Einsatz. Der größte Anteil an Proben, die immunhistochemisch gefärbt werden, ist in Paraffin eingebettet. Aufgrund der guten Erhaltung der Morphologie stellt die Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin die Methode der Wahl zur Konservierung von Gewebe dar. Diese Methode, die per Zufall im 19. Jahrhundert durch den Frankfurter Ferdinand Blum entdeckt wurde, birgt auch Nachteile (Fox et al., 1985). Beispielsweise führt es in der Regel zu einer Abnahme der Immunreaktivität formalinfixierter Gewebeantigene. Diese „Maskierung“ des Epitops basiert auf Wechselwirkungen zwischen dem Formaldehyd und den Gewebestrukturen (Fox et al., 1985; Boenisch et al., 2006). Durch das sogenannte Antigen Retrieval kann diese verlorengegangene Immunreaktivität beispielsweise durch den Einfluss von Hitze oder pH-Wert wieder hergestellt werden (Fraenkel-Conrat et al., 1947, 1948a).

Verallgemeinernde Aussagen zur Einstellung des pH-Wertes der Retrieval-Lösung sind schwer zu treffen, da das pH-Optimum für verschiedene Epitope variieren kann. Shi et al berichten von einer sogenannten „Test-Batterie“, die im Vorfeld durchgeführt werden sollte, um optimale Färbebedingungen und gute Färbeergebnisse zu erzielen (Shi et al., 1997). Da im onkologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Kiel schon einige Versuche und immunhistochemische Färbungen mit Maspin durchgeführt wurden, lag bereits zu Beginn der vorliegenden Arbeit ein Färbeprotokoll vor, so dass auf die „Test-Batterie“ verzichtet werden konnte.

Färbeprotokoll

Von den gekühlten Paraffinpräparatblöcken wurden mittels Mikrotom 3 µm dicke Schnittpräparate angefertigt. Nach einem kurzen Wasserbad bei Raumtemperatur und der anschließenden Überführung in ein auf 38°C erwärmtes Wasserbad wurden die Schnitte auf Objektträger aufgebracht. Die Trocknung erfolgte für 24 Stunden in einem Trockenschrank bei 37°C. Zur Deparaffinierung wurden die Schnitte für 20 Minuten in ein Xylol-Bad gegeben und im Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) rehydriert. Jeder Schritt der Alkoholreihe wurde jeweils zwei Mal durchlaufen, bevor ein Waschvorgang mit frischem Waschpuffer erfolgte. Zwischen den einzelnen folgenden Färbeschritten wurden die Schnitte in Waschpuffer aufbewahrt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Das Antigen-Retrieval erfolgte in einem 0,05 molaren Tris-Puffer mit einem pH von 9,0 durch Erhitzen in einer Mikrowelle bei 900 Watt für 15 Minuten. Es folgte eine Abkühlungsphase von 15 Minuten, nach der die Schnittpräparate unter langsam fließendem Leitungswasser weiter auf Raumtemperatur runterkühlten. Danach wurden die Schnittpräparate erneut 3-5 Mal mit Waschpuffer gewaschen. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde die gewebeeigene Peroxidaseaktivität mit dem Peroxidase Blocking Reagent S2001 von Dako mit einer Einwirkzeit von 20 Minuten inhibiert. Als nächstes wurde der Primärantikörper (Purified Mouse Anti-Human Maspin Monoclonal Antibody, clone: G167-70) in einer 1:75 Verdünnung in 1% BSA Lösung (Bovines Serum Albumin) aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Mit Ausnahme der Negativkontrollen wurde auf alle Präparate je nach Größe 100-200 µl der Lösung aufgetragen. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper.

Zum Einsatz kam ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper. HRP steht für horseradish-peroxidase (Meerrettichperoxidase) und stellt ein aus der Wurzel der Meerrettichpflanze gewonnenes Enzym dar. Durch seine eisenhaltige Häm-Gruppe als aktives Zentrum besitzt es die Fähigkeit, in Anwesenheit eines Elektronen-Donors (hier DAB) einen sichtbar braunen, unlöslichen Komplex zu bilden. Der verbliebene Rest des sekundären Antikörpers wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Zur Visualisierung diente ein Substratsystem, bestehend aus zwei Komponenten: DAB+ Chromogen (Diaminobenzidin) und dem wasserstoffperoxidhaltigen Substrate Buffer (Dako Real™ DAB+ Chromogen, Dako Real™ Substrate Buffer). Zur Herstellung der Entwicklerlösung wurde das DAB+ Chromogen mit dem Substrate Buffer 1:50 verdünnt und auf die Objektträger gegeben. Die Einwirkzeit orientierte sich an der Positivkontrolle, so dass die Reaktion nach ca. 2-3 Minuten mit Aqua dest. gestoppt wurde. Es erfolgte noch eine Zellkerngegenfärbung mit Mayers Hämalaunlösung für zehn Minuten und ein anschließendes Nachbläuen für 30 Minuten unter langsam fließendem Leitungswasser. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnittpräparate dehydriert, wobei die Stufen 70%, 96% und 100% erneut jeweils zwei Mal durchlaufen wurden. Zum Abschluss kam es zur Überführung der Präparate in ein Xylobad, bevor sie dann zur Einbettung mit dem Eindeckmedium betropft und mit einem Deckglas luftfrei verschlossen wurden. Die Aushärtung erfolgte unter dem Laborabzug. In jedem Ansatz wurde physiologisches Mammaepithel als Positivkontrolle herangezogen. Als Negativkontrolle diente physiologisches Mammaepithel, bei dem die reine BSA-Lösung ohne Zugabe des primären Antikörpers aufgetragen wurde.

Auswertung der Färbungen

Die Einstufung der Farbintensität erfolgte nach den Richtlinien von Remmele und Stegner mittels Immunreaktivem Score (Remmele et al., 1987). Ursprünglich wurde diese Methode zur objektiven Erfassung von Steroidhormonrezeptoren entwickelt. Sie lässt sich aber auch für andere diagnostische und wissenschaftliche Fragestellungen nutzen (Münstedt et al., 2000).

Der Immunreaktive Score (IRS) berücksichtigt die beiden Parameter Farbintensität und Anzahl der positiven Zellen.

Bewertung der Farbintensität:

- 0 = keine Färbereaktion
- 1 = schwache Färbereaktion
- 2 = mäßige Färbereaktion
- 3 = starke Färbereaktion

Einteilung der positiven Zellen

- 0 = keine positiven Zellen
- 1 = < 10% positive Zellen
- 2 = 10-50% positive Zellen
- 3 = 51-80% positive Zellen
- 4 = > 80% positive Zellen

Der IRS errechnet sich aus dem Produkt beider Parameter, so dass ein maximaler Wert von 12 erreicht werden kann. In dieser Arbeit wurde sowohl für die zytoplasmatische, als auch für die nukleäre Expression von Maspin der IRS ermittelt. Die Erfassung des IRS erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Allgemeine Pathologie des Universitätsklinikums Kiel. Die statistische Auswertung erfolgte unter Aufsicht des Institutes für Medizinische Informatik und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Durch dieses wurde zur Bewertung des unterschiedlichen Expressionsverhaltens folgende Einteilung festgelegt: Bei der nukleären Expression von Maspin wurde ein IRS von 0 als negativ bewertet und ein IRS von größer 0 als positiv. Ein IRS von kleiner oder gleich 4 wurde bei der zytosolischen Expression als schwache Expression und ein IRS größer 4 wurde mit einem starken Expressionsverhalten befundet. Die statistische Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit der Version 15.0 des statistischen Computerprogrammes SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL). Die Korrelation von Maspin und den entsprechenden Variablen erfolgte mit Hilfe des Chi Quadrat Testes.

Die Überlebensanalysen wurden mittels Kaplan-Meier Model erstellt. Die multivariate Analyse, in die Parameter einbezogen wurden, die in der Literatur als Prognosefaktoren dargestellt werden, hinsichtlich ihres Stellenwertes jedoch umstritten sind, wie Tumorgrad, FIGO Stadium, Platinsensibilität und in diesem Fall die Höhe der Maspinexpression, erfolgte anhand der Cox Regressions Analyse. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ definiert.

2.3.2 Zellkultur

Zur Überprüfung des Expressionsverhaltens von Maspin auf molekularer Ebene wurde die RNA für die Real Time PCR aus den Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR- 3, OVCAR-8, SKOV-3, HEY und Zellen der HEY-Zelllinie, bei denen eine Resistenz gegen Docetaxel and Paclitaxel induziert wurde (Bräutigam et al., 2009), isoliert. Zusätzlich wurde die RNA aus den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB 231 und MCF 7, aus der Pankreaskarzinomzelllinie BXPC 3 und aus normalem Epithel des Ovars gewonnen (siehe auch Seite 19). Die Zellen wurden in einer T75-Kulturflasche in einem Medium aus RPMI 1640 mit einem 10%igen Anteil fetalen Kälberserum und 60 U/ml Penicillin und Streptomycin in einem Zellbrutschrank bei standardisierten Zellkulturbedingungen (37°C und 5% CO₂) kultiviert. Um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten und die Anhäufung von toxischen Stoffwechselprodukten zu vermeiden, erfolgte mindestens zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel. Bei einer Konfluenz von ca. 80% erfolgte die Subkultivierung oder Zellernte. Da es durch Kontaktinhibition zu einem Wachstumstopp kommen kann, sollten adhärente Zellen in der Regel bei einer Konfluenz von 70-90% subkultiviert werden. Durch Aussäen der Zellen auf eine größere Fläche wurde vermehrt Wachstumsfläche zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde beim Passagieren das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. Durch den Waschschrift mit PBS sollten trypsinhemmende Serumreste entfernt werden. Zum Lösen der Zellen wurde nach Absaugen des PBS Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) hinzugefügt und bei Raumtemperatur oder 37°C für ca. 10 Minuten inkubiert. Der Lösungsvorgang wurde stets unter dem Mikroskop überprüft. Nach vollständiger Lösung wurde die Trypsinreaktion durch Hinzufügen von Medium gestoppt. Anschließend erfolgte die Überführung der gesamten Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Tube und eine 10 minütige Zentrifugation bei 1000 U/min.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen, das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert und je nach Bedarf eine bestimmte Menge des Gemisches in eine neue, bereits mit Medium befüllte, Kulturflasche überführt und zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt. Ziel der Zellkultur in dieser Arbeit war es, ausreichend RNA zu gewinnen, um diese dann in cDNA umschreiben und für die Real-Time PCR verwenden zu können. Zur Vorbereitung der RNA-Extraktion wurde das Medium aus der Kulturflasche vorsichtig abgesaugt und ein Waschvorgang mit PBS vorgenommen. Zur Lösung der Zellen von der Kulturflasche und Homogenisierung wurde im Anschluss 600µl eines Gemisches aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol auf die Zellen gegeben (100:1). Um die RNA der Zellen zu gewinnen, wurden die Zellen anschließend mit dem QIAshredder zerkleinert und mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Vorschrift des Herstellers weiter verarbeitet. Die RNA-Konzentration wurde im UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt, um später die gewünschte Menge an RNA in die cDNA Synthese einsetzen zu können. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert. Für die Synthese der cDNA wurden jeweils 500ng der gewonnenen RNA (siehe oben) mit Hilfe der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Im ersten Schritt wurden zu 500ng der Template RNA 2 µl gDNA 7x Wipeout Buffer und eine variable Menge an RNase freiem Wasser hinzugefügt, je nach µl Menge der RNA, bis ein Totalvolumen von 14 µl erreicht ist. Dieser Mix wurde für zwei Minuten mit dem Peltier Thermal Cycler von Biozym Diagnostik bei 42°C inkubiert.

Nach diesem Inkubationsschritt wurde jedem Tube 6 µl eines Mix hinzugefügt, der aus 1 µl Reverse Transkriptase, 4 µl RT 5x Buffer (enthält dNTPs) und 1 µl Primer Mix besteht, so dass ein Totalvolumen von 20 µl vorhanden war. Es schloss sich ein weiterer Inkubationsschritt an, bei dem der komplette Mix zunächst 15 Minuten bei 42°C und dann noch ein Mal für drei Minuten bei 95°C inkubiert wurde, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Bei Aussicht auf baldige Verwendung, wurde die cDNA im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Für eine langfristige Lagerung muss sie bei -20°C aufbewahrt werden. Mit Ausnahme der Template RNA entstammten alle genutzten Reagenzien dem QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland. Die Inkubation erfolgte mit dem PTC-200 Peltier Thermal Cycler.

2.3.3 Real time PCR

Theoretischer Hintergrund

Die in den achtziger Jahren entwickelte Methode der Polymerase Kettenreaktion stellt einen erheblichen Fortschritt in der Molekularbiologie dar. Für die Erfindung der PCR-Technologie erhielt der Amerikaner Dr. Kary Banks Mullis 1993 den Nobelpreis in Chemie (<http://www.nobelpreis.org/chemie/mullis.html>). Sie ermöglicht die Detektion minimaler DNA Mengen und wird heute im Bereich der Sequenzanalysen, bei der Genklonierung, Genexpressionsstudien und Diagnostik von Viruserkrankungen eingesetzt. Die Real Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, zusätzlich aber die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Messung der Amplifikationsrate wird durch fluoreszierende Stoffe ermöglicht, wobei die Fluoreszenz mit der Menge an PCR-Produkten zunimmt. Um die gewünschte Fluoreszenz herzustellen, gibt es zwei Möglichkeiten. Zum Einen können interkalierende Farbstoffe, wie zum Beispiel Ethidiumbromid oder SYBR® Green, zum Anderen sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden, sogenannte FRET-Sonden, genutzt werden. Bei der Quantifizierung mittels FRET (fluorescence resonance energy transfer) können unterschiedliche SONDENSYSTEME zum Einsatz kommen. Allen SONDENSYSTEMEN gemeinsam ist das Vorhandensein eines Donor-Fluorophor, das durch eine Lichtquelle angeregt wird und einen Teil seiner Energie auf das benachbarte Akzeptor-Fluorophor überträgt. Bei räumlicher Trennung der Fluorochrome wird die Energie nicht mehr von dem Akzeptor aufgenommen und es kommt zur charakteristischen Fluoreszenz, die mit dem Fluoreszenzdetektor gemessen werden kann (Livak, 1996; Neusser, 2000; Van der Velden et al., 2003). Da diese Methode recht aufwendig und auch teuer ist, wurde in dieser Arbeit mit dem interkalierenden Farbstoff SYBR® Green gearbeitet, der an die doppelsträngige DNA bindet und dadurch zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt (Abbildung 4). In Lösung fluoresziert der Farbstoff nur gering (Grundrauschen), aber nach Binden in die doppelsträngige DNA kommt es zu einem starken Fluoreszenzsignal, wobei der genaue Interaktionsmechanismus zwischen dem Farbstoff und der DNA unbekannt ist. Während der Elongation nimmt die Target-DNA, an die SYBR® Green binden kann, zu, was zu einem Anstieg der Fluoreszenz-Emission führt. Das bedeutet, je mehr SYBR® Green an die DNA bindet, desto stärker ist der Fluoreszenzanstieg. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen.

Nachteil dieser Methode ist die mangelnde Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates. Auch Primer-Dimere, die während der Reaktion entstehen können, führen zu einem Fluoreszenzanstieg. Eine Möglichkeit zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren zu unterscheiden bietet die nach abgeschlossener PCR erfolgende Schmelzkurvenanalyse (Abb. 5), bei der sich im Kurvenverlauf die Primer-Dimere durch niedrigere Schmelzpunkte erkennen lassen (Neusser, 2000; Van der Velden et al., 2003).

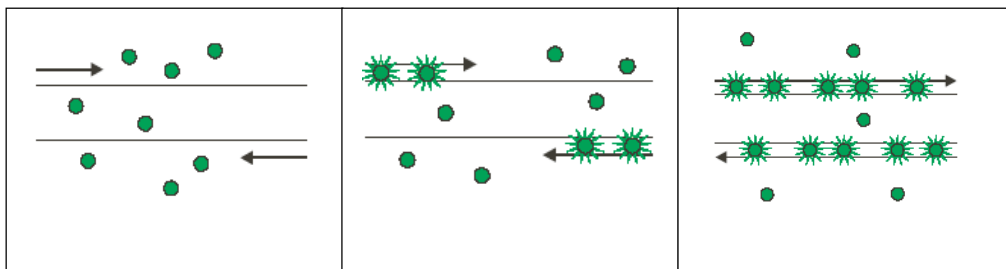


Abb. 4 SYBR® Green 1 Methode. Zu Beginn liegt SYBR® Green in Lösung vor, ohne Fluoreszenzsignale zu emittieren. Sobald es an die doppelsträngige DNA gebunden hat, kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der mit jedem weiteren Zyklus wächst (nach Van der Velden et al., 2003)

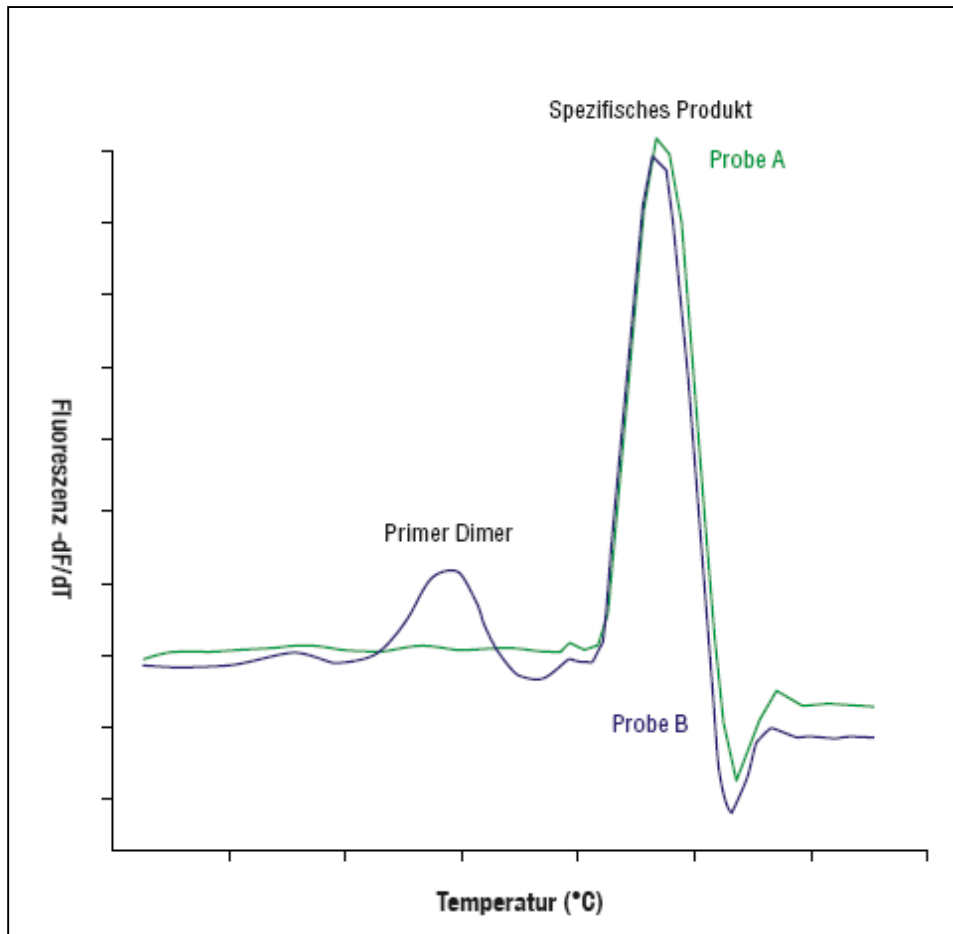


Abb. 5 Schmelzkurvenanalyse von zwei Proben (Probe A und B). Probe A weist einen Peak auf, der durch die spezifische Amplifikation des Produktes entsteht. Probe B zeigt zwei Peaks. Der Eine resultiert aus der spezifischen Amplifikation, der Zweite bei der niedrigeren Temperatur durch die Amplifikation von Primer Dimeren. (aus QuantiTect SYBR® Green PCR Handbook 08/2003)

Für die Quantifizierung stehen mehrere Rechenmodelle zur Verfügung, die mit Hilfe einer Berechnungssoftware durchgeführt werden können.

Da im Rahmen dieser Arbeit die Real Time PCR lediglich die Ergebnisse der Immunhistochemie auf molekularer Ebene stützen soll, wurden nur die Rohdaten der Ct-Werte der einzelnen Zelllinien miteinander verglichen. Der Ct-Wert (threshold cycle) dient als Maß für die Quantifizierung der DNA. Er beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und ein definiertes Fluoreszenzniveau erreicht, so dass es vom System detektiert werden kann (Pfaffl, 2004).

Je höher das Expressionsverhalten der Zellen ist, desto schneller wird dieses Fluoreszenzniveau erreicht und dementsprechend klein ist der Ct-Wert. Daher spricht ein geringer Ct-Wert für ein hohes Expressionsverhalten und umgekehrt (Schedel et al., 2004). Werden die Ct-Werte der einzelnen Zelllinien miteinander verglichen, kann man eine Aussage treffen, welche der getesteten Zelllinien das Gen am stärksten exprimiert (kleinster Ct-Wert) bzw. welche Zelllinie das geringste Expressionsverhalten (größter Ct-Wert) aufweist.

Durchführung

Für die PCR wurde das QuantiTect SYBR® Green PCR Kit von der Fa. Qiagen verwendet. Als Reaktionsgefäß diente eine 96 well PCR Platte für iCycler.

Jedes Tube wurde mit 2µl cDNA, 12,5µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 8µl RNasefreiem Wasser und den genspezifischen Maspin-Primern, jeweils 1,25µl forward und reverse, befüllt. Als Negativ- und Kontaminationskontrolle wurde die cDNA in einem Tube durch Wasser ersetzt. Die cDNA wurde in zwei Syntheseansätzen gewonnen und es wurden zwei PCR-Läufe gemacht, um Fehler auszuschließen. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 6 dargestellt.

Programm	Temperatur (°C)	Haltezeit (min)
Aktivierungsphase	95	15:00
PCR (40 Zyklen)		
Denaturierung	94	00 :15
Annealing	55	00 :30
Elongation	72	00 :30
Schmelzkurvenanalyse	95	01 :00
	55	01 :00
	55 (80 Zyklen)	00 :10

Tab. 6 Protokoll der Real Time PCR mit dem i-Cycler der Fa. BIO-RAD

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der immunhistochemischen Maspinfärbungen

Um das Expressionsverhalten von Maspin auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Gewebeproben von 87 Patientinnen immunhistochemisch angefärbt und beurteilt. Auch wenn es histo-pathologisch nicht ganz korrekt ist, wurden aufgrund der geringen Probenanzahl der LMP-Tumoren diese Tumoren mit den Ovarialkarzinomen als Gruppe der malignen Tumoren zusammengefasst.

Diese Gruppe umfasst insgesamt 79 Patientinnen, 73 Patientinnen mit einem invasiven Ovarialkarzinom und 6 Patientinnen mit einem Borderline Tumor. 13 (16,4%) dieser 79 Patientinnen, bei denen ein Karzinom oder Borderline Tumor diagnostiziert wurde, befanden sich in einem frühen Stadium (FIGO I-IIA). Bei 66 (83,5%) Patientinnen lag bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium (FIGO IIB-IV) vor. Wie zu erwarten dominiert beim Borderline Tumor das frühe FIGO Stadium. Wie auf Seite 6 beschrieben werden die meisten Borderline Tumoren im frühen Stadium diagnostiziert. Von den 6 Borderline Tumoren waren 5 (83,3%) im Stadium I-IIA und nur lediglich einer (16,7%) im Stadium IIB, das bereits zum fortgeschrittenen Stadium gezählt wird. Von den insgesamt 73 invasiven Karzinomen waren 8 (11%) im Stadium I-IIA und bereits 65 (89%) im Stadium IIB-IV. Unter den 65 fortgeschrittenen Karzinomen waren 16 (24,6%) im FIGO Stadium IV. 67 Patientinnen, von den Patientinnen mit invasivem Karzinom, erhielten platinbasierte Chemotherapie. 40 (59,7%) Patientinnen zeigten sich platinsensibel. 11 (16,4%) zeigten ein rezidivfreies Intervall von 6-12 Monaten. Bei 29 (43,3%) Patientinnen bestand eine rezidivfreie Zeit von mindestens 12 Monaten. Die immunhistochemische Anfärbung des Tumorgewebes der Patientinnen zeigt, dass Maspin überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist. Das Zytoplasma von 92,4% (73/79) der malignen Tumoren (Ovarialkarzinom und Borderline Tumor) ist Maspin positiv (IRS>0), wohingegen nur 30,4% (24/79) der malignen Tumoren eine Maspinexpression im Nukleus zeigen (IRS>0). Von den 73 im Zytoplasma maspinpositiven malignen Tumoren, stellen sich 51 (69,9%) mit einer schwachen Färbung und 22 (30,1%) mit einer starken Färbung dar. Bei sechs (7,6%) der 79 malignen Tumore lässt sich kein Maspin im Zytosol nachweisen. Werden die beiden Untergruppen der Gruppe der malignen Tumoren getrennt von einander betrachtet, so zeigt sich, dass alle 6 LMP-Tumoren (100%) im Zytoplasma maspinpositiv sind.

Einer (16,7%) von ihnen stark, die restlichen Fünf (83,3%) schwach. Im Nukleus kann bei fünf (83,3%) der sechs LMP-Tumoren Maspin nachgewiesen werden. Ein (16,7%) LMP-Tumor ist im Nukleus maspinnegativ. Von den 73 Ovarialkarzinomen exprimieren 67 (91,8%) Maspin im Zytosol. 21 (31,3%) von ihnen stark, 46 (68,7%) schwach. Eine nukleäre Maspinexpression weisen 19 der 73 (26%) Ovarialkarzinome auf. 62,5% (5/8) der benignen Tumore weisen eine zytoplasmatische Maspinexpression auf, die bei vier der fünf Tumoren als schwach und bei einem als stark einzustufen ist. Drei benigne Tumore (37,5%) fallen im Zytosol maspinnegativ aus. Bei den benignen Tumoren kann keine Maspinexpression im Nukleus nachgewiesen werden (Tabelle 7 und 8). Nur 10,3% (9/87) aller Tumore zeigen weder eine Maspinexpression im Zytoplasma, noch im Nukleus.

Tumorart	Anzahl insgesamt	Expression Zytosol					
		Negativ		Schwach positiv		Stark positiv	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Benigne Tumore	8	3	37,5%	4	50,0%	1	12,5%
Borderline Tumore	6	0	0,0%	5	83,3%	1	16,7%
Karzinome	73	6	8,2%	46	63,0%	21	28,8%

Tab. 7 Ergebnisse der immunhistochemischen Maspinfärbung im Zytosol

Tumorart	Anzahl insgesamt	Expression Nukleus			
		Negativ		Positiv	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
Benigne Tumore	8	8	100,0%	0	0,0%
Borderline Tumore	6	1	16,7%	5	83,3%
Karzinome	73	54	74,0%	19	26,0%

Tab. 8 Ergebnisse der immunhistochemischen Maspinfärbung im Nukleus

Für die statistische Auswertung der Maspinexpression erfolgt die Korrelation des ermittelten Immunreaktiven Scores, sowohl für die zytoplasmatische Expression, als auch für die Expression im Nukleus, mit verschiedenen klinisch pathologischen Daten, wie FIGO Stadium, histologischer Subtyp, Grading und Platinsensibilität.

Die zytoplasmatische Maspinexpression beim Ovarialkarzinom zeigt in der univariaten Analyse eine Signifikanz bezüglich der Platinsensibilität ($p=0,005$).

Weder der histologische Subtyp, noch das FIGO Stadium oder der Tumorgrad weisen einen signifikanten Zusammenhang beim Ovarialkarzinom zur zytoplasmatischen Maspinexpression auf. Das mittels Immunhistochemie ermittelte nukleäre Expressionsverhalten hingegen demonstriert eine statistische Signifikanz in Bezug auf den Tumorgrad ($p=0,01$). FIGO Stadium, histologischer Subtyp und Platinsensibilität sind statistisch nicht signifikant (Tabelle 9).

	Expression Zytosol	Expression Nukleus
<i>Variablen</i>	<i>P (Chi-Quadrat n. Pearson)</i>	<i>P (Chi-Quadrat n. Pearson)</i>
FIGO Stadium	0,604	0,189
Histologie	0,4	0,34
Tumorgrad	0,841	0,01
Platinbas. Chemotherapie	0,005	0,733

Tab. 9 Ergebnisse der statistischen Analyse der Maspinexpression beim Ovarialkarzinom mittels Chi-Quadrat Test

Desweiteren zeigt die univariate Analyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Maspinexpression im Zytoplasma und dem medianen Überleben ($p < 0,05$). Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom und einer hohen Maspinexpression weisen eine mediane Überlebenszeit von lediglich 28 Monaten auf. Im Vergleich dazu hatten Patientinnen mit einem geringen Expressionsverhalten eine mediane Überlebenszeit von 57 Monaten (Abbildung 6). Die nukleäre Maspinexpression weist keine Signifikanz bezüglich des medianen Überlebens auf ($p > 0,05$).

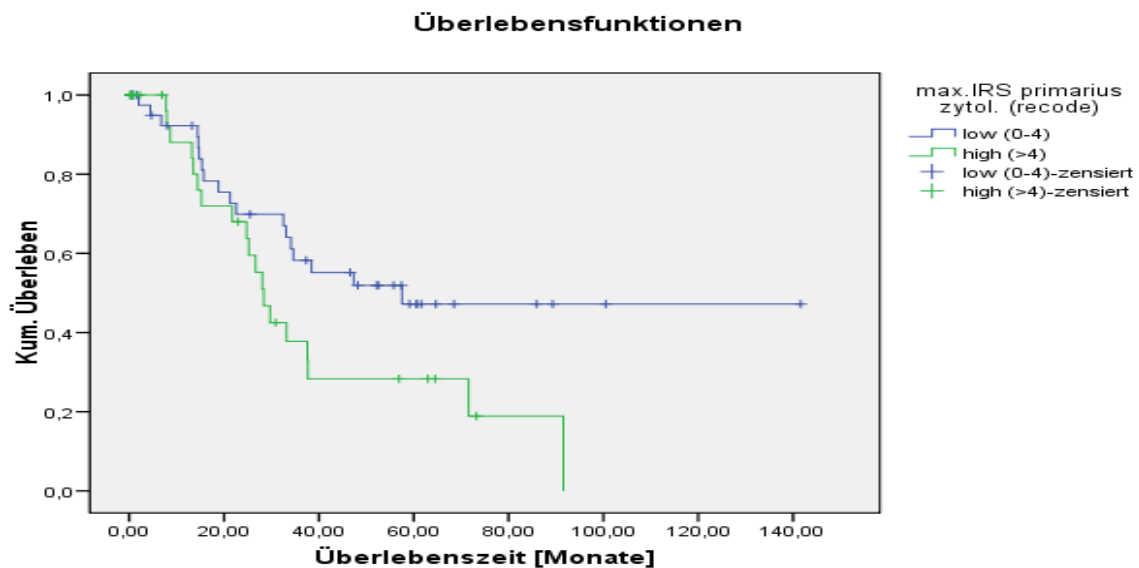


Abb. 6 Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für Patientinnen mit hoher (IRS > 4) und geringer (IRS < 4) Maspinexpression

Die multivariate Analyse, für die das Cox Hazard Model herangezogen wurde, kann das Ergebnis der univariaten Analyse hinsichtlich des medianen Überlebens nicht bestätigen. In die multivariate Analyse wird der Tumorgrad, das FIGO Stadium, das Alter, die Höhe der Maspinexpression und die Platinsensibilität einbezogen. Lediglich die Platinsensibilität kann signifikant mit dem medianen Überleben in Zusammenhang gebracht werden.

3.2 Immunhistochemische Beispielbilder

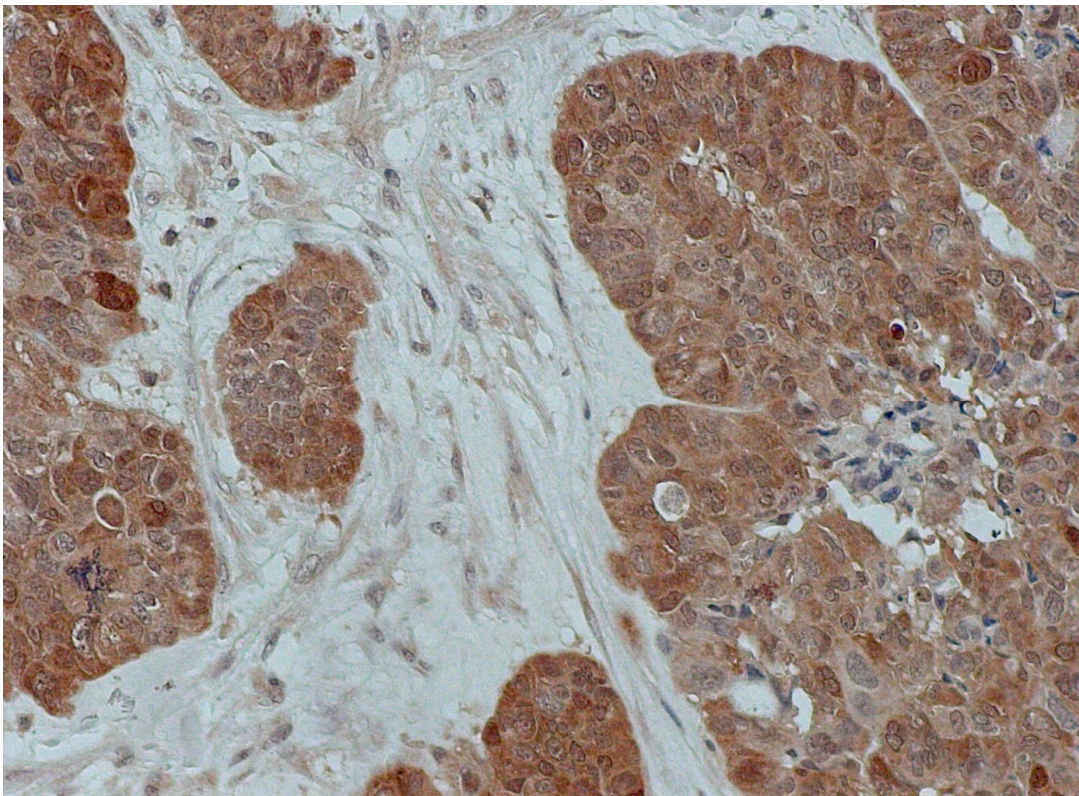


Abb. 7 (200 fache Vergrößerung) Ovarialkarzinom mit starker Maspinfärbung im Zytosol (IRS>4) und positiver Expression im Nukleus (IRS >0)

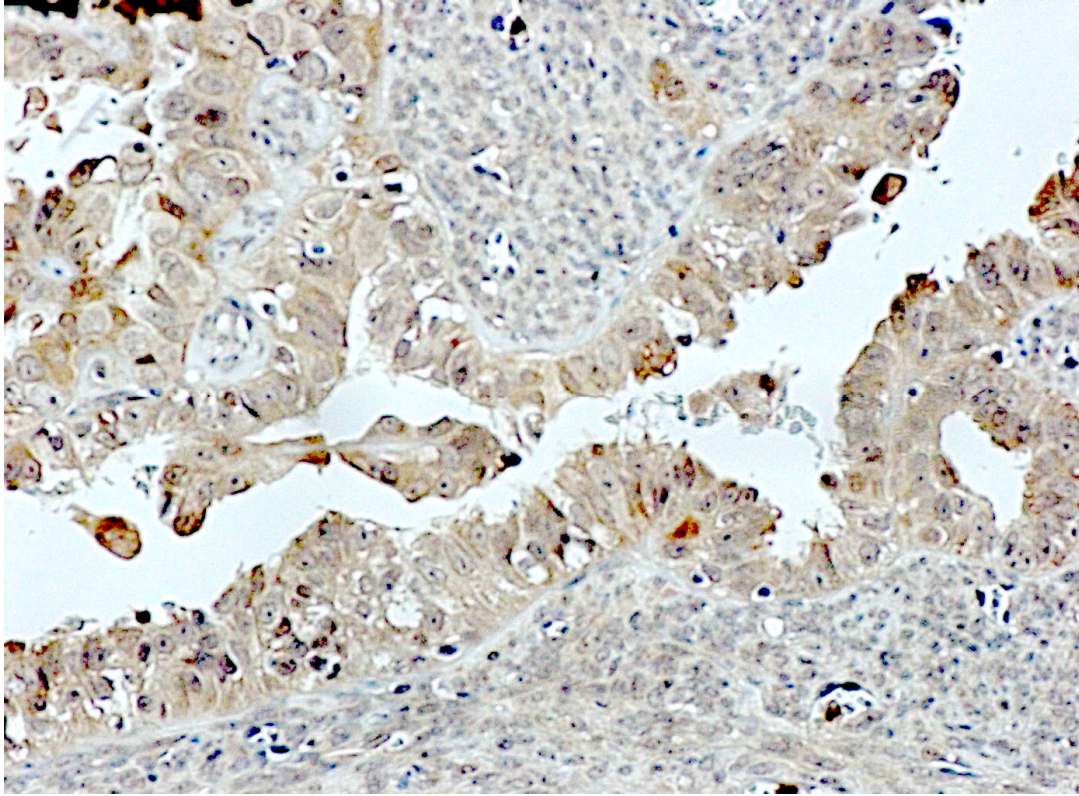


Abb. 8 (200 fache Vergrößerung) Ovarialkarzinom mit schwacher Maspin-färbung im Zytosol (IRS<4) und negativer Expression im Nukleus (IRS=0)

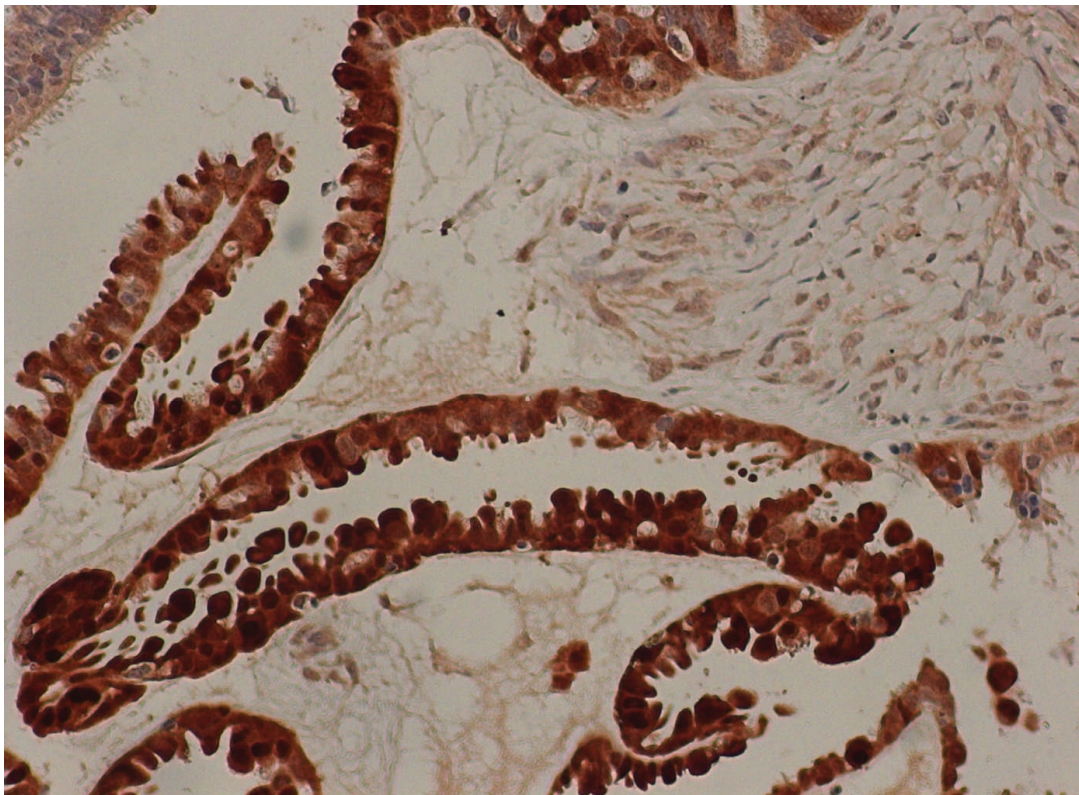


Abb. 9 (200 fache Vergrößerung) Zystadenom des Ovars mit starker Maspinfärbung im Zytosol ((IRS>4) und negativer Expression im Nukleus (IRS=0)

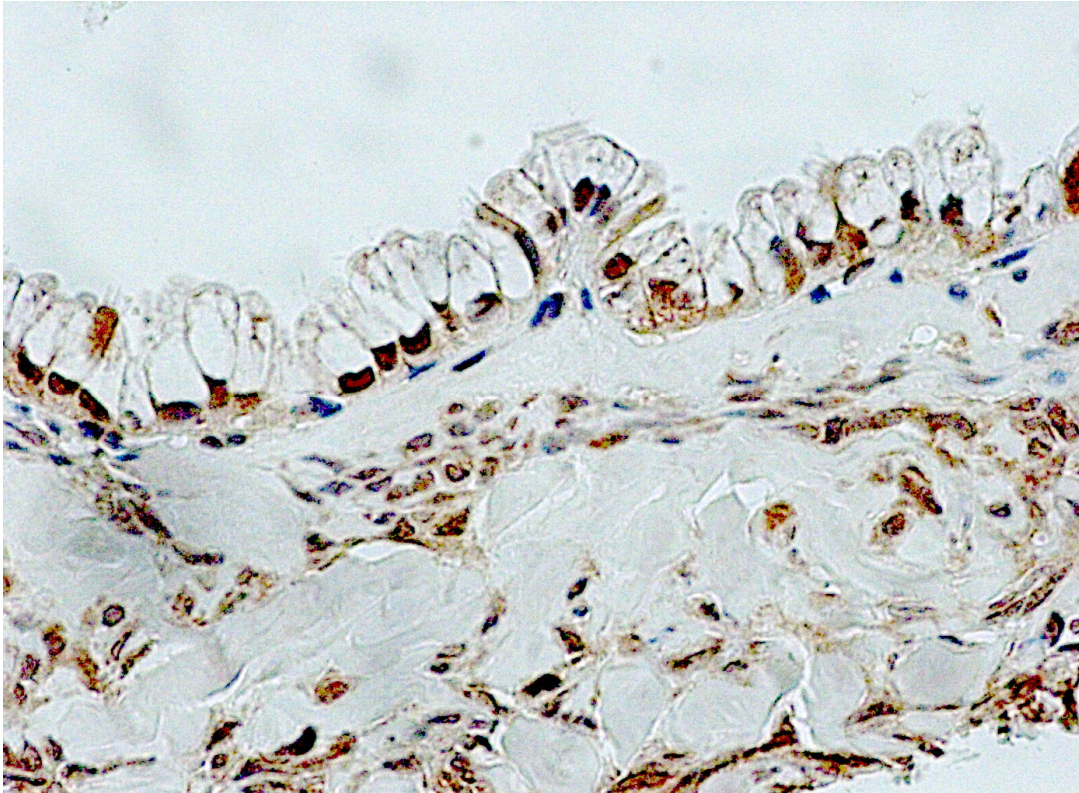


Abb. 10 (400 fache Vergrößerung) Zystadenom des Ovars mit schwacher Maspinfärbung im Zytosol (IRS<4) und negativer Expression im Nukleus

3.3 Ergebnisse der Real Time PCR

Mittels Real Time PCR wurde das Expressionsverhalten von Maspin bei 11 Zelllinien überprüft. Die Ergebnisse zeigen niedrige Ct-Werte für BXPC3 und für die Ovarialkarzinomzelllinien, bei denen eine Resistenz gegen Docetaxel und Paclitaxel induziert wurde (HEY Doc und HEY PAC) (Abbildung 11). Ein geringer Ct-Wert spricht für ein hohes Expressionsverhalten (s.S.29). BXPC3 ist eine Zelllinie des Pankreaskarzinoms. Pankreaskarzinome gehen mit einer erhöhten Maspinexpression einher (Fitzgerald et al., 2003 Maass et al., 2001), so dass bei der Quantifizierung des Expressionsverhaltens mittels Real Time PCR ein niedriger Ct-Wert erwartet wird. Die Ovarialkarzinomzelllinien "HEY" mit induzierter Resistenz gegen Docetaxel und Paclitaxel sollen in dieser Arbeit chemotherapieresistente Patientinnen repräsentieren. Diese Patientinnen haben im Allgemeinen eine schlechte Prognose. In der Real Time PCR zeigen diese Zelllinien niedrige Ct-Werte, was auf ein erhöhtes Expressionsmuster hindeutet.

Dieses ermittelte erhöhte Expressionsverhalten von Maspin in den resistenten Karzinomzelllinien HEY PAC und HEY DOC weist auf die ungünstige Funktion von Maspin in Karzinomzelllinien des Ovars hin und spricht für das Ergebnis der univariaten Analyse. Die univariate Analyse demonstriert, dass Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom und einer hohen Maspinexpression eine kürzere mediane Überlebenszeit aufweisen, als Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom und geringer Maspin Expression. Die Normalepithelien aus dem Ovar weisen hier hohe Ct-Werte auf und sprechen somit für ein geringes Expressionslevel. Die bekannte Abnahme der Maspinexpression beim Mammakarzinom während der Tumorprogression stellt sich hier dar, indem sich die Ct-Werte der Mammakarzinomzelllinien MDA-MB231 und MCF 7 zwischen der Karzinomzelllinie aus dem Pankreas bzw. den resistenten Zelllinien des Ovars und den Karzinomzelllinien aus dem Ovar (OVCAR 8 und 3) bzw. dem Normalepithel einpendeln.

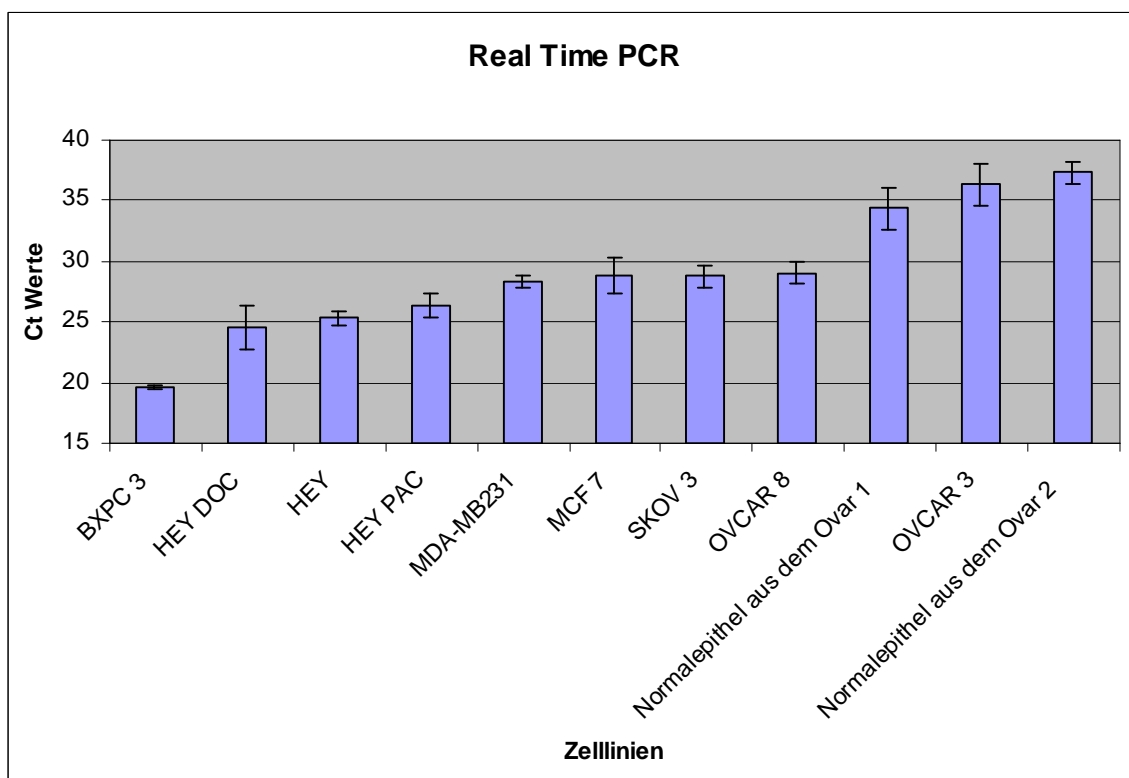


Abb. 11 Ct-Werte der mittels Real Time PCR untersuchten Zelllinien. Im Vergleich zu normalen Epithelzellen des Ovars zeigt die Pankreaskarzinomzelllinie "BXPC 3" und die chemoresistenten Zelllinien des Ovars "HEY DOC" und "HEY PAC", geringere Ct-Werte, was auf ein stärkeres Expressionsmuster hindeutet.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse und Faktoren, die diese beeinflussen können

Das Ovarialkarzinom stellt das gynäkologische Malignom mit der höchsten Mortalität dar. Aufgrund des zunächst recht symptomarmen Verlaufs und mangelnder Screeningmethoden liegt bei Diagnosestellung oftmals schon ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor. Daher besteht Bedarf, Marker zu identifizieren, die zur Abschätzung des Krankheitsverlaufs und der Therapieoptimierung herangezogen werden können. Ein solcher Marker könnte Maspin sein. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Expressionsverhaltens von Maspin im Ovar und Ovarialkarzinom und soll die Fragen klären, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Maspinexpression und klinisch pathologischen Tumorparametern besteht und ob sich Maspin somit als prognostischer Marker nutzen lässt. Maspin (Mamma-Serin-Protease-Inhibitor) wurde erstmals in den '90er Jahren von Zou et al in normalen Mammaepithelzellen identifiziert (Zou et al., 1994). Die Expression von Maspin wird in der Entwicklung zum Karzinom im Mammaepithel herunterreguliert. Beim Mammakarzinom korreliert die Höhe der Expression invers mit der Tumorprogression. Untersuchungen von Maass et al demonstrieren eine schrittweise Abnahme der Maspinexpression im Verlauf vom normalen Mammagewebe über das duktales Carcinoma in situ zum invasiven Mammakarzinom und Lymphknoten-Metastase (Maass et al., 2001). In einer weiteren Studie konnten Maass et al. bei 29 von 45 Mammakarzinomproben Maspin nachweisen, wohingegen die anderen 16 Gewebeproben maspinnegativ waren. Acht der 45 Patientinnen entwickelten Metastasen, von denen drei maspinpositiv waren und in den anderen fünf kein Maspin nachgewiesen werden konnte (Maass et al., 2001). Sheng et al. zeigen, dass Maspin in der Lage ist, die Invasion des Mamma- und Prostatakarzinoms durch Herabsetzen der Zellmotilität zu inhibieren (Sheng et al., 1996). Somit stellt sich Maspin als Serin-Protease-Inhibitor mit tumorsuppressiven Eigenschaften beim Mammakarzinom dar. Im Vergleich zum Mammaepithel exprimiert normales Pankreasgewebe kein Maspin. Erst die Entwicklung zu einem Pankreaskarzinom führt zu einem Anstieg der Maspinexpression (Fitzgerald et al., 2003; Maass et al., 2001). Derzeit liegen nur wenige Daten bezüglich der Maspinexpression beim Ovarialkarzinom vor.

Sood und Kollegen waren die Ersten, die sich mit der Maspinexpression in normalem Ovarialepithel und beim Ovarialkarzinom beschäftigten (Sood et al., 2002). Die univariaten und multivariaten Ergebnisse ihrer Analyse zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Überexpression von Maspin und dem Überleben. In der univariaten Analyse stellen sie dar, dass die Überexpression von Maspin mit einer kürzeren medianen Überlebenszeit einhergeht, als eine geringe Maspinexpression (2,67 versus 6,33 Jahre). In der multivariaten Analyse von Sood und Kollegen zeigt sich die Maspinüberexpression als signifikanter Prädiktor für eine kurze Überlebenszeit ($p < 0,02$) (Sood et al., 2002). Secord beschreibt in seiner Arbeit gegenteilige Ergebnisse. Seinen Angaben nach führt eine Maspinexpression bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu einem längeren medianen Überleben (41,2 Monate), als bei Patientinnen, bei denen kein Maspin nachzuweisen ist (20,7 Monate) (Secord et al., 2006). Dieser Aspekt bekräftigt die Aussage, dass Maspin ein potenter Tumorsuppressor darstellt, widerspricht aber der Aussage von Sood.

Auf der einen Seite zeigen die Resultate der univariaten Analyse der vorliegenden Arbeit mit Sood vergleichbare Ergebnisse. Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom und hoher Maspinexpression im Zytosol weisen eine mediane Überlebenszeit von 28 Monaten auf, wohingegen Patientinnen mit Ovarialkarzinom und geringer Maspinexpression eine mediane Überlebenszeit von 57 Monaten haben. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten LMP-Tumoren sprechen dafür, dass eine geringe Maspinexpression mit einer besseren Prognose einhergeht. Bei einer aus der Literatur bekannten 10-Jahresüberlebensrate von über 90% (Bauerschlag et al., 2006), zeigt sich die überwiegende Anzahl der LMP-Tumoren hier lediglich mit einer schwachen Expression von Maspin im Zytosol. Auf der anderen Seite kann die multivariate Analyse der Arbeit die Ergebnisse von Sood jedoch nicht bestätigen. Hier kann lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem medianen Überleben und der Platinsensibilität ($p < 0,05$) nachgewiesen werden. Möglicherweise lässt sich das abweichende Ergebnis durch die geringe Anzahl der in die Studie miteinbezogenen Patientinnen erklären. Möchte man die vorliegende Arbeit mit den Arbeiten von Sood oder Secord vergleichen, müssen neben der geringen Probenanzahl weitere Faktoren berücksichtigt werden. Unterschiedliche Ergebnisse können daher rühren, dass unterschiedliche Methoden zum Einsatz kamen.

Während Sood und Secord ihre Ergebnisse mittels Western Blot und Sood zusätzlich mit Northern Blot und Reverse-Transcriptase-PCR begründen, kommt in der vorliegenden Arbeit die Immunhistochemie und das Verfahren der Real Time PCR zum Einsatz. Ein weiterer Aspekt stellt das Ausgangsmaterial dar. Secord arbeitet mit gefrorenem Gewebe, wohingegen in der vorliegenden Arbeit und in der Arbeit von Sood formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe genutzt wird. Sowohl Sood, als auch Secord können in ihren Arbeiten keinen Zusammenhang zwischen der Maspinexpression, dem histologischen Subtypen und dem FIGO Stadium belegen. Während Sood eine signifikante Korrelation zwischen der Maspinexpression, dem Tumorgrad und dem Auftreten von Aszites beschreibt, korreliert in Secords Arbeit die Maspinexpression nicht mit dem Tumorgrad (Sood et al., 2002; Secord et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wird sowohl die nukleäre, als auch die zytosolische Expression von Maspin betrachtet. Ähnlich wie in dieser Arbeit konnte Sood darstellen, dass Maspin bei den invasiven Tumoren überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist. Auch die Studie von Abd El-Wahed zeigt die mehrheitliche Lokalisation von Maspin im Zytoplasma (Abd El-Wahed, 2005). In seiner Studie sind von 46 Ovarialkarzinomen 29 positiv. Von ihnen sind 20 (69,0%) nur im Zytosol positiv, 8 (27,6%) weisen eine Expression sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus auf und einer (3,4%) ist ausschließlich im Nukleus positiv. In der vorliegenden Arbeit zeigen Tumoren mit überwiegend zytoplasmatischer Expression in der univariaten Analyse keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster, histologischen Subtypen, FIGO Stadium und Tumorgrad. Lediglich die Platinsensibilität scheint mit der Expression von Maspin im Zytoplasma in Zusammenhang zu stehen. Bei Tumoren mit überwiegend nukleär lokalisierter Maspinexpression korrelieren in dieser Arbeit in der univariaten Analyse die Maspinexpression und der Tumorgrad signifikant miteinander. Zwischen Maspinexpression, histologischem Subtyp, FIGO Stadium und Platinsensibilität zeigt sich kein Zusammenhang. Erstaunlicherweise stellt sich in der univariaten Analyse eine Signifikanz bezüglich der Maspinexpression im Zytosol und dem medianen Überleben dar, welche sich bei der nukleären Maspinexpression nicht zeigt (s.S. 34). Auch in anderen Tumorentitäten spielt die Lokalisation von Maspin eine wichtige Rolle. Während die Maspinlokalisierung im Zytoplasma beim Mammakarzinom nach Angaben von Mohsin und Kollegen mit einer schlechten Prognose einhergeht, spricht das nukleär lokalisierte Maspin für eine gute Prognose (Mohsin et al., 2003).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Gegenwart von Maspin in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle unterschiedliche biologische und klinische Auswirkungen hat. Dies könnte auch beim Ovarialkarzinom der Fall sein, bedarf aber weiterer Studien mit größerer Probenanzahl. Wie eingangs auf Seite 2 beschrieben, spielt der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) für die Angiogenese eine wichtige Rolle. So konnte eine erhöhte VEGF-A-Expression bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Bolat zeigte, dass die Maspinexpression positiv mit der Expression von VEGF-A, -C, -D und der Tumorprogression korreliert (Bolat et al., 2008). Daher könnte die zytoplasmatische Maspinexpression als Indikator für einen möglichen Benefit einer antivaskulären Therapie gelten. Um diese schwierigen molekularen Vorgänge und Zusammenhänge zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Ergebnisse der Real Time PCR dieser Arbeit zeigen, dass Zelllinien des Ovarialkarzinoms, vor allem die Zelllinien mit induzierter Chemoresistenz "HEY DOC" und "HEY PAC", mehr Maspin exprimieren, als normale Epithelzellen des Ovars. Rose et al. beschreiben ähnliche Ergebnisse (Rose et al., 2006). 2006 konnten sie in normalem Oberflächenepithel des Ovars kein Maspin nachweisen. Dahingegen zeigten sie eine hohe Expression bei SKOV 3, einer Karzinomzelllinie des Ovars. Auch Sood und Kollegen haben gezeigt, dass Normalepithel des Ovars kaum Maspin exprimiert (Sood et al., 2002). Desweiteren zeigten sie mittels Northern Blot, dass OVCAR 3 mehr Maspin exprimiert, als SKOV 3, was mit der vorliegenden Analyse nicht bestätigt werden kann. In den vorliegenden Ergebnissen exprimiert SKOV 3 stärker, als OVCAR 3. Obwohl die biologische Bedeutung einer erhöhten Maspinexpression noch nicht vollständig geklärt ist, scheint es eine Rolle für die Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu spielen. Limitierender Faktor dieser und anderer Studien stellt die geringe Anzahl an Proben dar, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Umfangreiche prospektive Studien sind notwendig um zu beurteilen, ob das verminderte Ansprechen auf Chemotherapie wirklich auf die Maspinexpression und deren Höhe zurückführbar ist. Dennoch profitieren bestimmt einige Patientinnen, die an einem maspinexprimierenden Ovarialkarzinom erkrankt sind, von einer taxanbasierten Chemotherapie in Kombination mit Platinderivaten. Möglicherweise könnte Maspin auch als neues Target für Chemotherapeutika dienen, so dass auch Patientinnen mit einem hohen Expressionsmuster von einer Chemotherapie einen Nutzen ziehen könnten.

In diesem Kontext sollte erwähnt werden, dass die in Kapitel drei dargestellten Ergebnisse durch verschiedene Sachverhalte beeinflusst werden können. So können Faktoren in der Immunhistochemie das Färbegergebnis beeinträchtigen oder auch allgemeine Merkmale des Kollektivs, wie z.B. das Alter oder bestimmte Tumorcharakteristika, wie FIGO-Stadium und histologischer Subtyp, Auswirkungen auf die Ergebnisse haben. Zwar stellt heutzutage der immunhistochemische Nachweis bestimmter Proteine im Zielgewebe ein weit verbreitetes Verfahren in der Forschung und Diagnostik dar, dennoch sind optimale Färbebedingungen in Form von etablierten Färbeprotokollen notwendig, um repräsentative Färbeergebnisse zu erzielen. Da ausreichend Erfahrung zur Maspinimmunhistochemie im onkologischen Labor der Universitätsfrauenklinik vorhanden war, lag zu Beginn der Arbeit bereits ein etabliertes Protokoll zur Färbung vor. Neben dem Färbeprotokoll können auch die Aufarbeitung der Gewebeproben, die Auswahl der Reagenzien und die sich anschließende Interpretation der Färbung die Ergebnisse beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebeproben nach der Gewinnung in Formalin fixiert und im Anschluss in Paraffin eingebettet. Als Vorteil bietet dieses Verfahren die gute Erhaltung der Morphologie. Kritisch anmerken muss man jedoch, dass die Formalinfixierung zu Veränderungen der Proteinstruktur führt, wodurch die Bindung des Antikörpers an das entsprechende Epitop verhindert werden kann. Diese sogenannte "Maskierung" des Epitops führt daher zu einer Abnahme der Immunreaktivität (Boenisch et al., 2006; Mc Nicol et al., 1998). Um die verlorengegangene Immunreaktivität wiederherzustellen, kann eine Antigendemaskierung durchgeführt werden, bei der pH-Wert und Hitze eine entscheidende Rolle spielen. Auch das Alter kann Einfluss auf die Ergebnisse ausüben. Nach Angaben des Robert Koch Institutes 2010 besteht der Altersdurchschnitt bei Erkrankung 68 Jahre. In der vorliegenden Arbeit liegt das mediane Erkrankungsalter mit 63 Jahren deutlich darunter. Da ein junges Erkrankungsalter das Überleben positiv beeinflusst, könnte sich in dem untersuchten Kollektiv die Komorbidität kleiner darstellen, als in anderen Studien. Laut Literatur hat der Krankheitsprozess etwa bei 75% der Patientinnen bei Diagnosestellung bereits das kleine Becken überschritten und ist somit den fortgeschrittenen Stadien FIGO III und IV zu zuordnen (Stauber et al., 2005). Diesem Wert kommen wir in unserer Arbeit mit 78,5% sehr nahe, so dass die Arbeit in diesem Punkt auf andere Kollektive übertragbar ist.

Bezüglich der histologischen Differenzierung weichen die Tumorcharakteristika dieser Arbeit jedoch von denen in der Literatur Beschriebenen ab. Obwohl in der Arbeit und auch in der Literatur der serös/papilläre Typ den größten Anteil unter den histologischen Subtypen einnimmt, differieren die prozentualen Werte enorm. Während der serös/papilläre Typ in der Literatur mit etwa 40% angegeben wird, zeigt das untersuchte Kollektiv diesen histologischen Subtypen mit 72,4% fast doppelt so häufig. Möglicherweise ist auch für diesen Unterschied das kleine Kollektiv heranzuziehen. Ebenso nennenswert ist die im Patientenkollektiv bestehende Anzahl an platinrefraktären Karzinomen. Sie ist mit 26,9% im Vergleich zu der von M. Gropp und J. Sehouli von der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie E.V. in ihrem Vortrag 2007 dargestellten 20% etwas erhöht (Gropp, Sehouli, 2007). Auch diesbezüglich wäre es wichtig, für weitere Analysen ein größeres Kollektiv heranzuziehen, das auch in diesem Punkt auf die Allgemeinheit übertragbare Merkmale enthält.

4.2 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Zum Einen sollten, wie bereits erwähnt, Untersuchungen in größeren Kollektiven durchgeführt werden, um die prognostische Bedeutung von Maspin endgültig zu klären. Zum Anderen wäre es denkbar, Chemotherapeutika zu entwickeln, die direkt mit Maspin interagieren und somit dieses Protein als therapeutisches Target für Chemotherapien zu verwenden. Hierfür ist es erforderlich, die vollständige Funktion und Wirkungsweise von Maspin in normalen Epithelzellen und in Tumorzellen des Ovars zu verstehen. Im Kleintierversuch könnte nach Tumorinduktion versucht werden, die Maspinexpression hoch zu regulieren, um positive Konditionen für ein Ansprechen auf Chemotherapeutika herauszufinden. Des Weiteren wäre eine Option, Maspin auf Strahlensensibilität zu überprüfen. Die Strahlentherapie beim Ovarialkarzinom ist heute durch die Chemotherapie ersetzt worden, so dass meist nur eine palliative Bestrahlung zur Analgesie bei Knochenmetastasen zum Einsatz kommt. Würde sich Maspin und somit auch maspinpositive Tumoren als besonders strahlensensibel erweisen, wäre es denkbar, die Strahlentherapie im Sinne einer Brachytherapie als weitere Option in das Therapieregime des Ovarialkarzinoms aufzunehmen. Hierbei gilt allerdings die gegenwärtige Problematik der Strahlendosis zu bedenken.

Um die intraabdominalen Organe nicht zu schädigen, darf die Dosis nicht höher als 25 Gray liegen (Feige et al., 2006). Daher müsste Maspin sich als extrem strahlensensibel darstellen. In der vorliegenden Arbeit konnte in der univariaten Analyse gezeigt werden, dass eine erhöhte Maspinexpression mit einer verkürzten medianen Überlebenszeit, im Vergleich zu einer geringeren Expression, einhergeht. Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Prognose könnten daher Untersuchungen mit Hilfe der sogenannten „Knockout-Maus“ darstellen. Eine gestörte Genfunktion ist die Grundlage vieler Erkrankungen. Bei der „Knockout-Maus“ handelt es sich um ein Tiermodell, bei dem gezielt Gene deaktiviert werden können. Durch das Ausschalten bestimmter Gene und deren Expression, hier Maspin, lassen sich Aussagen bezüglich ihrer Rolle im Krankheitsverlauf treffen. In diesem Fall müsste überprüft werden, ob eine auf solche Weise herabregulierte Maspinexpression zu einem besseren Überleben der Patientinnen führt. Bolat stellte 2008 die positive Korrelation der Maspinexpression mit dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dar (siehe Seite 41), so dass der Einsatz antivaskulärer Therapien eine weitere Option in der Behandlung des Ovarialkarzinoms darstellen könnte.

5. Zusammenfassung

Ungenügende Möglichkeiten der Frühdiagnostik und Therapie von Ovarialkarzinomen führen zu einem schlechten Gesamtüberleben der Patientinnen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einer retrospektiven Studie das Expressionsverhalten des Serin-Protease-Inhibitors Maspin auf molekularer und Proteinebene mittels Real Time PCR und Immunhistochemie beim Ovarialkarzinom überprüft. Ziel der Arbeit war es, durch die Analyse des Expressionsverhaltens zu klären, ob Maspin als prognostischer Faktor bei der Erkrankung eines Ovarialkarzinoms herangezogen werden kann. Mit Hilfe der Real Time PCR wurde das Expressionsmuster von 11 Zelllinien aus Ovar, Mamma und Pankreas untersucht (siehe auch Seite 18, 24). Für die Immunhistochemie standen Schnittpräparate von 87 Patientinnen zur Verfügung. Davon hatten 73 Patientinnen ein Ovarialkarzinom, 6 Patientinnen einen Borderline Tumor und 8 Patientinnen einen benignen Tumor des Ovars. Die Bewertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte anhand des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner. In der statistischen Analyse erfolgte die Korrelation der Maspinexpression mit den Prognosefaktoren Tumorstadium (FIGO), Histologie, Tumorgrad und Platinsensibilität. Zusammenfassend wird der Mamma Serin Protease Inhibitor Maspin in Ovarialkarzinomen unterschiedlich exprimiert. In der univariaten Analyse zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Maspinexpression im Zytoplasma und der Platinsensibilität. Die nukleäre Maspinexpression korreliert signifikant mit dem Tumorgrad. FIGO-Stadium und histologischer Subtyp zeigen weder bei der nukleären, noch bei der zytoplasmatischen Expression eine Signifikanz. Desweiteren zeigt sich in der univariaten Analyse, dass ein geringer Expressionsgrad im Zytoplasma mit einem längeren Überleben einhergeht, als ein erhöhtes Expressionslevel. Obwohl in der multivariaten Analyse lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem medianen Überleben und der Platinsensibilität besteht, gehen wir aufgrund der Ergebnisse der univariaten Analyse davon aus, dass Maspin ein potenter Marker für die Prognose darstellt. Diese Aussage wird durch die vorliegenden Ergebnisse der Real Time PCR gestützt. Diese zeigen bei Patientinnen mit chemoresistentem Karzinom und der daraus resultierenden schlechten Prognose niedrige Ct-Werte und somit hohe Expressionsmuster von Maspin.

Auch die intrazelluläre Lokalisation von Maspin ist möglicherweise entscheidend, inwieweit Maspin auf den Tumorphänotypen Einfluss nehmen kann.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und die Wertigkeit von Maspin als klinischen Parameter endgültig zu klären, sind weitere Analysen eines größeren, nach Standard operierten Kollektivs mit einheitlichen Rahmenbedingungen, notwendig.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex-Methode
Ak	Antikörper
β-FGF	Basic fibroblast growth factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
BRCA-Gen	Breast cancer-Gen (Brustkrebs-Gen)
BSA	Bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca	Circa (ungefähr)
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	cycle treshold
DAB+	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
Et al.	Und andere
Fa	Firma
Fab	Antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
Fc	Kristallines Fragment eines Antikörpers
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Förster- oder auch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
HBOC	Hereditary breast-ovarian cancer (hereditäres Mamma-Ovarialkarzinom)
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (hereditäres nichtpolypöses Kolorektalkarzinom)
HRP	Horseradish-peroxidase, Meerrettichperoxidase
IRS	Immunreaktiver Score
Kat Nr	Katalognummer
LMP	Low malignant potency-tumor
LSAB-Methode	Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode
Min	Minuten

µl	Mikroliter
MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)-Gen
mm	Milimeter
MSH2	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)-Gen
n	Number (Anzahl)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH-Wert	potentia Hydrogenii; Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2-Gen
P-Wert	p-value von probability (Signifikanzwert)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Statistikprogramm)
Tab	Tabelle
TAF	Tumor angiogenesis factor (Tumor Angiogenese Faktor)
U	Unit (Einheit)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel

6.2 Klassifikation der Ovarialtumoren nach WHO

Histologische Klassifikation der Ovarialtumoren nach WHO	
1. Epitheliale Tumoren	<ul style="list-style-type: none"> - Seröse Tumoren - muzinöse Tumoren - endometrioiden Tumoren - hellzellige Tumoren - Brenner Tumoren - plattenepitheliale Tumoren - gemischte epitheliale Tumoren - undifferenziertes Karzinom
2. Stromatumoren	<ul style="list-style-type: none"> - Granulosastromazelltumoren <ul style="list-style-type: none"> > Granulosazelltumoren > Tumoren der Thekom-Fibrom-Gruppe - Androblastome, Sertoli-Leydig-Zelltumoren - Gynandroblastome - unklassifizierte Stromatumoren
3. Lipidzelltumoren	
4. Keimzelltumoren	<ul style="list-style-type: none"> - Dysgerminome - entodermale Sinustumoren - embryonale Karzinome - Polyembryome - Chorionkarzinome - Teratome - gemischte Formen
5. Gemischte Keimzelltumoren und Stromazelltumoren	
6. Bindegewebige, nichtovarspezifische Tumoren	
7. Unklassifizierte Tumoren	
8. Sekundäre metastatische Tumoren	
9. Tumorähnliche Veränderungen	

Tab. 10 Quelle: Baltzer et al., 2004

6.3 Literaturverzeichnis

Abd El-Wahed MM (2005): Expression and subcellular localization of maspin in human ovarian epithelial neoplasms: correlation with clinicopathologic features. J Egypt Natl Canc Inst. 17 (3), 173-178

Baltzer J, Friese K, Graf M, Wolff F (2004): Praxis der Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 558-577

Bauerschlag DO, Meinhold I, Schem C, Mundhenke C, Jonat W, Maass N (2006): Borderline-Tumor des Ovars-Molekulargenetisches Verständnis und Therapie. Der Gynäkologe 39, 438-441

Boecker W, Denk H, Heitz PU (2004): Pathologie. Urban und Fischer, München, 3, 169-216

Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, KEY M, Welcher R, Harvey R, Atwood K (2006): Handbuch Immunchemische Färbemethoden. DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, 3, 5-63

Bolat F, Gumurdulu D, Erkanli S, Kayaselcuk F, Zeren H, Ali Vardar M, Kuscu E (2008): Maspin overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C and D in human ovarian carcinoma. Pathol Res Pract 204 (6), 379-387

Bräutigam K, Bauerschlag DO, Weigel MT, Biernath-Wüpping J, Bauknecht T, Arnold N, Maass N, Meinhold-Heerlein I (2009): Combination of enzastaurin and pemetrexed inhibits cell growth and induces apoptosis of chemoresistant ovarian cancer cells regulating extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. Trans Onc. 2, 164-173

Buick RN, Pullano R, Trent JM (1985): Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. Cancer Res. 45, 3668-3676

Burgis E (2005): Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie. Urban und Fischer Verlag, München, 3, 563-579

Du Bois A, Rochon J, Lamparter C, Pfisterer J (2005): Welchen Einfluss haben Klinikmerkmale auf die Prognose beim Ovarialkarzinom in Deutschland? Zentralbl Gynakol. 127, 18-39

Feige A, Rempfen A, Würfel W, Jawny J, Rohde A (2006): Frauenheilkunde Fortpflanzungsmedizin Geburtsmedizin Onkologie Psychosomatik. Urban und Fischer Verlag, München, 3, 743-766

Fitzgerald M, Oshiro M, Holtan N, Krager K, Cullen JJ, Futscher BW, Domann FE (2003): Human pancreatic carcinoma cells activate maspin expression through loss of epigenetic control. Neoplasia 5, 427-436

Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP (1985): Formaldehyde Fixation. J Histochem Cytochem. 33(8), 845-853

Fraenkel-Conrat H, Brandon BA, Olcott HS (1947): The reaction of formaldehyde with proteins. IV. Participation of indole groups. Gramicidin. J Biol Chem. 168, 99-118

Fraenkel-Conrat H, Olcott HS (1948a): Reaction of formaldehyde with proteins. VI. Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups. J Biol Chem. 174, 827-843

Gerber B, Janni W, Friese K (2006): Gynäkologische Onkologie. Ein Taschenbuch zu Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 134-170

Gropp M, Sehouli J (2007): Rezidivtherapie platinrefraktäres und platinsensibles Rezidiv. Ein Vortrag der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie E.V.

<http://www.ago->

[online.de/_download/unprotected/sta_ovar_15_gropp_rezidiv_platinrefrak_platinsens.pdf](http://www.ago-online.de/_download/unprotected/sta_ovar_15_gropp_rezidiv_platinrefrak_platinsens.pdf)

Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF (1983): Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* 43, 5379-5389

Hoskins WJ (1994): Epithelial ovarian carcinoma: principles of primary surgery. *Gynecol Oncol.* 55, 91-96

Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL (1994): Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res.* 54, 2615-2621

Jänicke F (1999): Das fortgeschrittene Ovarialkarzinom – Entwicklung der operativen und systemischen Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 96 (5), 281-288

Livak, KJ (1996): Quantitation of DNA/RNA using Real-Time PCR detection. *Perkin-Elmer Applied Biosystems Report*

Lüllmann, H, Mohr K (2001): Taschenatlas der Pharmakologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 4, 304-307

Lynch HT, Smyrk T, Lynch J (1997): An update of HNPCC (Lynch Syndrome). *Cancer, Genetics and Cytogenetics* 93, 84-99

Maass N, Hojo T, Rösel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K (2001): Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem.* 34, 303-307

Maass N, Hojo T, Ueding M, Lüttges J, Klöppel G, Jonat W, Nagasaki K (2001): Expression of the tumor suppressor gene maspin in human pancreatic cancers. *Clin Cancer Res.* 7, 812-817

- Maass N, Teffner M, Rösel F, Pawaresch R, Jonat W, Nagasaki K, Rudolph P (2001): Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumor progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol.* 195 (3), 321-326
- Mason JT, O'Leary TJ (1991): Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem.* 39, 225-229
- McNicol AM, Richmond JA (1998): Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. *Histopathol.* 32, 97-103
- Mermarzadeh S, Berek JS (2001): Advances in the management in epithelial ovarian cancer. *J Reprod. Med.* 46, 621-629, discussion 629-630
- Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, Allred DC (2003): Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. *J Pathol.* 199, 432-435
- Morimoto H, Safrit JT, Bonavida B (1991): Synergistic effect of tumor necrosis factor- α - and diphtheria toxin- mediated cytotoxicity in sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines. *J Immunol.* 147 (8), 2609-2616
- Münstedt K, Stehen J (2000): Steroid hormone receptors and long term survival in invasive ovarian cancer. *Cancer* 15; 89(8), 1783-1791
- Nennstiel S (2009): BASICS Allgemeine Pathologie. Urban und Fischer, München, 82-97
- Neusser M (2000): Echtzeit-PCR-Verfahren zur Quantifizierung von PCR-Produkten. *Transkript Laborwelt* 2, 16-20
- Petru E, Jonat W, Fink D, Köchli O (2009): Praxisbuch Gynäkologische Onkologie, Springer, Heidelberg, 99-123

Pfaffl MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1, 92-95

Pfisterer J (2004): Recurrent Ovarian Cancer. *Onkologie* 27, 7-8

Qiagen (2003): QuantiTect SYBR® Green PCR Handbook, Hilden, 25-34

Remmele W, Stegner HE (1987): Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis im Mammakarzinomgewebe. *Der Pathologe* 8, 138-140

Robert Koch Institut (2010): Krebs in Deutschland 2005-2006 Häufigkeiten und Trends. Westkreuz-Druckerei Berlin, Berlin, 7, 68-71

Rose SL, Fitzgerald MP, White NO, Hitchler MJ, Futscher BW, De Geest K, Domann FE (2006): Epigenetic regulation of maspin expression in human ovarian carcinoma cells. *Gynec Oncol.* 102, 319-324

Salani R, Santillan A, Zahurak M, Giuntoli R, Gardner GJ, Armstrong DK, Bristow RE (2007): Secondary cytoreductive surgery for localized recurrent epithelial ovarian cancer: Analysis of prognostic factors and survival outcome. *Cancer* 109, 685-691

Schedel J, Distler O, Woenckhaus M, Gay RE, Simmen B, Michel BA, Müller-Ladner U, Gay S (2004): Discrepancy between mRNA and protein expression of tumor suppressor maspin in synovial tissue may contribute to synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 63, 1205-1211

Secord A, Lee P (2006): Maspin expression in epithelial ovarian cancer and associations with poor prognosis: A gynecologic oncology group study. *Gynec Oncol.* 101, 390-397

Sheng S, Carey J, Seftor EA (1996): Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 93, 11669-11674

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (1997): Antigen retrieval immunohistochemistry: Past, present, and future. *J Histochem Cytochem.* 45 (3), 327-343

Sood AK, Fletcher MS, Gruman LA, Coffin JE, Jabbari S, Khalkhali-Ellis Z, Arbour N, Seftor EA, Hendrix MJC (2002): The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 8, 2924-2932

Stauber M, Weyerstahl T (2005): *Gynäkologie und Geburtshilfe.* Thieme Verlag, Stuttgart, 2, 293-300

Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2010): *Gesundheit Todesursachen in Deutschland 2008, Fachserie 12 Reihe 4*

Terry KL, Titus-Ernstoff E, McKolanis JR, Welch WR, Finn OJ, Cramer DW (2007): Incessant ovulation, mucin 1 immunity, and risk for ovarian cancer. *Cancer Epidemiology, I Biomarkers and Prevention* 16, 30-35

Thomssen C; Meier W (2002): Rezidivchirurgie beim Ovarialkarzinom Indikationen und Möglichkeiten. *Der Onkologe* 8 (11), 1216-1221

Tropé C, Kaern J (1998): Management of borderline tumors of the ovary: state of the art. *Semin Oncol.* 25 (3), 372-380

Tsunehisa K, Shinji O, Yoshiaki K, Yoshihiro O, Hiroaki K, Toshio H, Hitoo N (2003): Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* 36, 9–17

Van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzangia G, Szczepanski T, Gabert J, Van Dongen JJM (2003): Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17, 1013-1034

www.figo.org

www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1687&Template=cellBiology

www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-26&Template=cellBiology

www.nobelpris.org/chemie/mullis.html

Xia W, Lau YK, Hu MC, Li L, Johnston DA, Sheng S, El-Naggar A, Hung MC (2000): High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 19 (20), 2398-2403

Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, Sager R (1994): Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 263, 526-529

7. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat für die mir gegebene Möglichkeit zur Promotion und Überlassung des Themas Dank aussprechen.

Herrn PD Dr. med. Felix Hilpert möchte ich für die Überlassung von Patientendaten und Durchsicht meiner Arbeit danken. Seine herzlichen Ratschläge und Verbesserungsvorschläge haben wesentlich zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen.

Großer Dank gilt Dr. med. Christian Schem für die Betreuung und wertvollen Anregungen während der gesamten Zeit.

Regina Grunewald, Sigrid Haman und Frank Rösel, die stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatten, möchte ich für die Einarbeitung und Hilfestellung im Labor danken.

Desweiteren danke ich Dr. med. Bernd Feyerabend für die Unterstützung bei dem histopathologischen Teil der Arbeit.

Herrn Jürgen Hedderich danke ich für die statistische Beratung.

Meiner Freundin Mareike möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung von Graphiken danken.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und meinem Partner, für den liebevollen Rückhalt.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Habermann, Marion
Geburtsdatum/-ort	07.04.1981/ Soltau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Inge/Heinrich Habermann

Bildungsweg

1987-1991	Grundschule, Hermannsburg
1991-1993	Orientierungsstufe, Hermannsburg
1993-1997	Realschule, Hermannsburg
1997-2000	Ausbildung zur Arzthelferin, Hermannsburg
2000-2001	Tätigkeit als Arzthelferin, Hermannsburg
2001-2002	Fachoberschule Sozialwesen, Hannover
2002-2003	Berufsoberschule Sozialwesen, Hannover

Studium

2003- 2005	Vorklinischer Abschnitt des Humanmedizin-Studiums an der Christian Albrechts Universität zu Kiel
08/2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005- 2009	Klinischer Abschnitt des Humanmedizin-Studiums an der Christian Albrechts Universität zu Kiel
11/ 2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2009	Approbation als Ärztin
04-12/2010	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe des Heidekreis Klinikums Walsrode
ab 01/2011	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Itzehoe

Praktisches Jahr

08/2008- 12/2008

Chirurgie: Regional Spital Prättigau,
Schiers Schweiz; Diakonissenkrankenhaus,
Flensburg

12/2008- 04/2009

Gynäkologie und Geburtshilfe: Klinik für
Gynäkologie und Geburtshilfe,
Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein, Campus Kiel

04/2009- 07/2009

Innere Medizin, Kreiskrankenhaus
Rendsburg

Veröffentlichungen

10/2008

Posteröffentlichung auf dem Kongress der
Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und
Geburtshilfe in Hamburg
“Maspin – a new prognostic marker for
ovarian cancer?”

07/2010

Anticancer Research, 30: 2739-44:
“Heterogeneous expression of serine
protease inhibitor maspin in ovarian cancer”

10/2010

Posteröffentlichung auf dem Kongress der
Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und
Geburtshilfe in München
“Das heterogene Expressionsverhalten des
Serin Protease Inhibitors Maspin beim
Ovarialkarzinom“