

Aus dem Institut für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE)
Martinistraße 52, D-20251 Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Löning

Nachweis der Expression von Komponenten des Plasminogen–Aktivator-Systems in Ovarialtumoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Eva Gödert

aus Metzingen

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der / die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: Zweit - Gutachter / in

Prüfungsausschuss: Dritt – Gutachter / in

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen.....	5
2. Einleitung.....	7
2.1. Das Plasminogen-Aktivatorsystem in Ovarialkarzinomen	7
2.2. Die perizelluläre Organisation des Urokinase-Plasminogen-Aktivatorsystems.....	7
2.3. Die Bedeutung des Plasminogen-Aktivatorsystems im Prozess des Tumorwachstums, der Metastasierung und in physiologischen Vorgängen.....	9
2.4. Epidemiologie und Behandlung des Ovarialkarzinoms.....	11
2.5. Histologische Einteilung der Ovarialtumoren.....	11
2.6. Prognostische Parameter für Patientinnen mit Ovarialkarzinom und die mögliche Rolle des Plasminogen-Aktivatorsystems	15
2.7. Zielstellung der Arbeit.....	16
3. Material und Methoden.....	17
3.1. Untersuchungsmaterial.....	17
1.1.1. Auswahl des Untersuchungsmaterials.....	17
3.2. RNA-RNA-in-situ-Hybridisierung.....	19
3.3. Chemikalien.....	20
1.1.2. In vitro-Transkription zur Herstellung der Ribosonden:.....	22
1.1.3. Anfertigung der Paraffinschnitte.....	25
1.1.4. Methodik der RNA-RNA-in - situ-Hybridisierung.....	26
1.1.5. RNA-RNA- in - situ -Hybridisierung.....	28
1.1.6. Semiquantitative Mikroskopie und Auswertung.....	34
1.1.7. Statistische Auswertung.....	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Karzinome.....	36
4.2. Benigne Tumoren.....	42
5. Diskussion.....	51
5.1. PAI-1 spezifische Signale in Karzinomen und benignen Tumoren.....	52
5.2. Expression von uPA.....	53
5.3. uPA-Rezeptor-Signale.....	55
5.4. Hormonelle Beeinflussung der Expression von Komponenten des Plasminogen- Aktivatorsystems.....	56
5.5. Hilus- und Sertolizellen und das Plasminogen-Aktivatorsystem.....	58
5.6. Kritische Betrachtung der in situ Hybridisierung.....	58

5.7. Die Bedeutung des Plasminogen-Aktivatorsystems für physiologische und tumorbiologische Prozesse.....	59
5.8. Die vielschichtige Rolle der Stromazellen.....	60
5.9. Epitheliale mesenchymale Transition.....	61
5.10. Unterschiedliche Lokalisation von Signalen. Ergebnisse bei verschiedenen Tumoren mittels unterschiedlicher Untersuchungsmethoden.....	63
5.11. Schlussfolgerung.....	64
5.12. Vorschläge zur Optimierung der Untersuchung.....	65
6. Zusammenfassung:.....	66
7. Bibliografie.....	68
8. Danksagung.....	81
9. Erklärung.....	82
10. Lebenslauf.....	83

1. Abkürzungen

bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cpm	counts per minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
Eco	Escherichia coli
ECM	Extracelluläre Matrix
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
EGF	epithelial growth factor
EtOH	Ethanol-Hydroxid
FIGO	Federation internationale gynecologique et obstetrique
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
hCG	humanes Choriogonadotropin
HGF	Hepatocyte growth factor
Hind	Hämophilus influenzae
KGF	Keratinocyte growth factor
LOH	Loss of heterozygosity
MMP	Matrix Metalloprotease
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1
PBS	Phosphate buffered Saline
PCOS	Syndrom der polyzystischen Ovarien (Stein-Leventhal-Syndrom)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHM	Posthybridisierungsmix
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PVP	Polyvinylpyrrolidone
rNTPs	ribo-Nukleotidphosphate: ATP (Adenosin-), CTP (Cytosin-), GTP (Guanin-) und UTP (Uridin-) Triphosphat
SF	Surface factor
SSC	standard saline citrate
TEA	Triethanol amin

TES	Gemisch aus Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) und EDTA
TGF- β	Transforming growth factor
tPA	tissue-type plasminogen activator
uPA	urokinase plasminogen activator
uPAR	urokinase plasminogen activator Rezeptor
γ -tRNA	Hefe tRNA

2. Einleitung

2.1. Das Plasminogen-Aktivatorsystem in Ovarialkarzinomen

Schon lange gab es Beweise dafür, dass **fibrinolytische Enzyme** am Tumorwachstum beteiligt sind. Bereits in den Jahren 1915, 1935 und 1946 wurde veröffentlicht, dass Kulturen bösartiger Tumoren verklumpte Plasmasubstrate lysieren (Fleisher et al.; Santesson; Fischer). Nach und nach konnten Plasmin und seine Aktivatoren und Inhibitoren in verschiedenen Tumoren identifiziert und in Gewebekulturen produziert werden.

Über das Vorkommen von **fibrinolytischer Aktivität in menschlichen Ovarialkarzinomen** und der begleitenden Aszitesflüssigkeit berichtete Svanberg et al. 1975 (a und b) zum ersten Mal. Dieselbe Gruppe veröffentlichte 1976 eine Untersuchung zur Identität eines Plasminogenaktivators. Es wurde dabei die Freisetzung des Moleküls sowohl durch kultivierte Ovarialkarzinom- als auch durch gesunde fetale Nierenzellen beschrieben. Ebenso konnte der Plasminogenaktivator im Urin nachgewiesen werden, daher der Name Urokinase. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse der Arbeitsgruppe wurde postuliert, dass es sich bei dem von den Karzinomzellen produzierten Plasminogenaktivator um ein der Urokinase ähnliches, wenn nicht gar das identische Molekül handelt (Astedt et al. 1976).

In den letzten Jahren wurden für das Ovarialkarzinom die **Hauptagonisten dieses Systems** – Plasmin, Urokinase-Plasminogen-Aktivator, seine Inhibitoren PAI-1 und 2 und sein Rezeptor uPAR - in Gewebesuspensionen, Aszitesflüssigkeit, Patientinnen - und Tumorblut weiter untersucht (Pedersen et al. 1993; Casslén et al. 1994; Chambers-S. et al. 1995; Sier et al. 1998) und auch ihre zellulären Produktionsorte durch Detektion der mRNA nachgewiesen (Schmalfeldt et al. 2001; Borgfeldt et al. 2001).

2.2. Die perizelluläre Organisation des Urokinase-Plasminogen-Aktivatorsystems

Die Rolle, die die Serinproteasen Plasmin und uPA, der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) sowie der uPA-Rezeptor für das Tumorwachstum spielen, ist sehr komplex.

Im Folgenden möchte ich die wesentlichen Interaktionen der Systemkomponenten kurz darstellen. Für ein detaillierteres Verständnis sei auf den Reviewartikel von Andreasen et al. von 1997 verwiesen.

Die von den entsprechenden Zellen produzierte inaktive uPA-Vorstufe wird nach ihrer Bindung an den uPA-Rezeptor (ein durch Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol in der Zellmembran verankertes Molekül) zur aktiven Form verändert. Schon der Komplex zwischen Pro-uPA und uPAR kann eine Vielzahl von Mechanismen initiieren, wobei vor allem Interaktionen mit Integrinen, die Bindung zwischen uPAR und Vitronectin (als Bestandteil der extrazellulären Matrix, die im Folgenden als ECM bezeichnet wird) und eine intrazelluläre Signaltransduktion, die über eine Tyrosinphosphorylierung u.a. zu einer gesteigerten Expression von Wachstumsfaktoren führen kann, zu erwähnen sind.

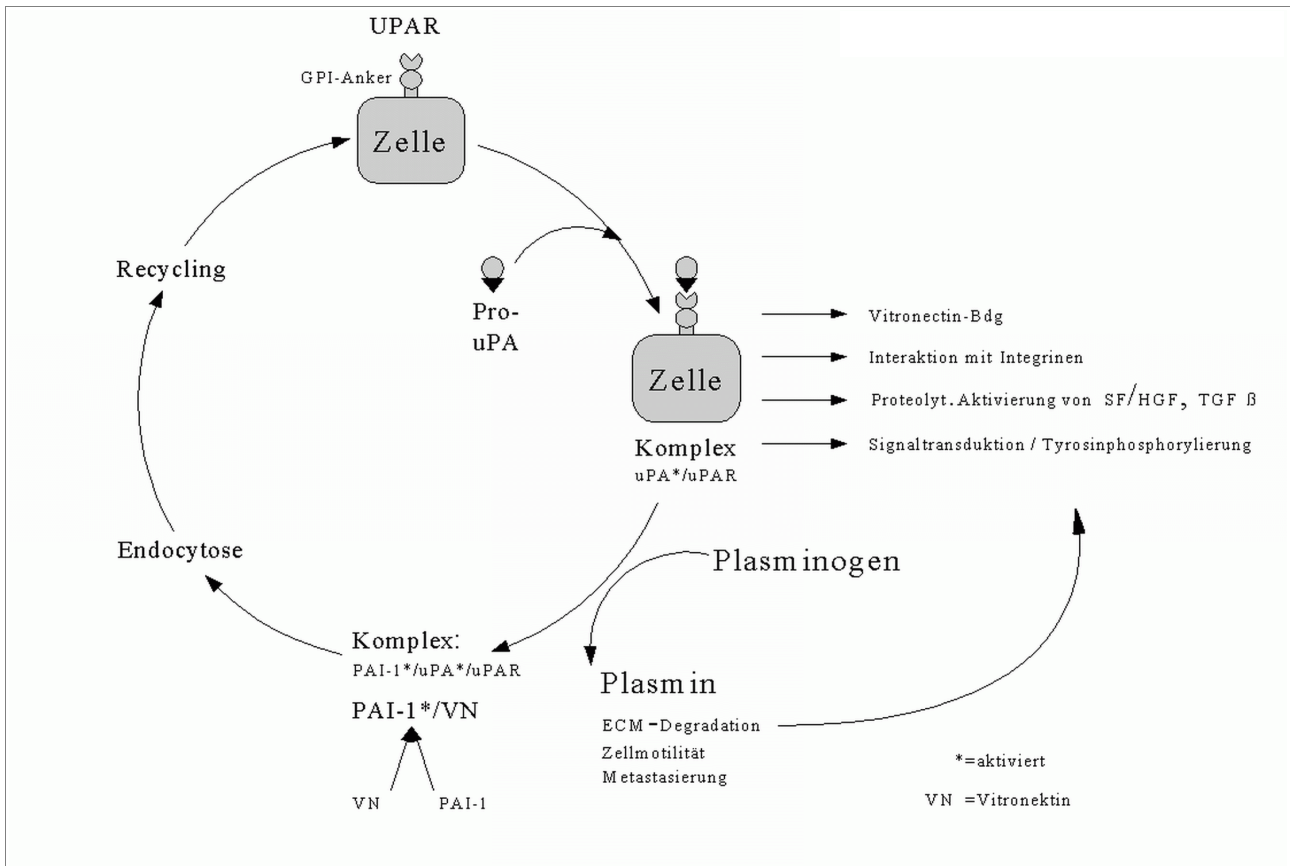
Der nun aktivierte uPA aktiviert seinerseits die inaktive Vorstufe Plasminogen zu Plasmin. Dies führt erstens zu einer Degradation der ECM (mit ihren Komponenten Vitronectin, Fibronectin und Fibrin), was sowohl zum Tumorwachstum beiträgt als auch die Fähigkeit des Tumors zur Metastasierung fördert. Zweitens setzen auch die mit der ECM-Degradation verbundenen Veränderungen der Zelladhäsion die bereits oben erwähnte Signalkaskade in Gang.

Außerdem kommt es zu einer proteolytischen Aktivierung von beispielsweise HGF (Hepatocyte Growth Factor) und TGF- β (Transforming Growth Factor- β), die nun wiederum die Expression von uPA und uPAR in der Zelle regulieren und deren Motilität beeinflussen.

PAI-1 bindet in an Vitronectin gebundener und damit aktiver Form an den uPA / uPAR-Komplex, was im weiteren Verlauf zur Endozytose des Gesamtkomplexes und schließlich zu seiner Degradation führt. Intrazellulär findet dann eine Art „Recycling“ der Komponenten statt, und uPAR wird wieder auf der Zelloberfläche bereitgestellt. Dies geschieht durch die Beteiligung von PAI-1 schneller als die Endozytose des reinen uPA-/ uPAR-Komplexes und zeigt die Bedeutung von PAI-1 für die rasche Bereitstellung der beteiligten Moleküle.

Abb. 1.:

Schematische Darstellung der dynamischen perizellulären Organisation des uPA – Systems



Modifiziert nach : Andreasen et al. 1997

2.3. Die Bedeutung des Plasminogen-Aktivatorsystems im Prozess des Tumorwachstums, der Metastasierung und in physiologischen Vorgängen

Die Relevanz des Plasminogenaktivatorsystems für das Tumorwachstum ist in vielen Studien belegt. Es führt zur Degradation der ECM (Andreasen et al. 1990), welche einerseits für die lokale Tumorausbreitung von zentraler Bedeutung ist, andererseits aber auch die Migration von Tumorzellen als Voraussetzung für die Metastasierung ermöglicht. Hierfür müssen die Krebszellen sich von ihrem Ursprungsort lösen und das umgebende Gewebe invadieren. Dies erfordert zunächst eine Bindung an und die darauf folgende Degradation der ECM. Darauf folgen das Eindringen der Krebszellen in Blut- und Lymphgefäße, der Transport zum Metastasierungsort und schließlich eine weitere Adhäsion und Durchdringung der dortigen Gefäßendothelien zur Besiedlung des entsprechenden Gewebes (Duffy et al. 1999).

Nicht nur die ECM-Degradation, sondern auch die Wiederherstellung der vorher aufgelösten Gewebsstrukturen sind in Tumoren von größter Bedeutung: z.B. für die Neoangiogenese (Liotta et al. 1991; Harris et al. 1995; Folkman et al. 1995), die Stimulierung der Fibroblastenproliferation und die Deponierung von neugebildeter ECM um Tumorzellinseln (siehe Reviews von Nagy et al. 1988; Dvorak et al. 1995).

Wichtig ist festzuhalten, dass all diese Prozesse kontrolliert auch in physiologischen Prozessen ablaufen.

„Kontrolliert“ heißt hierbei, dass die zur Signaltransduktion notwendigen Tyrosinkinaserzeptoren nur bedarfsgerecht bereitgestellt werden bzw. die Tyrosinkinaseaktivität zeitlich und örtlich begrenzt ist (Hay et al. 1995). Die dabei involvierten Liganden – verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. epithelialer (EGF), Hepatozyten- (HGF) oder Transforming (TGF)- Wachstumsfaktor – können durch die proteolytische Aktivität der Komponenten des Plasminogenaktivator-Stoffwechsels beeinflusst werden. Die aktivierten Wachstumsfaktoren können nun ihrerseits die Expression von uPA, PAI-1/2 und uPA-Rezeptor stimulieren und damit zur Deregulation der Tyrosinkinaseaktivität beitragen (Birchmeier et al. 1996, Andreasen et al. 1997).

Die Mitwirkung der einzelnen Komponenten in physiologischen Vorgängen ist bzgl. der Wundheilung (Pepper et al. 1991), der Implantation befruchteter Eizellen in das Endometrium und der Embryonalentwicklung (Sappino et al. 1989), des Gerinnungssystems (hier v.a. vermittelt über tPA) oder der Migration von Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Leukozyten) erforscht. Einer der wesentlichen Unterschiede zwischen Krebs- und normalen Zellen bzgl. der von ihnen ausgeübten Funktionen dürfte also in der fehlenden Regulation der Wachstums- und Migrationsvorgänge bestehen. Dies führt im Fall der Krebszellen dazu, dass Wachstum und Migration ungehemmt ablaufen und für den Organismus tödlich enden können (siehe Reviewartikel von Werb et al. 1990; Liotta et al. 1991; van Roy et al. 1992).

2.4. Epidemiologie und Behandlung des Ovarialkarzinoms

Immer noch ist das Ovarialkarzinom mit ca 15 Neuerkrankungen auf 100 000 Frauen pro Jahr eine der Hauptursachen des Krebstodes bei Frauen und steht damit an erster Stelle der tödlich verlaufenden gynäkologischen Krebserkrankungen. Vor allem deshalb, weil die Erkrankung erst dann symptomatisch wird, wenn eine z.B intraperitoneale Metastasierung stattgefunden hat, werden die meisten Fälle - ca 70 % - erst in den fortgeschrittenen Stadien FIGO III und IV - diagnostiziert und sind damit kaum kurativ behandelbar (Kuhn et al. 1994, 1999).

Die Behandlungsstrategie der Wahl besteht nach wie vor aus einer radikalen Operation mit dem Ziel der vollständigen Tumorentfernung. Hierfür wird nach einer Staging-Laparatomie mit gründlicher makroskopischer Inspektion der Unterseite des Zwerchfells, der parakolischen Rinnen und des Omentums eine abdominelle Hysterektomie mit beidseitiger Salpingo-Oophorektomie und Omentektomie durchgeführt. Wichtig sind auch mehrere Entnahmen von Peritoneallavage-Proben und Lymphknoten, um aus deren zytologischem Ergebnis Informationen über die evtl. bereits erfolgte intraperitoneale Streuung bzw. potentielle lymphogene Metastasierung des Ovarialkarzinoms zu gewinnen. Anschließend erfolgt als sog. „first-line“ Therapie eine Platin – (und/oder Taxan-) haltige Chemotherapie (Gibbs et al. 2001, Dizon et al. 2003). Der verbleibende Tumorrest ist einer der entscheidenden Faktoren für Prognose und weitere Therapieplanung für die Tumorpatientinnen (Kuhn et al. 1999).

2.5. Histologische Einteilung der Ovarialtumoren

Innerhalb der Ovarialtumoren gibt es verschiedene histologische Subgruppen. Die Einteilung nach der WHO-Klassifikation erfolgt nach dem Ursprung der abnorm proliferierenden Zellen in epithelial-stromale Oberflächentumoren, die die serösen, muzinösen, endometrioiden, Klarzell-, Übergangszell - (Brenner- und Nicht-Brennertumoren), squamösen, epithelialen Mischtypen und undifferenzierten Tumoren umfassen. Davon werden u.a. die Keimstrang-stromalen Tumoren abgegrenzt, worunter man die Granulosazelltumoren, die Thekome / Fibrome, Sertolizelltumoren, usw. zusammenfasst. Als weitere Untergruppe sind noch die Keimzelltumoren zu nennen. In allen drei großen Gruppen werden darüber hinaus benigne, grenzwertig maligne (Borderline- oder „low malignant potential“-Tumoren; im Folgenden LMP genannt) und maligne Varianten unterschieden. Die Gruppe der LMP- Tumoren umfasst Tumoren mit unbestimmter Dignität, die gegenwärtig

nicht weiter differenziert werden können. Innerhalb dieser LMP- Tumoren werden deshalb benigne und maligne Spezies postuliert. Die Borderline-Tumoren haben in der Regel eine sehr gute Prognose (Seidman et al. 2000).

Bisher ist nicht eindeutig geklärt, welcher Anteil der epithelialen Tumoren de novo aus dem Oberflächenepithel der Ovarien oder ihrer Inklusionszysten entsteht bzw. welche Tumoren sich aus vorbestehenden benignen epithelialen Tumoren oder nicht-neoplastischen Läsionen, wie z.B. endometrioiden Herden, entwickeln (Bell et al. 1994).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Ovarialtumoren

1. Epithelial-stromale Oberflächentumoren

1.1. Seröse Tumoren

1.1.1. Benigne

Zystadenom und papilläres Zystadenom

Oberflächenpapillom

Adenofibrom und Zystadenofibrom

1.1.2. Borderline-Tumore (LMP)

Zystische Tumoren und papilläre zystische Tumoren

Oberflächliche papilläre Tumoren

Adenofibrom und Zystadenofibrom

1.1.3. Maligne

Adenokarzinom, Variante: seröses Psammokarzinom

Papilläres Oberflächenadenokarzinom

Adenokarzinofibrom

1.2. Muzinöse Tumoren

1.2.1. Benigne

Zystadenom

Adenofibrom und Zystadenofibrom

1.2.2. Borderline-Tumoren (LMP)

Zystische Tumoren

Adenofibrom und Zystadenofibrom

1.2.3. Maligne muzinöse Tumoren

Adenokarzinom

Adenokarzinofibrom

Muzinös-zystischer Tumor mit Pseudomyxoma peritonei / malignen Wandknoten

1.3. *Endometroide Tumoren*

1.3.1. **Benigne**

Zystadenom

Zystadenom mit plattenepithelialer Differenzierung

Adenofibrom und Zystadenofibrom

Adenofibrom und Zystadenofibrom mit plattenepithelialer Differenzierung

1.3.2. **Borderline-Tumoren (LMP)**

Zystischer Tumor

Zystischer Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung

Adenofibrom und Zystadenofibrom

Adenofibrom und Zystadenofibrom mit plattenepithelialer Differenzierung

1.3.3. **Maligne**

Adenokarzinom mit Varianten: **A:**Plattenepitheliale Differenzierung; **B:**Flimmerzellvariante, **C:** Oxyphile Variante, **D:** Sekretorische Variante

Adenokarzinofibrom

Adenosarkom

Maligner Müllerscher Misch tumor

Stromasarkom (low grade)

Undifferenziertes ovarielles Sarkom

1.4. *Klarzelltumoren*

1.4.1. **Benigne**

Zystadenom

Adenofibrom und Zystadenofibrom

1.4.2. **Borderline-Tumoren(LMP)**

Zystischer Tumor

Adenofibrom und Zystadenofibrom

1.4.3. **Maligne Klarzelltumoren**

Adenokarzinom

Adenokarzinofibrom

1.5. *Übergangszell-Tumoren*

Brennertumoren

Borderline Brenner Tumor (Proliferierender Brennertumor)

Maligner Brennertumor

Übergangszellkarzinom (Nicht-Brenner)

1.6. *Plattenepitheltumoren*

1.7. *Gemischte epitheliale Tumoren*

Benigne

Borderline-Tumoren

Maligne

2. Keimstrang-Stroma Tumoren

2.1. Granulosa / Stroma Tumoren

2.1.1. Granulosazelltumoren bei

Erwachsenen

Jugendlichen

2.1.2. Tumoren der Thekom-Fibrom-Gruppe

Typisches Thekom / Luteinisiertes Thekom

Fibrom

Zelluläres Fibrom

Fibrosarkom

Stromatumor mit kleineren Keimstrangelementen

Sklerosierender Stromatumor

Stromales Luteom (s. 2.6.1.)

Unklassifizierte Tumoren

Andere

2.2. Sertoli / stromale Tumoren; Androblastome

2.2.1. Gut differenziert

Sertolizelltumor (Tubuläres Androblastom)

Sertoli-Leydigzelltumor

Leydigzelltumor (s. 2.6.)

2.2.2. Sertoli-Leydigzelltumor mittlerer Differenzierung mit heterologen Elementen (m.h.E.)

2.2.3. Sertoli-Leydigzelltumor schlechter Differenzierung (Sarkomatoid) m.h.E.

2.2.4. Retiform m.h.E.

2.3. Keimstrangtumor mit ringförmigen Tubuli

2.4. Gynandroblastome

2.5. Unklassifizierte Tumoren

2.6. Steroidzell-Tumoren

Stromales Luteom

Leydigzell-Tumor

Hiluszelltumor

Leydigzell-Tumor, nicht-hilärer Typ

Unklassifizierte Tumoren (nicht anderweitig spezifiziert)

3. Keimzelltumoren

3.1. Dysgerminome

Verschiedene D. mit syncytiotrophoblastischen Zellen

3.2. Dottersacktumoren (Endodermaler Sinustumor) mit verschiedenen Varianten

3.3. Embryonales Karzinom

3.4. Polyembryom

3.5. Choriokarzinom

- 3.6. *Teratome*
 Unreife
 Reife (Solid/ Zystisch/ mit Sekundärtumor/ Fetiform)
 Monodermale (Struma ovarii/ Karzinoidtumor/ Strumaler Karzinoidtumor/ Muzinöser
 Karzinoidtumor/ Neuroektodermaler Tumor/ Talgdrüsentumor/ Andere)
- 3.7. *Gemischte Keimzelltumoren*
4. **Sonstige seltene maligne Tumoren**

2.6. Prognostische Parameter für Patientinnen mit Ovarialkarzinom und die mögliche Rolle des Plasminogen-Aktivatorsystems

In den letzten Jahren wurden eine Reihe tumorbiologischer Faktoren auf mögliche prognostische Aussagekraft untersucht. Hierbei waren u.a. Östrogen-, Progesteron- und epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptoren, DNA-Ploidie, S-Phase und verschiedene Onkogene von Interesse (Friedlaender et al. 1989; Berchuck et al. 1991; Tyson et al. 1991; Lage et al. 1992). Kuhn et al. (1999) untersuchten u.a. den Einfluss von Patientinnenalter, Tumorrestmasse, Differenzierungsgrad, Lymphknotenstatus und Aszitesvolumen auf eine mögliche statistische Relevanz für die Prognose von Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorstadium (FIGO III c). Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass nur Tumorrest, Differenzierungsgrad, Lymphknoten-Status und Aszitesvolumen eine prognostische Aussagekraft für die Betroffenen haben. Dennoch erleiden ca 70 % der Patientinnen ohne verbliebenen Tumorrest ein Rezidiv und versterben (Kuhn et al. 1999). Deshalb ist auch im prognostisch günstigen Tumorrest-negativen Patientinnenkollektiv eine weitere Risiko-Unterscheidung, vor allem in Hinblick auf die weitere Therapieplanung und –optimierung, notwendig..

In den letzten Jahren wurde das Plasminogen-Aktivatorsystem näher bzgl. seiner Bedeutung für das Tumorwachstum und die Metastasierung in mehreren Tumorentitäten untersucht (Duffy et al. 1999). Jänicke et al. (1993) waren die ersten, die nachweisen konnten, dass uPA und sein Inhibitor PAI-1 für Brustkrebspatientinnen mit negativem Lymphknotenstatus starke, unabhängige prognostische Faktoren sind.

Lengyel, Schmalfeldt et al. (2001) konnten zeigen, dass die Expression der Matrix-Metalloproteasen (MMP) prognostische Aussagen über das Überleben von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom zulässt.

In der bereits erwähnten Studie von Kuhn et al. (1999) wurde vor allem die prognostische Relevanz von Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom betont, die schon in früheren Untersuchungen festgestellt worden war (Kuhn et al. 1994;

Schmalfeldt et al. 1995; Van der Burg et al. 1996; Chambers-S. et al. 1998) und mittlerweile auch in neueren Studien belegt ist (Konecny et al. 2001, Schouly et al. 2004). Schmalfeldt et al. (2001) fanden des Weiteren heraus, dass mit der Progression von gut- zu bösartigen Ovarialtumoren eine gesteigerte Expression von MMP und uPA einhergeht. Nach wie vor wäre jedoch von Interesse, inwiefern sich das Plasminogenaktivatorsystem als prognostischer Marker für Ovarialkarzinome in den niedrigeren Stadien FIGO I und II bzw. für Borderline - Tumoren eignet.

2.7. Zielstellung der Arbeit

Folgenden Fragestellungen wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen :

1.) Lässt sich mit Hilfe der RNA-RNA-in-situ Hybridisierung uPA-, PAI-1- und uPAR -mRNA in gut- und bösartigen Tumoren des Ovars nachweisen? Wird die mRNA bevorzugt in einer der beiden Tumorentitäten exprimiert? Auch im Hinblick auf Tumoren niedrig malignen Potentials (LMP- oder sog. „Borderline“- Tumoren) war dies für uns von Interesse, da sich aus der Darstellung unterschiedlicher mRNA-Syntheseorte und -intensitäten eine verbesserte Diskriminierung von LMP-Tumoren und benignen Tumoren ableiten lassen könnte. Gerade bei morphologischen Unklarheiten könnte die RNA-RNA-in-situ-Hybridisierung damit zur Diagnosestellung und Prognoseklärung beitragen.

2.) Gibt es Unterschiede in der Signalstärke und den Verteilungsmustern für einen bestimmten Zelltyp wie z.B. Stroma- oder Tumorzellen ? Lässt sich aus den gewonnenen Ergebnissen die Rolle der Stromazellen im Hinblick auf das Tumorwachstum weiterverfolgen und ihre Beteiligung am Wachstumsprozess nachvollziehen?

3.) Unterscheiden sich verschiedene histologische Subtypen neben ihrer Morphologie auch durch ihr uPA-, PAI-1 und uPAR-Expressionsverhalten voneinander? Lassen sich hierbei mögliche Rückschlüsse auf ihr biologisches Verhalten ableiten?

4.) Lässt sich innerhalb der Gruppe der Karzinome ein Zusammenhang zwischen der Signalintensität und -verteilung und zunehmender Entdifferenzierung der Tumoren nachweisen , wie er z.B. von Schmalfeldt et al. (2001) beschrieben wurde? Spielt auch das FIGO-Stadium eine Rolle bezüglich der untersuchten Parameter?

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

1.1.1. Auswahl des Untersuchungsmaterials

Die untersuchten Ovarialtumoren entstammen dem Archiv des Instituts für Gynäkopathologie und wurden in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf operativ entfernt. Nach ihrer Entnahme im Rahmen der OP wurden sie in mit 3,5 % igem Phosphat gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Sie stammen aus den Jahren 1994 bis 2000 (bösartige Primärtumoren des Ovars, bzw. einzelne Metastasen) und 1993 bis 1996 (Ovarial-Adenome). Die Einteilung der Gewebe erfolgte nach der WHO- und UICC- Klassifikation.

Die weitere Beschreibung der Karzinome erfolgte anhand der Rücksprache nach Staging-Operation und der histopathologischen Differenzierungsgrade I-III.

Die beiden Metastasen wurden dem Stadium FIGO III und dem Differenzierungsgrad G III zugeordnet.

Es wurden Ovarialtumoren verschiedener Typen (Oberflächen-epithelial/ -stromal oder Keimstrang /-stromal), Lokalisation und Differenzierungsgrade für die geplanten Untersuchungen zusammengestellt.

Es wurden 45 Karzinome untersucht; darunter 25 seröse (Adeno-, Zystadenokarzinome und zwei solid-anaplastische Tumoren), 9 muzinöse (hauptsächlich Zystadenokarzinome, zwei mit intestinaler Differenzierung und ein undifferenziertes, nur fokal muzinöses), vier endometroide, zwei Mischtypen (nicht eindeutig der serösen oder muzinösen Gruppe zuzuordnen), ein Klarzelltumor, zwei Metastasen (eine davon Metastase eines Mamma-Karzinoms, die andere ungeklärter Herkunft) und zwei Krukenbergtumoren. In der Gruppe der serösen Karzinome befanden sich 17 schlecht und 7 mittelgradig differenzierte Tumoren sowie ein gut differenzierter Fall.

In der Gruppe der muzinösen Tumoren wurden zwei G III- und 7 G I- Tumoren untersucht. Die Gruppe der vier endometroiden Tumoren bestand aus je zwei G III und G II-Tumoren. Bei den beiden Mischtypen war einer mittelmäßig und einer gut differenziert. Der klarzellige Tumor war entdifferenziert, die beiden Metastasen ebenfalls, und unter den beiden Krukenberg-Tumoren befanden sich je ein mittelmäßig und ein gut differenziertes Karzinom.

Von den insgesamt untersuchten 25 Adenomen waren 18 von serösem Typ, darunter 6 Zystadenofibrome, 11 Zystadenome und 1 Adenofibrom; 2 waren muzinös (beides Zystadenome), und 5 Adenome waren den Fibromen zuzuordnen.

Außerdem wurden auch ein lediglich zystisch verändertes Ovarialpräparat und ein tumorfreies Ovarialpräparat untersucht, wobei erwähnt werden muss (auch im Hinblick auf die später zu diskutierenden Ergebnisse), dass letzteres nur in der vorliegenden Schnittebene tumorfrei war. Das vorliegende Präparat stammt aus einem Ovar mit beschriebenem muzinösen gut differenzierten Ovarialkarzinom.

Tabelle 2: Histologische Typen und Einteilungskriterien der untersuchten Fälle

Untersuchte Fälle		Karzinome	Untersuchte Fälle		Adenome
Anzahl		45	Anzahl		25
Durchschnittsalter		56	Durchschnittsalter		56
Stadium					
FIGO I		20			
FIGO II		3			
FIGO III		22			
Histologie			Histologie		
Serös		25	Serös		18
Muzinös		9	Muzinös		2
Endometrioid		4	Fibrome		5
Mischtypen		2			
Krukenbergtumoren		2			
Klarzelltumor		1			
Ovarial- Metastasen		2			
Differenzierung					
GI		9			
GII		11			
GIII		25			
Nodaler Status					
NO		18			
N I		9			
N X		18			

Tabelle 3: Anzahl der untersuchten Ovarialkarzinomtypen mit Altersdurchschnittsangabe

Diagnose	Anzahl „n“	Altersdurchschnitt
Karzinome		
Serös	25	61
Muzinös	9	55
Endometroid	4	60
Krukenberg	2	38
Mischtyp	2	58
Klarzelltumor	1	61
Metastasen	2	61
Adenome		
Serös	18	60
Muzinös	2	45
Fibrome	5	63
Vergleichsgewebe		
Normales Ovarialgewebe	1	82
Ovarialzyste	1	50

3.2. RNA-RNA-in-situ-Hybridisierung

Diese aufwändige, aber auch sehr aussagekräftige Methode erlaubt, spezifische mRNA anhand der Hybridisierung komplementärer Ribosonden über einzelnen Zellen eines Schnittpräparats nachzuweisen. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit radioaktiv markierte einzelsträngige Ribosonden verwendet. Mittlerweile wird in der Routinearbeit jedoch zunehmend mit nicht-radioaktiver Markierung gearbeitet.

Ein Vorteil der in-situ-Hybridisierung im Vergleich zu immunhistochemischen Nachweismethoden liegt darin, dass damit Aussagen über den primären Synthesort der gesuchten Proteine anhand der

Detektion der spezifischen mRNA getroffen werden können. Die Immunhistochemie erlaubt hingegen „nur“ Rückschlüsse auf die Lokalisation des gesuchten Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt (nach Entnahme, Aufarbeitung und Färbung des entsprechenden Gewebes).

3.3. Chemikalien

Albumin, bovin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
DEPC	Serva (Heidelberg)
Dextransulfat-Natriumsalz	Fluka (Deisenhofen)
DTT	Sigma (Deisenhofen)
Ficoll	Sigma (Deisenhofen)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Hefe-t-RNA	Roche (Mannheim)
Phenol	Life technologies-Gibco BRL (Karlsruhe)
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Merck (Darmstadt)
Triethanolamin	Merck (Darmstadt)

Alle Standardchemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

Puffer und Lösungen

1 x PBS pH: 7,2

- ◆ 3 mM NaHPO₄
- ◆ 7 mM Na₂HPO₄
- ◆ 130 mM NaCl

20 x SSC pH: 7,0

- ◆ 3 M NaCl
- ◆ 300 mM Na-Citrat

100 x Denhardt's Lösung

- ◆ 0,2 g Ficoll 400
- ◆ 0,2 g PVP
- ◆ 0,2 g BSA Fraktion V

wurden jeweils in DEPC-H₂O ad 10 ml gelöst und in 1 ml-Eppendorfröhrchen bei -20° C gelagert.

DEPC-A. bidest. / DEPC-Lösungen

0,1 % DEPC in A. bidest. über Nacht bei 37° C inkubieren; anschließend autoklavieren.

0,1 % DEPC in den entsprechenden Lösungen über Nacht bei 37° C inkubieren; anschließend ebenfalls autoklavieren.

Enzyme

DNase I, RNase-free from bovine pancreas, 10 U/μl	Roche (Mannheim)
Pronase E	Merck (Darmstadt)
RNase A	Roche (Mannheim)
RNasin Inhibitor, 40 U/μl	Promega (USA)
T 3 RNA-Polymerase, 20 U/μl	Roche (Mannheim)
T 7 RNA-Polymerase, 20 U/μl	s.o.

Aktivität

Uridine 5'-(alpha-Thio) Triphosphat 35-S	
Spezifische Aktivität: ca. 50 Tbq (1350 Ci / mmol)	
Konzentration: ca 460 Mbq (12,4 mCi) / ml	Du Pont NEN (Mechelen)

<u>Filmemulsion, Entwickler und Fixierlösung</u>	Kodak (F-Chalon s. Saone)
--	---------------------------

1.1.2. In vitro-Transkription zur Herstellung der Ribosonden:

Hierbei werden unter Einbau von [³⁵S]-UTP radioaktiv markierte einzelsträngige Ribosonden hergestellt. Es bilden sich je nach verwendeter Polymerase (SP 6 und T 7) zwei verschiedene Stränge aus - die sogenannte „Anti- Sense“- Sonde, die mit der nachzuweisenden mRNA der Zelle hybridisiert, und die „Sense“-Sonde, die mit der gesuchten mRNA identisch ist und damit als Negativkontrolle dient.

Nach Anlagerung an die entsprechende Ziel-mRNA des zu untersuchenden Gewebes (Hybridisierungsvorgang) werden die Hybride mittels einer Photoemulsion, die an entsprechender Stelle geschwärzt wird, detektiert.

Zur Herstellung der **PAI-1-Sonde** wurde ein aus 788 bp bestehendes PCR-Produkt als *EcoRI* / *Hind* III-Insert in den Vektor pGEM1 eingebracht. Dabei wurden für die „Antisense“-Sonde zur Linearisierung des Plasmides das Restriktionsenzym *EcoRI* (aus *Escherichia coli*) und die RNA-Polymerase SP 6 verwendet, für die „Sense“-Sonde die Endonuklease *Hind* III (aus *Hämophilus influenzae*) und die RNA-Polymerase T 7.

Die **uPA-Sonde** wurde aus einem in den Vektor pGEM-3Zf (-) eingebauten Plasmid transkribiert. Dieses 300 bp lange *EcoRI* / *Bam* HI-Fragment (aus pHUK8, bezogen über American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A; ATCC # 57328.) repräsentiert Sequenzen vom Exon III des humanen uPA-Gens. Hierbei muss erwähnt werden, dass zur Erzeugung dieser mRNA im Gegensatz zu den anderen beiden Sonden keine c-DNA verfügbar war, sondern die Sonde aus dem entsprechenden genomischen Klon hergestellt wurde. Die „Antisense“-Sonde wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und der RNA-Polymerase SP 6, die „Sense“-Sonde mit dem Restriktionsenzym *Hind* III und der RNA-Polymerase T 7 hergestellt. Die beiden Vektoren pGEM1 und pGEM-3Zf(-) wurden von Promega, Madison, WI, U.S.A bezogen.

Sowohl die PAI-1- als auch die uPA-Sequenz tragenden Plasmide wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Herbst aus Münster zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung der **uPAR-Sonde** wurde ein Fragment mit der Länge von 1113 bp (bezogen über die ATCC # 65768) in den Vektor pBluescript eingebracht. Zur Linearisierung der Plasmide für die „Antisense“-Sonde wurden das Restriktionsenzym *Xba* I und die RNA-Polymerase T 3 und für die „Sense“-Sonde das Restriktionsenzym *EcoRI* und die RNA-Polymerase T 7 verwendet.

Sämtliche RNA-Polymerasen -SP 6, T 3 und T 7- sowie die verwendeten rNTPs stammen von der Firma ROCHE, Mannheim., ebenso die Restriktionsenzyme *EcoRI*, *Hind* III , *Bam* HI und *Xba* I).

Im Folgenden möchte ich stichpunktartig die Herstellung der radioaktiven Sonde beschreiben:

In ein Eppendorfröhrchen pipettieren und kurz anzentrifugieren:

- ◆ 1 μ l „Template“ (linearisiertes Plasmid - ca. 1 μ g/ μ l DNA)
- ◆ 0,5 μ l DTT (100 mMolar)
- ◆ 1 μ l 10 x Transkriptionspuffer (wurde mit den Polymerasenfertig angeliefert)
- ◆ 1 μ l r NTPs (Adenin, Cytosin, Guanin/ jeweils 10 mM)
- ◆ 0,5 μ l RNAsin (40 000 U/ ml)
- ◆ 5 μ l [³⁵ S]-UTP (ca. 60 μ Ci)

Erst jetzt Zugabe von

- ◆ 1 μ l RNA- Polymerase (je nach „sense“-und „antisense“-Orientierung T 7 oder SP 6) ohne zu mischen
(wegen hoher Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Beanspruchung)

1 h bei 37° C inkubieren

- ◆ 0,5 μ l der entsprechenden RNA- Polymerase nochmals hinzufügen, nicht mischen

30 min bei 37° C inkubieren

Zugabe von:

- ◆ 5 µl Hefe-tRNA (50mg/ ml) als Co- Fälller
- ◆ 0,5 µl RNasin und
- ◆ 1 µl DNase (RNase –frei) hinzupipettieren, nicht mischen

10 min bei 37° C inkubieren

Zugabe von:

- ◆ 73 µl Aq. Bid.
- ◆ 10 µl Na- Acetat (3M, pH 6)
- ◆ 100 µl equilibriertes Phenol-Chloroformgemisch (je 50 µl)
vorsichtig gemischt

vorsichtig mischen

zentrifugieren, bis sich die Phasen trennen (ca. 2 min. bei 10 000 rpm)

- ◆ 160 µl EtOH 100 %ig vorlegen
- ◆ 80 µl der Oberphase dazugeben, vorsichtig mischen
über Nacht bei - 20 ° C (oder 30 min bei –80 ° C)
präzipitieren lassen,

30 min bei 4° C und 10 000 g zentrifugieren

Überstand quantitativ abpipettieren

- ◆ 500 µl EtOH 70 % ig auf das Pellet geben, Pellet darin lösen

5 min bei 4° C und 10 000g zentrifugieren

**Überstand quantitativ abpipettieren,
Pellet trocknen (ca. 15 min. bei Raumtemp.)**

- ◆ 30 µl DTT (10 mM) zugeben

kurz vorsichtig **mischen**

Zerlegung der entstandenen Einzelstrang-RNA in kleinere Fragmente mittels alkalischer Hydrolyse, (wenn die entstandene Sonde größer als 0,3 kbp ist) - zur besseren Gewebepenetration.

Berechnung der Hydrolysezeit:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{k L_0 L_f}$$

t = Hydrolysezeit [min]

L_0 = Anfangslänge des RNA- Transkriptes [kb]

L_f = Endlänge des RNA- Transkripts , hier gewünscht: 0,15 [kb]

k = 0,11 [kb⁻¹ min⁻¹]

Kontrollmessung der eingebauten Aktivität im Flüssigszintillations-Messgerät LS 6500 (Fa. Beckman Coulter)

1.1.3. Anfertigung der Paraffinschnitte

Von jedem Präparat wurden für die RNA-RNA-in-situ-Hybridisierung mit dem Mikrotom 4-5 µm dicke Schnitte hergestellt, jeweils drei pro Sonde. Zwei davon dienten der „Anti-Sense“-Hybridisierung, die die gesuchte mRNA im Präparat detektieren sollte, der dritte wurde für die Negativkontrolle- die Hybridisierung des Präparats mit der „Sense“-Sonde- benötigt. Die doppelte Ausfertigung der „Anti-Sense“-Schnitte diente zur Ermittlung der optimalen Expositionsdauer jeder einzelnen Hybridisierungsserie.

Die Schnitte wurden dann auf „Superfrost-plus“-Objektträger (Firma Menzel, Braunschweig) aufgebracht, die durch ihre Beschichtung mit geladenen Gruppen (vgl. die früher verwendeten mit

3-Amino-propyl-Triethoxy-Silan-beschichteten [APES] Objektträger) die Bindung des Schnittpräparats unterstützen. Somit wird eine mögliche Abwaschung von Zell- und Kernspreitungen während der in -situ-Hybridisierung verhindert.

1.1.4. Methodik der RNA-RNA-in - situ-Hybridisierung

Vorbehandlung der Präparate

Bei RNA-RNA-in -situ-Hybridisierungen müssen (wie bei allen Arbeiten, bei denen man RNA nachweisen möchte) besondere Vorkehrungen gegen RNAsen getroffen werden, das heisst, dass vor dem eigentlichen Hybridisierungsvorgang sorgfältig mit bei 250° C über Nacht „gebackenen“ Küvetten und anderen benötigten Geräten gearbeitet werden muss, um einer Verunreinigung und damit potentiellen Zerstörung der noch unhybridisierten gesuchten RNA durch RNAsen im Präparat vorzubeugen. Aus demselben Grund dürfen auch nur RNase freie Lösungen verwendet werden, d.h. sämtliche vor der Hybridisierung verwendeten Lösungen müssen mit Aqua bidest. angesetzt und danach autoklaviert werden, oder -falls nicht autoklavierbar-mit DEPC-H₂O versetzt und in „gebackene“ Flaschen gefüllt werden.

Die eigentliche Vorbehandlung der Präparate dient einerseits der Verhinderung unspezifischer Hybridisierung der Sonde mit anderen Sequenzen als der Zielsequenz. Andererseits sollen unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen und anderen Zellbestandteilen, die die Sonde binden könnten, verhindert werden. Außerdem wird das Eindringen der Sonde und des Nachweisreagenzes erleichtert, und die Zielsequenzen werden stabilisiert. Dies erklärt die vielen Einzelschritte und Verwendung verschiedener Substanzen, die in der folgenden Laborvorschrift für die Hybridisierung stichpunktartig erläutert werden.

Objektträger beschriften (Antisense I, II und Sense)

- ◆ Einsortieren der Präparatschnitte in Küvetten und über Nacht in Xylol bei RT unter dem Abzug stehen lassen
- ◆ Am nächsten Tag das Xylol in den Küvetten auswechseln (Entsorgung in besonders gekennzeichnetem Kanister) und die Schnitte für 20 min bei RT auf den Schüttler stellen (Schüttlerfrequenz ca. 100/ min).

Jetzt nacheinander auf die Schnitte geben:

absteigende Alkoholreihe (jeweils mit DEPC-Wasser verdünnt)

- ◆ 2 min 100 % Ethanol
- ◆ 2 min 90 % Eth.
- ◆ 2 min 70 % Eth.
- ◆ 2 min 30 % Eth.
- ◆ 10 min 1 x PBS bei RT (10 x PBS mit DEPC-Wasser verdünnen)
- ◆ 20 min 0,2 N HCL bei RT (*denaturiert basische Proteine → verhindert unspezifische Anlagerung der Nukleinsäuren*)
- ◆ 30 sec 1 x PBS bei RT
- ◆ 2 min 1 x PBS bei RT
- ◆ 10 min bei RT in 0,125 mg/ ml Pronase E
(entspr. 1000 µl Pronase auf 200 ml 1 x PBS)
(*zur so genannten Permeabilisierung ; befreit Nukleinsäuren vermutlich von assoziierten Proteinen und macht damit das Gewebe für Sonde und Nachweisreagenzien zugänglicher*)
- ◆ 30 sec 0,1 M Glycin / 1 x PBS (*stoppt Pronase E*)
- ◆ 30 sec 1 x PBS
- ◆ 30 sec 1 x PBS

- ◆ 20 min Nachfixierung mit 4 % igem Paraformaldehyd in 1 x PBS
(konserviert die Gewebestruktur und begrenzt den Verlust von zellulären Nukleinsäuren)
mit pH 7,5

Küvetten wieder auf Schüttler stellen (Frequenz 100 / min), nacheinander auf Schnitte geben:

- ◆ 3 min 1 x PBS
- ◆ 10 min 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 ; 0,25 % Essigsäureanhydrid zum Acetylieren;
Essigsäureanhydrid unmittelbar vorher dazu (verhindert Anlagerung an die Beschichtung der Objektträger und neutralisiert positiv geladene Moleküle. Verhindert damit unspezifische Anlagerung der Nukleinsäuren)
- ◆ 5 min 1 x PBS

Aufsteigende Alkoholreihe:

- ◆ 2 min 30 % Eth.
- ◆ 2 min 70 % Eth.
- ◆ 2 min 90 % Eth.
- ◆ 2 min 100% Eth.

Dann Schnitte 1-2 Std. trocknen lassen --> vermeidet unnötige Sondenverdünnung, dabei staubfrei abdecken.

1.1.5. RNA-RNA- in - situ -Hybridisierung

Vorbemerkung:

Die Hybridisierung erfordert präzises, zügiges und sicheres Arbeiten im Isotopenlabor.

Sie wird bei einer bestimmten Temperatur (50°C) durchgeführt und führt zur Ausbildung von RNA-RNA-Doppelsträngen zwischen markierter Sonden-RNA und vorhandener mRNA des Präparates.

Die Hybridisierungskammern werden mit Zellstoff ausgelegt und mit Formamid (Formamid : Aqua bidest. = 1:1) gut befeuchtet (nicht zu nass, es soll keine Flüssigkeit abkippbar sein).

Auf die Schnitte wird der Sondenmix aufgebracht, und zwar 27 μ l pro Schnitt. Sondenmix und Hybridisierungsmix werden im Verhältnis 1:5 auf die Schnitte getropft.

Hybridisierungsmix: (Bsp für 1 ml Lösung)

- ◆ 500 μ l Formamid
- ◆ 125 μ l 10 x Salze
- ◆ 100 μ l 0,1 M DTT
- ◆ 25 μ l Hefe-tRNA
- ◆ 250 μ l 50 % Dex-SO 4

30 sek. vorsichtig mischen und bei RT lagern

Transkript

Jeder Schnitt soll mit 200 000 cpm markierter Sonde inkubiert werden. Hieraus errechnet sich dann die benötigte Transkriptmenge pro Schnitt :

Antisense: $\frac{200\,000 \times \text{zu hybr. F\u00e4lle} (x \ 2 + 2)}{\text{gemessene cpm der Sonde}}$

Sense: $\frac{200\,000 \times \text{F\u00e4lle} (+2)}{\text{gem. cpm der Sonde}}$

Sondenmix

- ◆ 50 % Formamid
- ◆ 10 % DTT 0,1 M
- ◆ zzgl. Transkript nach Berechnung (s.o.)

Nun wird auf die errechnete Sondenmixmenge (1/ 5 der aufzubringenden Flüssigkeit) mit DEPC-Wasser aufgefüllt.

Dann wird die zugehörige Menge Hybridisierungsmix (4 / 5 der aufzubringenden Flüssigkeit) dazugegeben und 27 µl dieser Gesamtmischung auf jeden Objektträger luftblasenfrei aufpipettiert. Danach werden die Schnitte mit Parafilm unter Zuhilfenahme einer Pinzette abgedeckt.

Die Hybridisierungskammern werden verschlossen, gestapelt und - in flüssigkeitsdichte Hüllen verpackt - in den Hybridisierungswärmeschrank gestellt.

Über Nacht findet nun der Hybridisierungsvorgang bei 50° C (mit dem Präzisionsthermometer gemessen) statt.

Waschen

Das Waschen dient der möglichst vollständigen Entfernung unspezifisch gebundener RNA und damit der Optimierung der Ergebnisse.

Gewaschen wird mit der

Posthybridisierungswaschlösung (PHM): Bsp für 1000 ml

- ◆ 500 ml Formamid
- ◆ 100 ml 10 x Salze
- ◆ 1,6 g DTT

Mit deionisiertem Wasser wird nun auf 1000 ml aufgefüllt, gemischt und die Lösung im Wärmeschrank auf 52 °C vorgewärmt.

Frische Leerküvetten werden mit PHM gefüllt und 30 min im Wasserbad auf 52 °C vorgewärmt.

Der Parafilm wird nun von den hybridisierten Präparaten entfernt und vorsichtig in den radioaktiven Abfall gegeben.

Die Schnitte werden aus der Hybridisierungskammer in die mit PHM gefüllten Küvetten einsortiert und ca. 30 min in den Schüttler des 52 °C-Wasserbades gestellt.

Danach wird die benutzte Lösung in den radioaktiven Abfall entsorgt und neuer PHM in die Küvetten gefüllt. Nun werden die Schnitte für ca 4 h bei 52°C unter Schütteln inkubiert.

TES-Waschlösung, pH 7,5: Bsp für 1000 ml

- ◆ 10 ml 1 M Tris- Hcl pH 7,5
- ◆ 2 ml 0,5 M EDTA
- ◆ 100 ml 5 M NaCl

Diese Lösung wird mit deionisiertem Leitungswasser auf 1000 ml aufgefüllt, gemischt und auf 37° C vorgewärmt.

Die Schnitte werden nun 15 min in TES gewaschen, dabei wird die Temperatur im Schüttler mit Eis auf 37° C herunterreguliert.

Die Küvetten verbleiben 30 min im Schüttelwasserbad bei 37° C, die verwendete Spüllösung ist:

- ◆ TES mit RNase A (300 ml TES mit 600 µl Rnase) *zur Entfernung einsträngiger nicht hybridisierter Sonden.*

Ab jetzt müssen neue Küvetten verwendet werden.

Es folgen weitere 15 min mit frischer TES im Schüttler, und schließlich wird noch ein weiteres Mal für 15 min in frischer TES gespült.

Dann wird weiter unter Schütteln bei RT gewaschen (nicht mehr im Isotopenlabor):

- ◆ 15 min mit 2 x SSC
- ◆ 15 min mit 0,1 x SSC

Danach werden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben:

- ◆ 20 sec 30 % Eth. / 0,3 M NH₄- Acetat (pH des eingesetzten NH₄-Acetats: 7,5)
- ◆ 20 sec 70 % Eth / 0,3 M NH₄- Acetat
- ◆ 20 sec 90 % Eth / 0,3 M NH₄- Acetat
- ◆ 20 sec 100 % Eth

Die Schnitte sollen nun 1-2 h (oder über Nacht) trocknen und dabei staubfrei abgedeckt sein.

Beschichtung der Schnitte mit Photoemulsion (Dippen)

Durch die aufgetragene Photoemulsion sollen die entstandenen Hybride im Präparat detektiert werden.

Sie wird durch die radioaktiv (³⁵ S) markierten RNA-RNA-Hybride an entsprechender Stelle geschwärzt –diese zeigen sich später unter dem Lichtmikroskop als punktförmige Strukturen (grains) über den entsprechenden Zellen bzw. Tumorarealen.

Damit aber die Schwärzung nicht an unspezifischer Stelle auftritt, bzw. im schlimmsten Fall das ganze Präparat überbelichtet ist, muss man während der folgenden Arbeitsschritte bei vollständiger Dunkelheit arbeiten und dabei jegliche Lichtquelle (selbst Armbanduhr-Leuchtzeiger u.ä.) vermeiden.

Ebenso wichtig ist es, die Emulsion bei ihrer Zubereitung nicht zu stark zu schütteln, da sonst vermehrt Blasen entstehen, die später die optimale Interpretation des Befundes erschweren.

Zunächst wird eine Küvette mit 10 ml 0,6 M NH₄-Acetat (pH 7,5) und getrennt davon 10 ml Photoemulsion im Wasserbad auf 43 °C erhitzt. Dann wird die so erwärmte Photoemulsion vorsichtig in die mit NH₄-Acetat gefüllte Küvette gegeben und langsam vermengt .

Daraufhin werden die Objektträger einzeln jeweils ca 1- 2 sec in die Emulsion getaucht. Man lässt sie kurz abtropfen und stellt sie zum Trocknen in einen vorbereiteten Ständer.

Nach ca. 1 h Trocknungszeit werden die Schnitte in Boxen (incl. Trocknungsmittel CaCl₂) einsortiert, diese dannlichtsicher in zwei Lagen Alufolie verpackt, entsprechend nach Inhalt und Datum beschriftet und anschließend im Kühlschrank bei 4°C bis zur Entwicklung aufbewahrt.

Entwicklung

Nach ca 2 Wochen wird die erste Charge der mit der „Antisense“-Sonde hybridisierten Präparate entwickelt. Hierbei kann vorab schon ein erster Eindruck von der Belichtung und der Menge der nachzuweisenden mRNA gewonnen werden. Dies dient zur besseren Abschätzung der optimalen Belichtungszeit für die mit „Anti-Sense“- und „Sense“-Sonde inkubierten Präparate.

Für alle drei Marker mit ihren Sonden (uPA, PAI-1 und uPAR) ergab sich eine mittlere optimale Belichtungszeit von ca vier Wochen. Für jede der vorgenommenen Hybridisierungsserien wurde die endgültige Belichtungszeit anhand ihrer eigenen ersten „Antisense“-Ergebnisse abgeschätzt.

Entwicklungsvorgang:

Vor der eigentlichen Entwicklung sollen die Schnitte ein paar Stunden an die Raumtemperatur adaptiert sein.

Die nächsten Arbeitsschritte finden in der Dunkelkammer statt.

Die Schnitte werden in Glasküvetten einsortiert.

Jede Küvette wird nun komplett 3 min in Kodak D 19- Entwickler (im Verhältnis 1 : 1 mit Aqua dest gemischt) unter gelegentlichem Schütteln gespült.

Darauf gibt man die Küvetten kurz in Essigsäure (1%), um den Entwicklungsvorgang zu stoppen.

Anschließend werden die Küvetten (wieder unter leichtem Rütteln) für 3 min in Kodakfixierer getaucht (Fix / Aqua dest = 1 : 3).

Zuletzt werden die Schnitte mit kaltem Leitungswasser gespült, und das Licht kann wieder angestellt werden.

Die Präparate werden mit Hämalaun und Eosin gegengefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol an das Eindeckmedium (Entellan) adaptiert und schließlich mit Deckgläsern versehen.

1.1.6. Semiquantitative Mikroskopie und Auswertung

Alle hybridisierten Präparate wurden bei 40-facher Vergrößerung im Hellfeld beurteilt.

Es wurde die mRNA-Expression von uPA, PAI-1 und uPAR in benignen und malignen Tumoren untersucht, um eventuelle Unterschiede in Intensität und Verteilung der Signalexpression abhängig von der Tumorentität festzustellen.

Ferner wurde die Signalintensität über Tumor- und Stromazellen der einzelnen Tumorpräparate untersucht und miteinander verglichen. Hierbei wurden für die „Antisense“-Präparate die „grains“ über 100 Zellen innerhalb repräsentativer Felder des zu untersuchenden Gewebes (Epithel, Tumorstroma, angrenzendes normales Stroma) gezählt und der Mittelwert errechnet. Genauso wurde auch mit den dazugehörigen Kontrollpräparaten („sense“-Präparate) verfahren, um die Intensität der Hintergrundsignale festzustellen. Die vorhandenen Hintergrundsignale als Ausdruck unspezifischer Signalanhäufung wurden für jeden Schnitt gesondert von der Intensität abgezogen, um einer eventuell unterschiedlichen Sondenstärke, Schnittdicke oder auch Verdünnungseffekten Rechnung zu tragen und damit zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen.

Auch die Verteilungsmuster sowohl im einzelnen Präparat als auch der diesbezügliche Vergleich der verschiedenen Tumortypen waren Gegenstand unserer Untersuchungen.

Die Expression der mRNA der verschiedenen Plasminogenaktivatorsystemkomponenten im Gefäßendothel oder perivaskulären Stroma der Präparate wurde ebenfalls beobachtet.

Verteilungsmuster:

- ◆ sporadisch: einzelne positive Zellen pro Gesichtsfeld
- ◆ fokal: Komplex aus mindestens zehn positiven Zellen an einer Stelle
- ◆ multifokal: herdförmige Bereiche positiver Zellen an verschiedenen Stellen des Präparates
- ◆ diffus: Gleichmäßige Verteilung positiver Zellen im Präparat

Intensität (Anzahl der grains über einer Zelle):

◆	weniger als 4 grains	-	entsprechend negativer,
◆	4 bis 15 grains	+	geringer,
◆	16 bis 45 grains	++	mittelstarker und
◆	mehr als 45 grains	+++	starker mRNA-Expression

1.1.7. Statistische Auswertung

Sämtliche auf Signalintensität und –verteilung bezogenen Befunde wurden mit dem SPSS-Programm -Version 11,0- (zunächst über deskriptive Statistiken) auf Trends untersucht, die auf eine eventuelle Verstärkung oder Abschwächung der Signale über Stroma- und Tumorzellen abhängig von der **Dignität** der Tumoren hinwiesen. Ebenso wurde untersucht, ob sich je nach **FIGO-Stadium** oder **Differenzierungsgrad** unterschiedliche oder gar signifikante Veränderungen der Signalintensität oder des Verteilungsmusters in den einzelnen Gruppen feststellen ließen. Aufgrund dieser Berechnungen wurde dann jeweils der exakte zweiseitige Signifikanztest nach Fisher durchgeführt.

4. Ergebnisse

Vorbemerkung

Wir untersuchten die Intensität und Verteilungsmuster der PAI-1-, uPA- und uPA-Rezeptor-spezifischen Hybridisierungssignale über Stroma- und Tumorzellen verschiedener Karzinom- und Adenomtypen. Ein zusammenfassender Überblick findet sich in Tabelle 2. Die wichtigsten Ergebnisse für die einzelnen Tumorentitäten sind in den Tabellen 3 bis 7 (verschiedene benigne Tumoren, maligne Tumoren nach Differenzierungsgrad sowie zystisches und normales Ovarialgewebe) dargestellt.

Für die folgende Beschreibung und Bewertung der Stromazell-Signale (siehe auch Tabellen und spätere statistische Auswertung) wurde stets das tumorassoziierte Stroma herangezogen. Innerhalb der Gruppe der Fibrome wurden alle Zellen als Tumorzellen bezeichnet.

4.1. Karzinome

PAI-1

Wir fanden eine PAI-1- Expression über den Stromazellen sämtlicher untersuchter maligner Tumoren. Die Intensität war hierbei vom Differenzierungsgrad abhängig, d.h. schlechter differenzierte Tumoren zeigten intensivere Signale ($p=0,04$). Das Verteilungsmuster der Signale schien davon unabhängig zu sein ($p= 0,51$). Weder die Signalintensität noch das Verteilungsmuster über Tumorzellen zeigten einen Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad der untersuchten Fälle ($p = 0,72$ bzw. $p = 1$). In Anbetracht der vergleichsweise niedrigen Fallzahlen sind diese Werte jedoch mit Zurückhaltung zu interpretieren.

Alle Kontroll-Hybridisierungen mit der „Sense“-Sonde brachten die erwarteten negativen Ergebnisse und konnten somit als Negativkontrollen verwendet werden. Dies war sowohl bei den serösen und muzinösen epithelialen Tumoren als auch in den endometroiden, mischdifferenzierten Karzinomen, dem Klarzelltumor, den beiden untersuchten metastatischen Ovarialtumoren sowie beim einzigen Fall eines Krukenbergtumors zu bestätigen.

Im Folgenden möchte ich die Ergebnisse für die einzelnen histologischen Subgruppen beschreiben:

In der Gruppe der **serösen epithelial-stromalen Tumoren** (n = 25) zeigten alle Fälle deutlich ausgeprägte Signale über Stromazellen. Dies galt für alle Tumoren dieses Typs mit guter, mittlerer sowie schlechter Differenzierung. Sogar der einzige seröse **G I**-Tumor zeigte stromal eine mittelstarke Signalexpression. Bei einem solid anaplastischen **G III**-Karzinom konnten wir eine starke mRNA-Expression sowohl über Stroma-als auch Tumorzellen beobachten.

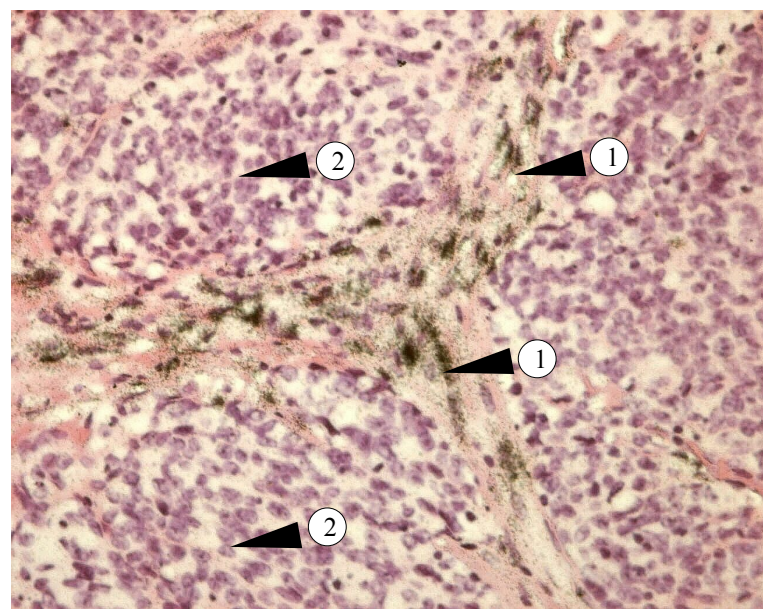


Bild 1 :Präparat-Nr: 95/ 4100

Serös-papilläres Adenokarzinom G2

(PAI-1-Sonde, 200 fach vergrößert)

Diffuse Signalverteilung, dreifach positiv über Stromazellen (1)

Keine spezifischen Signale über Tumorzellen (2)

Die Signalverteilung zeigte sich ausgeprägt vor allem über den Stromazellen der untersuchten 17 schlecht differenzierten Karzinome. Nicht in allen Fällen konnte eine bevorzugte stromale Signalanhäufung in direkter Beziehung zu den Tumorzellen festgestellt werden. Bei den **G II**-Tumoren und beim einzigen gut differenzierten serösen Tumor waren die Signale ebenfalls diffus bis multifokal zu beobachten.

Über Tumorzellen hingegen waren überwiegend keine oder höchstens mäßig starke Signale zu detektieren. Bezüglich der Signalintensität gab es

deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Fällen unterschiedlicher Differenzierungsgrade.

PAI-1-mRNA konnte lediglich bei sieben (7 / 17) **G III**-, und drei (3 / 7) **G II**- Tumoren festgestellt werden, wobei die Tumorzellen der schlecht differenzierten Karzinome durchschnittlich etwas stärker positiv waren als die der mäßig differenzierten.

Der einzige **GI**-Fall dieser Gruppe zeigte gar keine Signale über den Tumorzellen.

Bei der Verteilung ihrer positiven Tumorzellsignale ging der Trend eindeutig in Richtung einzeln/fokaler und höchstens multifokaler Signalverteilung. In keinem der Fälle kam es zu diffus verteilten Signalen.

Die neun **muzinösen epithelialen Tumoren** exprimierten ebenfalls alle PAI-1- mRNA in ihren Stromazellen- auch in dieser Gruppe ergab sich bezüglich der Intensität und Verteilungsmuster der Signale kein bedeutender Unterschied zwischen den verschiedenen Differenzierungsgraden.

Die Tumorzellen waren ca. in der Hälfte der Fälle (5/9) negativ für PAI-1.

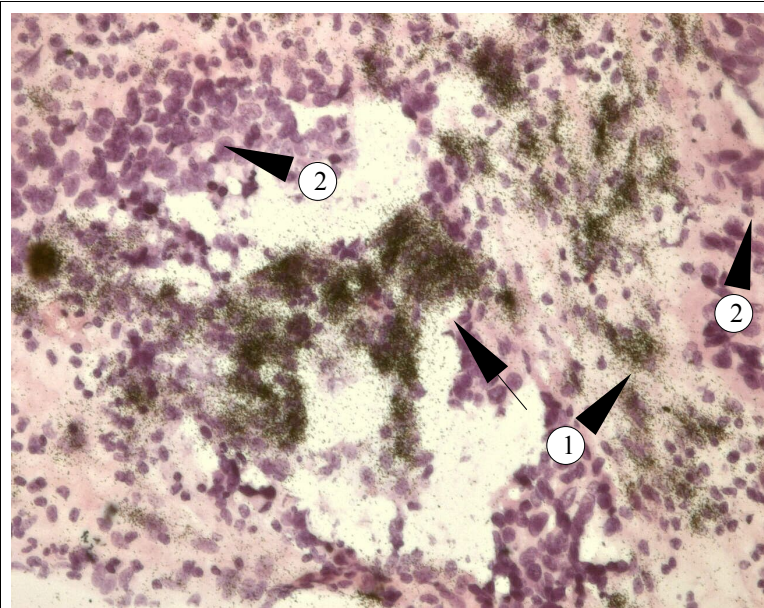


Bild 2: Präparat-Nr: 97/ 5944

Undifferenziertes fokal muzinöses Karzinom G3

(PAI-1-Sonde, 200fach vergrößert)

Diffuse Signalverteilung, dreifach positiv über Stromazellen (1)

Keine spezifischen Signale über Tumorzellen (2)

Die restlichen vier gut differenzierten Fälle zeigten kein homogenes Verteilungsmuster.

Die vier **endometroiden Fälle** (zwei schlecht und zwei mäßig differenzierte) zeigten denen der bisher beschriebenen Gruppen vergleichbare Ergebnisse: Alle exprimierten deutlich stärker PAI-1 mRNA in ihren Stroma- als in ihren Tumorzellen.

Für die beiden **Mischtumoren** zeigte sich mit abnehmender Differenzierung (**G I vs G II**) bei den Stromazellen sowohl eine Zunahme der Signalintensität (von mittelstark

auf stark) als auch der Verteilung von multifokal auf diffus bei jeweils fehlenden Tumorzellsignalen.

Der einzige untersuchte **Klarzelltumor** zeigte mittelstarke multifokale Signale über Stromazellen und keine Signale über Tumorzellen.

Beide **Metastasen** wiesen sowohl Stromazell- als auch Tumorzellsignale auf, wenn auch die Stromazellen sowohl in der Intensität als auch Verteilung jeweils eine Stufe höher bewertet wurden.

Von den beiden **Krukenbergtumoren** ist nur einer auf die Expression von PAI-1 untersucht worden. Dieser **G III**-Tumor war über Tumorzellen negativ bei mittelstarker fokaler mRNA-Expression der Stromazellen.

uPA:

Hier konnten wir keine signifikante Zu- oder Abnahme der Signalintensität bzw -verteilung über Stroma- und Tumorzellen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad feststellen. [$p = 0,29$ (SZ) und $0,85$ (TZ) für die Intensität und $p = 0,24$ (SZ) und $0,76$ (TZ) für die Verteilung.]

Bei den **serösen** Tumoren zeigte sich ein vom PAI-1-Ergebnis abweichendes uPA-Expressionsmuster:

Anders als bei der PAI-Expression gab es hier mehrere Fälle ohne spezifische Signale. Anteilig am häufigsten waren diese interessanterweise bei den undifferenzierten Karzinomen vertreten.

Rund ein Drittel der untersuchten **G III**-Tumoren zeigte keine uPA-spezifischen Hybridisierungssignale über den Stromazellen. Ansonsten war die Signalintensität über Stromazellen der undifferenzierten Karzinome eher schwach oder höchstens mittelstark. Kein Fall war stark positiv.

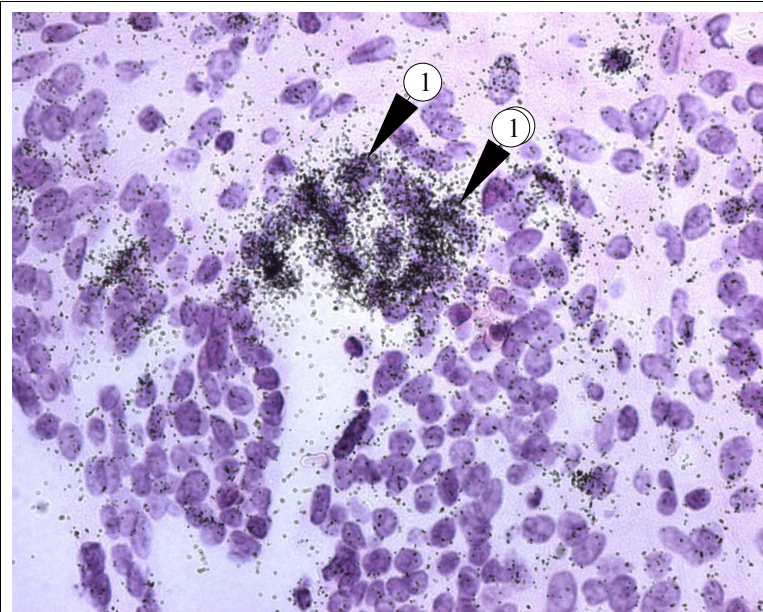


Bild 6 (3) Präparat-Nr: 96/ 6314

Serös-papilläres Zystadenokarzinom G2

(uPA-Sonde, 400 fach vergrößert)

Multifokale Signalanreicherung, dreifach positiv über Tumorzellen (1)

Zu etwa gleichen Teilen lag eine einzeln/fokale und multifokale Signalverteilung vor; kein Fall zeigte diffus verteilte Signale.

Bei den sieben **G II**-Tumoren war nur ein Fall ohne stromale Signale, der einzige **G I**-Tumor zeigte mittelstarke, multifokal verteilte Signale über den Stromazellen.

Hier ließ sich folglich keine Zunahme der Expression in Stromazellen mit abnehmender Differenzierung der Tumoren nachweisen.

Bei der Beurteilung der mRNA-

Expression über Tumorzellen konnte ebenfalls keine Abhängigkeit der Signalintensität vom Differenzierungsgrad festgestellt werden:

Etwa die Hälfte der **G III-und G II**-Tumoren zeigte keinerlei positive Signale über den Tumorzellen.

Der **G I**-Tumor zeigte zwar eine starke, jedoch nur fokal vorkommende Signalanhäufung.

Bei den untersuchten **muzinösen Tumoren** wurde nur in ca der Hälfte der Fälle uPA exprimiert, dabei konnten mehr stromale als tumorzellassoziierte Signale gefunden werden.

Auch hier war kein Unterschied zwischen gut und schlecht differenzierten Fällen feststellbar.

In der Gruppe der vier untersuchten **endometrioiden** Tumoren exprimierten alle Fälle uPA

in ihren Stromazellen. Leichte Unterschiede waren lediglich im Signalverteilungsmuster festzustellen: Dies war bei den schlecht differenzierten Fällen tendenziell weitläufiger.

Nur bei zwei Tumoren war eine mRNA-Expression über den Tumorzellen zu finden. Bei den verbleibenden beiden Fällen zeigten sich jeweils schwach auftretende Signale nur über einzelnen Tumorzellen.

Die beiden der Gruppe der **Mischtypen** zugeordneten Fälle waren beide positiv in den Stromazellen, wobei sowohl die Intensität und Verteilung des gut differenzierten Falles jeweils schwächer waren als die des G II-Tumors. Auch seine Tumorzellen zeigten keine mRNA Expression.

Der **Klarzelltumor** zeigte weder über den Stroma- noch über den Tumorzellen eine mRNA-Expression.

Nur bei einer **Metastase** konnten wir über den Stromazellen fokal mittelstarke Signale feststellen. Ihre Tumorzellen zeigten an mehreren Stellen eine schwache mRNA-Expression.

Die andere Metastase war interessanterweise sowohl über Stroma- als auch Tumorzellen uPA-negativ.

Die beiden **Krukenbergtumoren** boten ebenfalls kein einheitliches Bild: Der **G III**-Tumor war stromal negativ und zeigte über den Tumorzellen lediglich einzelne schwache Signale.

Der **G II**-Tumor war wiederum nur einzeln fokal positiv über Stroma- und negativ über Tumorzellen.

uPA-Rezeptor:

Mit dieser Sonde wurden insgesamt 16 **seröse** Tumoren untersucht.

Zwölf Fälle zeigten Signale über den Stromazellen, wobei sich zwischen G III- und G II-Tumoren kein bedeutender Unterschied bezüglich der Menge der exprimierten mRNA feststellen ließ. Jedoch war der Anteil der negativen Fälle im mittelgradig differenzierten Tumorkollektiv bedeutend höher.

Nur bei einem undifferenzierten Fall traten die Signale stark und diffus verteilt auf. Ansonsten waren die meisten **G III-Tumoren** schwach oder mittelstark positiv bei einer überwiegend mäßigen Signalverteilung. Nur ein einziger Fall war ohne Signale über den Stromazellen, wohingegen die Hälfte der **G II-Tumoren** stromal negativ war.

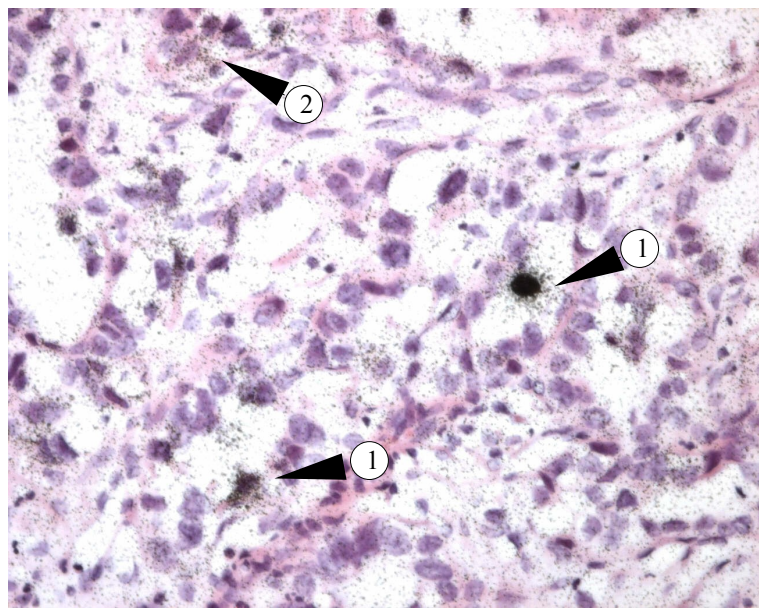


Bild 4: Präparat-Nr: 95/3316

Papilläres Zystadenokarzinom G3

(uPA-R-Sonde, 200 fach vergrößert)

Diffuse Signalverteilung, dreifach positiv über Tumorzellen (1)

fokal spezifische Signale, einfach positiv über Stromazellen (2)

Über Tumorzellen waren nur zwei der untersuchten 16 Fälle negativ; beide waren interessanterweise schlecht differenzierte Karzinome.

Ansonsten ging der Trend innerhalb der undifferenzierten Tumoren eindeutig zur stärkeren Signal-expression mit einer im Vergleich zu den **G II**-Tumoren deutlich stärkeren Verteilung.

In der Gruppe der **muzinösen Tumoren** war nur ein **G I**-Tumor negativ, der überwiegende Teil der **G I**-Tumoren jedoch positiv über Stromazellen, in zwei Fällen schwach und in einem sogar

mittelstark. Damit zeigte sich kein Unterschied zum einzigen untersuchten Vertreter der **undifferenzierten** Karzinome.

Bezüglich der mRNA-Expression über Tumorzellen ließen sich im Vergleich zu den überwiegend signalnegativen gut differenzierten Tumoren für den **G III**-Tumor multifokal mittelstarke Signale feststellen.

Bei den beiden untersuchten **endometrioiden** Tumoren ließen sich hier bezüglich der Expression über Stromazellen keine nennenswerten Unterschiede feststellen. Auch die Tumorzellen zeigten den gleichen Befund.

Die beiden **Mischtypen** waren im gut differenzierten Fall über Stroma - und Tumorzellen negativ, wohingegen wir beim mittelgradig differenzierten Karzinom stroma - und tumorzellassoziierte mRNA-Expression beobachteten.

4.2. Benigne Tumoren

PAI-1:

Alle 14 untersuchten **Adenome** exprimierten mRNA in Stromazellen. Hinsichtlich der Ergebnisse bei serösen (n=12) und muzinösen (n=2) Adenomen gab es keine Unterschiede. Verteilt waren die Signale in den Tumoren überwiegend diffus und multifokal.

Bei einigen Tumoren waren jedoch auch z.T. stark positive und multifokal bis diffus auftretende Signale über nicht-tumorassoziertem Stroma festzustellen. Hier fielen uns sowohl Corpora albicantia und das sie umgebende Stroma als auch fokale schwach-bis mittelstark positive Gefäßendothel- und perivaskuläre Stromazellen auf. In zwei Fällen waren auch deutlich markierte Hiluszellkonglomerate mittelstark positiv.

Über den Tumorzellen sämtlicher Fälle war keine Expression von PAI-1- mRNA festzustellen.

Innerhalb der Gruppe der **Fibrome** (n=5) zeigten alle Fälle Signale über den Tumorzellen.

Bemerkenswert ist, dass die Signale in allen Fällen überwiegend nur perivaskulär auftraten und dass teilweise auch Gefäßendothelzellen fokale schwach PAI-1- mRNA exprimierten.

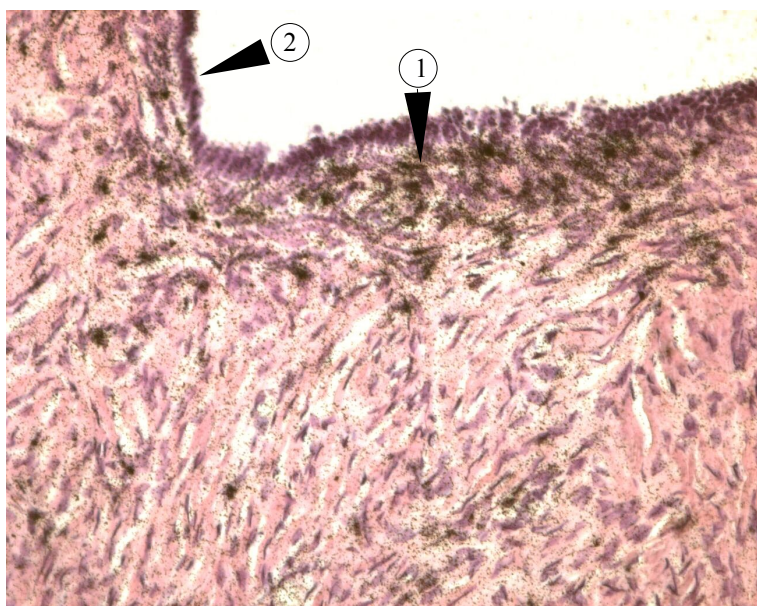


Bild 5: Präparat-Nr: 93/ 2823

Seröses Zystadenofibrom

(PAI-1-Sonde, 200 fach vergrößert)

Multifokale Signalanreicherung subepithelial,

Dreifach positiv (>45 grains) über Stromazellen (1)

Einfach positiv über Zystenepithel (2)

Auch im zusätzlich untersuchten ovariellen **Vergleichsgewebe** (in einem Fall ein zystisch verändertes Ovar, im anderen ein hier tumorfreier Schnitt aus einem Ovar - laut schriftlichem Befund mit muzinösem G I-Anteil) ergab sich ein ähnliches Bild: Beide Präparate exprimierten stark PAI-1 in den Stromazellen. Der zystisch veränderte Fall zeigte eine multifokale, der tumorfreie Schnitt eine diffuse Verteilung der Signale. Hierbei fielen in beiden Fällen ebenfalls Gelbkörpernarben, das Stroma um kleinere und größere Gelbkörperzysten und das perivaskuläre Stroma auf.

uPA:

Alle **Adenome** (n = 20) zeigten keinerlei mRNA-Expression über den tumorassoziierten Stromazellen. Nur ein Fall, ein seröses Zystadenom, zeigte eine mittelstarke multifokale Signalanhäufung im nicht – tumorassoziierten Stroma: Hierbei handelte es sich um dieselben Konglomerate von Hiluszellen, die bei der Hybridisierung mit PAI-1 multifokal stark positiv gewesen waren.

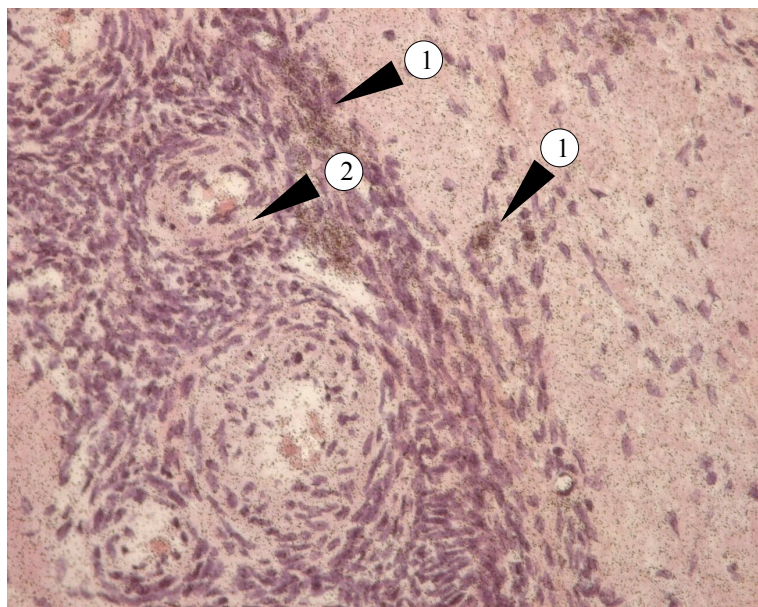


Bild 6: Präparat-Nr: 96/ 1221

Seröses Zystadenom

(uPA-Sonde, 200 fach vergrößert)

Multifokale Signalanreicherung,

Einfach positiv (4-15-grains) über Stromazellen (1)

Blutgefäßanschnitt mit Endothelzellen (2)

Das zweite bereits vorhin beschriebene Präparat mit PAI-1 mRNA-positiven Hiluszellen - ein weiteres seröses Zystadenofibrom - war für uPA negativ.

Interessanterweise wurde in keinem der untersuchten Adenome uPA-mRNA in Tumorzellen nachgewiesen.

In keinem der fünf **Fibrome** konnten wir uPA-spezifische Signale beobachten..

Das zystisch veränderte Ovar zeigte weder über den Stroma - noch über den Tumorzellen Signale.

Im anderen Vergleichsgewebe (hier ein tumorfreies Präparat aus einem Ovar mit muzinösem G I – Anteil) ließen sich schwach positive Signale über einzelnen Stroma - und Gefäßendothelzellen feststellen.

uPA-Rezeptor:

Mit dieser Sonde wurden 12 **Adenome** untersucht. In fast allen Fällen konnten weder über Stroma- noch über Tumorzellen Signale gefunden werden. Nur ein seröses Zystadenofibrom zeigte multifokal schwache Signale über tumorzellassozierten Stroma- und an einer Stelle über Tumorzellen.

Im tumorassoziierten Stroma waren auch vereinzelt Gefäßendothelzellen schwach positiv.

Von den fünf **Fibromen** wurden nur zwei Fälle auf uPAR-Expression untersucht, wobei der eine Fall gar keine Signale zeigte und der andere nur vereinzelt schwach uPAR-mRNA in seinen Tumorzellen exprimierte.

Im hier tumorfrei vorliegenden Schnitt eines Ovars (mit beschriebenem muzinösen G I-Tumor) ließen sich an mehreren Stellen des Stromas mittelstarke Signale feststellen. Hierbei handelte es sich sowohl um Gelbkörpernarben als auch um perivaskuläres Stroma und einzelne schwach positive Endothelzellen.

Zusammenfassung und statistische Auswertung

Aufgrund der stark unterschiedlichen Fallzahlen innerhalb der einzelnen Karzinomtypen wurden die statistischen Berechnungen nicht für jeden Tumortyp durchgeführt, sondern die Karzinome wurden je nach Differenzierungsgrad und FIGO-Stadium zusammengefasst und auf eine evtl. davon abhängige Verstärkung der Signalintensität und/oder des Verteilungsmusters über Stroma- und Tumorzellen untersucht:

Es ergab sich eine Zunahme der Signalintensität in Abhängigkeit vom **Differenzierungsgrad** (G I < G II < G III) für die PAI-1-Expression über Stromazellen ($p = 0,043$) und für die uPAR-Expression über Tumorzellen ($p = 0,014$). Für die Verteilung der Signale ließ sich bei der Untersuchung auf uPA-R folgendes feststellen: In G III-Tumoren war die Verteilung der Signale über Tumorzellen an mehr Stellen zu detektieren als in G II - oder G I - Tumoren ($p = 0,007$).

Bei der Untersuchung auf eine mögliche Beziehung zwischen **FIGO-Stadium** und Signalverteilung und -intensität fanden wir für keinen der verwendeten Marker PAI-1, uPA oder uPAR eine Abhängigkeit, weder für die Signale über Stroma- noch über Tumorzellen.

Im Hinblick auf die Signalexpression im Zusammenhang mit der **Tumordignität** ließ sich feststellen, dass nur für die Intensität und Verteilung der uPA- und uPAR-spezifischen Hybridisierungssignale eine eindeutige Abhängigkeit von der Dignität bestand.

Die Intensität und der Grad der Verteilung von uPA- und uPAR-Signalen war in Stroma- und Tumorzellen von Karzinomen im Vergleich zu Adenomen und Fibromen „signifikant“ erhöht.

(p jeweils < 0,001). Hinsichtlich der mRNA-Expression von **PAI-1** konnten wir keine unterschiedliche Signalexpression oder -verteilung in den benignen und malignen Tumorgruppen finden.

Tabelle 4

PAI-1-, uPA- und uPAR-Transkripte in Stroma- und Tumorzellen in Tumoren unterschiedlicher Dignität

Diagnose	PAI-Transkripte		UPA-Transkripte		UPAR-Transkripte	
	SZ	TZ	SZ	TZ	SZ	TZ
Karzinome						
serös	25(25)	10(25)	18(25)	13(25)	12(16)	14(16)
muzinös	9(9)	4(9)	5(9)	3(9)	4(5)	2(5)
endometrioid	4(4)	2(4)	4(4)	2(4)	2(2)	2(2)
Mischtyp	2(2)	0(2)	2(2)	0(2)	1(2)	1(2)
Klarzelltumor	1(1)	0(1)	0(1)	0(1)	n.u.	n.u.
Metastasen	2(2)	2(2)	1(2)	1(2)	n.u.	n.u.
Krukenberg	1(1)	0(1)	1(2)	1(2)	n.u.	n.u.
Adenome						
serös	12(12)	0(12)	0(18)	0(18)	1(10)	1(10)
muzinös	2(2)	0(2)	0(2)	0(2)	0(2)	0(2)
Fibrome		5(5)		0(5)		1(2)
Vergleich						
normal	1(1)		1(1)		1(1)	
Zyste	1(1)		0(1)		n.u.	

n.u.: Nicht untersucht

Tabelle 5: PAI-1, UPA, UPA-R:

Verteilung und Signalintensität bei benignen Tumoren

PAI-1		Verteilung				Intensität			
Stromazellen	N	Negativ	Einzeln Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	19	5	1	3	10	5	1	8	5
Diagnose									
Serös	12	0	1	3	8	0	1	7	4
Muzinös	2	0	0	0	2	0	0	1	1
Fibrom	5	5	0	0	0	5	0	0	0

Stromazellen	N	Negativ	Einzeln Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	19	14	2	2	1	14	2	2	1
Diagnose									
Serös	12	12	0	0	0	12	0	0	0
Muzinös	2	2	0	0	0	2	0	0	0
Fibrom	5	0	2	2	1	0	2	2	1

UPA		Verteilung				Intensität			
Stromazellen	N	Negativ	Einzeln Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	25	25	0	0	0	25	0	0	0
Diagnose									
Serös	18	18	0	0	0	18	0	0	0
Muzinös	2	2	0	0	0	2	0	0	0
Fibrom	5	5	0	0	0	5	0	0	0

Stromazellen	N	Negativ	Einzeln Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	25	25	0	0	0	25	0	0	0
Diagnose									
Serös	18	18	0	0	0	18	0	0	0
Muzinös	2	2	0	0	0	2	0	0	0
Fibrom	5	5	0	0	0	5	0	0	0

UPA-R		Verteilung				Intensität			
Stromazellen	N	Negativ	Einzeln Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	14	13	0	1	0	13	1	0	0
Diagnose									
Serös	10	9	0	1	0	9	1	0	0
Muzinös	2	2	0	0	0	2	0	0	0
Fibrom	2	2	0	0	0	2	0	0	0

Stromazellen	N	Negativ	Einzeln Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	14	12	2	0	0	12	2	0	0
Diagnose									
Serös	10	9	1	0	0	9	1	0	0
Muzinös	2	2	0	0	0	2	0	0	0
Fibrom	2	1	1	0	0	1	1	0	0

Tabelle 6: PAI-1, UPA, UPA-R:

Verteilung und Signalintensität bei G1-Karzinomen

PAI-1		Verteilung				Intensität			
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	9	0	0	6	3	0	2	6	1
Diagnose									
Serös	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Muzinös	7	0	0	4	3	0	2	4	1
Mischtyp	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Tumorzellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	9	5	2	2	0	5	1	3	0
Diagnose									
Serös	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Muzinös	7	3	2	2	0	3	1	3	0
Mischtyp	1	1	0	0	0	1	0	0	0
UPA									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	9	3	4	2	0	3	4	2	0
Diagnose									
Serös	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Muzinös	7	3	3	1	0	3	3	1	0
Mischtyp	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Tumorzellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	9	6	3	0	0	6	1	1	1
Diagnose									
Serös	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Muzinös	7	5	2	0	0	5	1	1	0
Mischtyp	1	1	0	0	0	1	0	0	0
UPA-R									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	5	2	1	2	0	2	2	1	0
Diagnose									
Muzinös	4	1	1	2	0	1	2	1	0
Mischtyp	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Tumorzellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	5	4	0	1	0	4	0	1	0
Diagnose									
Muzinös	4	3	0	1	0	3	0	1	0
Mischtyp	1	1	0	0	0	1	0	0	0

Tabelle 7: UPA-R:PAI-1, UPA, UPA-R:

Verteilung und Signalintensität bei G II Karzinomen

PAI-1		Verteilung				Intensität			
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	10	0	0	4	6	0	1	3	6
Diagnose									
Serös	7	0	0	3	4	0	1	2	4
Endometrioid	2	0	0	1	1	0	0	1	1
Mischtyp	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Tumorzellen									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	10	6	4	0	0	6	3	1	0
Diagnose									
Serös	7	4	3	0	0	4	2	1	0
Endometrioid	2	1	1	0	0	1	1	0	0
Mischtyp	1	1	0	0	0	1	0	0	0
UPA									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	11	1	4	4	2	1	4	4	2
Diagnose									
Serös	7	1	2	3	1	1	2	3	1
Endometrioid	2	0	1	1	0	0	1	1	0
Mischtyp	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Krukenberg-Tu	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Tumorzellen									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	11	5	5	1	0	5	2	4	0
Diagnose									
Serös	7	3	3	1	0	3	1	3	0
Endometrioid	2	1	1	0	0	1	1	0	0
Mischtyp	1	0	1	0	0	0	0	1	0
Krukenberg-Tu	1	1	0	0	0	1	0	0	0
UPA-R									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	8	3	2	1	2	3	4	1	0
Diagnose									
Serös	6	3	2	0	1	3	2	1	0
Endometrioid	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Mischtyp	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Tumorzellen									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	8	0	4	4	0	0	5	3	0
Diagnose									
Serös	6	0	3	3	0	0	5	1	0
Endometrioid	1	0	1	0	0	0	0	1	0
Mischtyp	1	0	0	1	0	0	0	1	0

Tabelle 8: PAI-1, uPA und uPA-R:

Verteilung und Signalintensität bei G III / IV Karzinomen

PAI-1		Verteilung				Intensität			
Stromazellen	N	Negativ	Einzel / Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	25	0	3	8	14	0	0	11	14
Diagnose									
Serös	17	0	1	6	10	0	0	6	11
Muzinös	2	0	0	1	1	0	0	1	1
Endometrioid	2	0	1	0	1	0	0	1	1
Klarzelltumor	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Krukenberg-Tu	1	0	1	0	0	0	0	1	0
Ma-Metastasen	2	0	0	0	2	0	0	1	1
Tumorzellen									
Gesamt	25	15	5	5	0	15	5	4	1
Diagnose									
Serös	17	10	4	3	0	10	3	3	1
Muzinös	2	2	0	0	0	2	0	0	0
Endometrioid	2	1	1	0	0	1	1	0	0
Klarzelltumor	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Krukenberg-Tu	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Ma-Metastasen	2	0	0	2	0	0	1	1	0
UPA									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel / Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	25	10	8	6	1	10	9	6	0
Diagnose									
Serös	17	6	6	5	0	6	8	3	0
Muzinös	2	1	1	0	0	1	1	0	0
Endometrioid	2	0	0	1	1	0	0	2	0
Klarzelltumor	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Krukenberg-Tu	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Ma-Metastasen	2	1	1	0	0	1	0	1	0
Tumorzellen									
Gesamt	25	13	8	2	2	13	6	5	1
Diagnose									
Serös	17	9	5	1	2	9	2	5	1
Muzinös	2	1	1	0	0	1	1	0	0
Endometrioid	2	1	1	0	0	1	1	0	0
Klarzelltumor	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Krukenberg-Tu	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Ma-Metastasen	2	1	0	1	0	1	1	0	0
UPA-R									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel / Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	12	1	3	7	1	1	8	2	1
Diagnose									
Serös	10	1	3	5	1	1	6	2	1
Muzinös	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Endometrioid	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Tumorzellen									
Gesamt	12	2	2	7	1	2	3	6	1
Diagnose									
Serös	10	2	1	6	1	2	2	5	1
Muzinös	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Endometrioid	1	0	1	0	0	0	1	0	0

Tabelle 9: PAI-1, UPA, UPA-R:

Verteilung und Signalintensität bei normalem Ovarialgewebe / Zyste

PAI-1		Verteilung				Intensität			
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	2	0	0	1	1	0	0	0	2
Diagnose									
Normgewebe	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Ovar-Zyste	1	0	0	1	0	0	0	0	1

UPA									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	2	1	1	0	0	1	1	0	0
Diagnose									
Normgewebe	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Ovar-Zyste	1	1	0	0	0	1	0	0	0

UPA-R									
Stromazellen	N	Negativ	Einzel Fokal	Multifokal	Diffus	Negativ	Schwach (+) Mäßig +	Mittel ++	Stark +++
Gesamt	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Diagnose									
Normgewebe	1	0	0	1	0	0	0	1	0

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Komponenten des Plasminogen-Aktivatorsystems in Ovarialtumoren untersucht. Die RNA-RNA- in situ-Hybridisierung erfolgte an verschiedenen Tumortypen – seröse, muzinöse, endometroide u.a. Karzinome und Adenome- unter Einsatz radioaktiv markierter uPA-, PAI-1- und uPAR- Ribosonden. Damit sollte festgestellt werden, ob Expressionsstärke und Expressionsmuster im Zusammenhang mit morphologischen Parametern stehen und welche Zelltypen die jeweiligen Komponenten exprimieren.

Bisher wurden zur Charakterisierung der Ovarialtumoren vor allem Untersuchungen auf PAI-1-, uPA- und/oder uPA-Rezeptor-Proteingehalt in Gewebesuspensionen, Blut der Patientinnen, Aszites- oder Zystenflüssigkeit oder immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Bestandteile der einzelnen Proteine herangezogen. So konnten z.B. Casslén et al. 1994 nachweisen, dass bei Patientinnen mit benignen und malignen Tumoren der uPA-Gehalt im Plasma deutlich höher war als bei gesunden Probandinnen. Ebenso war mehr uPA in Zystenflüssigkeit als im Tumorblut feststellbar. Für PAI-1 konnte in derselben Studie gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit Tumoren ebenfalls mehr Protein im peripheren Blut nachweisbar war als bei gesunden Probandinnen. Beim Vergleich des PAI-1 Gehalts in Zystenflüssigkeit und Tumorblut ließen sich in malignen Tumoren größere Mengen des analysierten Proteins nachweisen als in benignen.

1991 beschrieben Casslén et al. eine Zunahme des uPA-Rezeptor-Gehalts im Gewebe bösartiger Ovarialtumoren. Zum gleichen Ergebnis, allerdings im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom, kamen Sier, Stephens, Bizik et al. (1998).

Die quantitative Untersuchung des uPA-, uPAR- und PAI-1- Gehalts in Tumoren liefert folglich gute Vergleichsmöglichkeiten zwischen gut- und bösartigen Geweben, zumal damit nicht nur ein Ausschnitt, sondern der gesamte Tumor beurteilt wird.

Andererseits kann mit dieser Methode nicht der Ort der Protein- bzw. RNA-Produktion erfasst werden, sondern lediglich die Menge der gesuchten Substanz. Außerdem wird durch die unterschiedlichen Probengrößen und damit Zellmengen eine eindeutige Interpretation von hohen Plasminogenaktivatorspiegeln in Gewebesuspensionen erschwert (Andreasen et al. 1997).

Wie bereits beschrieben, können gut- und bösartige Tumoren durch ihren Gehalt an Plasminogen-Aktivatoren und -inhibitoren oder anhand ihres immunhistochemischen Färbeverhaltens unterschieden werden. Die daraus resultierende prognostische Relevanz bzw. der Einfluss auf den Erfolg bestimmter Therapien konnte nachgewiesen werden. In früheren Studien wurde die

Bedeutung von uPA und PAI-1 als prognostische Indikatoren für einige Karzinome, darunter Mammakarzinome (Duffy et al. 1988, 1990, 1996; Knoop et al. 1998; Foekens, Peters, Jänicke et al. 2000), Karzinome der Cervix uteri (Kobayashi et al. 1994, Riethdorf et al. 1999, Fleuren et al. 2004), des Endometriums (Gleeson et al. 1992, 1993 a und b; Foca et al. 2000, Taponeco et al. 2001) und des Ovars (Kuhn et al. 1999; Konecny et al. 2001) gezeigt. Ebenso wurde für Tumoren des Verdauungstraktes, z. B. Magen- (Nekarda et al. 1994; Cho et al. 1997) und Kolon- Tumoren (Skelly, Duffy et al. 1997, Protiva et al. 1998, Stephens et al. 1999), Gliome (Hsu et al. 1995), Weichteilsarkome (Choong et al. 1996), Tumoren der Lunge (Oka et al. 1991, Pedersen et al. 1994 a und b) und der Blase (Hasui et al. 1992) ein Zusammenhang zwischen Plasminogenaktivator-Expression und Prognose der PatientInnen nachgewiesen.

5.1. PAI-1 spezifische Signale in Karzinomen und benignen Tumoren

Wir beobachteten in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der Intensität von PAI-1-spezifischen Hybridisierungssignalen in Stromazellen mit abnehmendem Differenzierungsgrad ($p=0,043$). Für einen signifikanten Unterschied der PAI-1-Expression in Tumor- oder Stromazellen zwischen gut- und bösartigen Tumoren konnte jedoch kein Anhaltspunkt gefunden werden. Auch in der Literatur über Untersuchungen zum Gehalt an PAI-1 in Gewebeextrakten benigner und maligner Ovarialtumoren werden stark variierende Daten diskutiert. In der vergleichenden Studie von Pujade-Lauraine et al. von 1993 ergab sich zunächst kein signifikanter Unterschied der mittleren PAI-1 Konzentration, in späteren Arbeiten konnte aber mehrfach festgestellt werden, dass die PAI- und uPA-Expression in malignen Tumoren deutlich stärker war als in benignen Tumoren (Kuhn et al. 1999; Schmalfeldt et al. 2001). Borgfeldt et al. fanden 2001 mit der „Northern Blot“-Methode einen höheren Gehalt an uPA-, uPAR- und PAI-1-mRNA in schlechter differenzierten soliden Ovarialkarzinomen als in den zystischen, besser differenzierten. Sie postulierten in ihrer Studie eine Korrelation der gesteigerten Genexpression mit einem aggressiveren Phänotyp.

In der Studie von Casslén et al. (1994) wurde vermutet, dass PAI-1 sowohl von Zellen des Tumorgewebes als auch von Gefäßendothelzellen produziert wird. In der vorliegenden Arbeit bestätigte sich dieses Ergebnis durch die nachgewiesenen Hybridisierungssignale u.a. über Endothel- und perivaskulären Zellen des Tumorstromas benigner und maligner Tumoren. Auch Borgfeldt fand gelegentlich Signale über den Endothelien kleiner Gefäße (Borgfeldt et al. 2001).

Wir konnten darüber hinaus beobachten, dass auch im nicht direkt tumorassoziierten Stroma teilweise sehr stark und diffus PAI-1 mRNA exprimiert wird, vor allem in Gelbkörpernarben, dem sie umgebenden Stroma oder auch im normalen Stroma von Adenomen (hier auch v.a. in direkter

Nachbarschaft von Zysten) und Karzinomen. Dies könnte den in anderen Studien belegten hohen Gehalt an Proteinen erklären, würde damit aber auch zur Messung von nicht tumorspezifisch hohen Mengen an PAI-1 führen. Durch eine ausschließliche Untersuchung auf die vorhandene Proteinmenge eines Tumors kann damit keine absolute Aussage über die Zunahme von uPA, PAI-1 und / oder uPAR im tumorassoziierten Stroma gemacht werden. Die gesteigerte Proteinproduktion als Ausdruck eines zunehmenden Entdifferenzierungsgrades scheint von mehreren Faktoren abhängig zu sein, wie später noch erläutert werden wird.

In der Gruppe der Adenome befanden sich bis auf eine Ausnahme ausschließlich Zystadenome oder Zystadenofibrome. Das einzige Adenofibrom hatte nur fokal und schwach PAI-1 im tumorassoziierten Stroma exprimiert. Auch im einzigen nicht tumorös (sondern nur zystisch) veränderten Ovar ließen sich starke Signale über Stromazellen und auch Endothelzellen an mehreren Stellen beobachten. Daraufhin stellten wir uns die Frage, ob es durch die Zystenentwicklung und damit -vergrößerung und die daraus folgende Druckzunahme auf das umgebende Normalstroma zu einer vermehrten Produktion von PAI-1 gekommen sein könnte. In einer Untersuchung des Plasminogenaktivatorsystems bei Frauen mit polyzystischen Ovarien wurde ein fast doppelt so hoher PAI-1-Gehalt im venösen Blut der betroffenen Frauen im Vergleich zu gesunden Testpersonen festgestellt (Atiomo et al. 1998). Ob allerdings durch die zystische Veränderung der betreffenden Ovarien (und damit die Druckerhöhung als vermutete Ursache) die vermehrte Produktion von PAI-1 begründet ist, oder ob mit der Erkrankung an sich eine erhöhte Plasminogen-Aktivität einhergeht, blieb unklar. Zwei Jahre später untersuchten Atiomo et al (2000) in einer weiteren Arbeit Ovarialfollikel von Patientinnen mit polyzystischen Ovarien (PCOS) und gesunden Probandinnen mittels Immunhistochemie auf die Lokalisation von PAI-1. Hierbei konnten die Autoren keinen Unterschied der Signale in polyzystischen und normalen Ovarien feststellen.

5.2. Expression von uPA

Bei der Untersuchung der Präparate auf uPA-mRNA konnte gezeigt werden, dass die Signalintensität in den Stroma- und Tumorzellen bösartiger Tumoren ausgeprägter war als in den gutartigen Fällen ($p < 0,001$).

Dies deckt sich wiederum mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, wonach der Proteingehalt und/oder die Intensität der immunhistochemischen Färbung mit zunehmender Entdifferenzierung von Adenomen zu Karzinomen zunehmen (Pujade-Lauraine et al. 1993; Schmalfeldt et al. 1995; van der Burg et al. 1996; Kuhn et al. 1999; Schmalfeldt et al. 2001)

Die Ergebnisse innerhalb unseres malignen Tumorkollektivs waren jedoch recht inhomogen. Während in anderen Studien festgestellt wurde, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen Grading, FIGO-Stadium (Kuhn, Schmalfeldt et al. 1999) und der Stärke der uPA-Expression besteht (Pujade-Lauraine et al. 1993), war dies in der vorliegenden Arbeit nicht zu bestätigen.

Außerdem lag eine stark unterschiedliche Fallverteilung innerhalb der einzelnen Gruppen vor: Die Gruppe der serösen Karzinome war am größten, die anderen fielen dagegen kaum ins Gewicht und sind damit nur eingeschränkt vergleichbar. Die undifferenzierten Tumoren stellten deutlich über die Hälfte der Fälle dar, was einen direkten Vergleich innerhalb der unterschiedlichen Differenzierungsgrade erschwert. Die malignen Tumoren exprimierten uPA in der Mehrzahl der Fälle (36/45), und es konnte eine erhöhte mRNA-Expression sowohl in Stroma- als auch in Tumorzellen festgestellt werden (31 vs 20). Es ergab sich aber keine Zunahme der Expressionsstärke oder -verteilung mit abnehmendem Differenzierungsgrad, wie sie Borgfeldt et al. 2001 postuliert hatten. Bezüglich des Zusammenhangs zwischen FIGO-Stadium und der Intensität / Verteilung konnte lediglich ein Trend hinsichtlich einer Zunahme der Verteilung von PAI-1-spezifischen Signalen über Zellen des Tumorstromas mit steigendem FIGO-Stadium beobachtet werden ($p=0,06$). Es wurden zwar etwa gleich viele FIGO I- wie III-Fälle (20 bzw. 22), jedoch hingegen nur zwei FIGO II-Vertreter untersucht.

Insgesamt neun Karzinome zeigten keinerlei Signale über Stroma- und Tumorzellen, interessanterweise handelte es sich hierbei überwiegend um schlecht differenzierte Fälle, darunter eine ovarielle Metastase eines Mammakarzinoms und um einen Klarzell-Tumor. Die daraufhin analysierte Expression von uPA in Gefäßendothelzellen brachte folgendes Ergebnis: Alle neun Tumoren waren komplett negativ für uPA, d.h. selbst in den blutgefäßreichen Tumorarealen und den assoziierten Gefäßendothelien waren keinerlei Signale zu detektieren.

Casslén et al. postulierten 1994 in ihrer Untersuchung des uPA-Gehalts in Zystenflüssigkeit und Tumorblut, dass uPA eher von Zellen des Tumorgewebes als in Blutgefäßendothelien des Tumors produziert wird. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen, dass auch bei uPA-positiven Fällen zwar zum Teil perivaskulär, aber nicht explizit endothelial uPA-spezifische Signale nachzuweisen sind.

Alle Adenome waren sowohl in den Stroma- als auch den Tumorzellen uPA-negativ. Dies ist erstaunlich, da, wie bereits beschrieben, in den bisher zitierten Untersuchungen z.B von Kuhn, Schmalfeldt u.a für Adenome kein vollständiges Fehlen von uPA festgestellt worden ist. Auch Borgfeldt et al. fanden 2001 mit der in situ-Hybridisierung Signale über den Epithelzellen sowohl benigner als auch Borderline- und gut differenzierter Tumoren. Wir konnten dies lediglich im malignen Tumorkollektiv ohne Präferenz eines bestimmten Differenzierungsgrades nachweisen.

Außerdem unterliegen auch die nicht bösartigen Tumoren den physiologischen Einflüssen, wie sie später noch dargestellt werden. Deshalb bleibt unklar, weshalb spezifische Signale in fast allen benignen Fällen fehlten.

Ein lediglich zystisch verändertes Ovar zeigte ebenfalls keinerlei uPA-Signale, nur in einem muzinösen gut differenzierten Karzinom waren im vorliegenden Präparat, das in dieser Schnittebene keinen Tumoranteil aufwies, sowohl einzelne Stromazellen als auch Gefäßendothelien schwach positiv. Dies betont den deutlichen Unterschied in der Signalexpression zwischen gut-und bösartigen Tumoren des Ovars.

5.3. uPA-Rezeptor-Signale

Die Intensität und -verteilung der uPA-Rezeptorsignale korrelierten über Tumorzellen eindeutig mit abnehmendem Differenzierungsgrad ($p=0,01$ bzw. $p=0,007$). Für die Stromazellen ließ sich dies nicht bestätigen.

Außerdem bestand eine deutliche Abhängigkeit der Signalstärke und -verteilung über Stroma- und Tumorzellen von der Tumordignität (p jeweils $<0,001$). Damit wird die u.a. von Schmalfeldt et al. 1995, Kuhn et al. 1999 und Borgfeldt 2001 beobachtete Steigerung der Proteinmenge von uPAR auch auf Transkriptionsebene bestätigt.

Hierbei gab es lediglich zwei bösartige Fälle, die weder über Stroma- noch über Tumorzellen uPAR spezifische Signale zeigten. Beides waren gut differenzierte Tumoren, wobei einer PAI-1 nur in Stromazellen und der andere PAI-1 und uPA ebenfalls nur in Stromazellen exprimiert hatten. Die Expression von uPAR in Endothelzellen der anderen malignen uPAR-positiven Fälle war ebenfalls nicht feststellbar, wobei in allen Fällen zur Bewertung das tumorassoziierte Stroma zugrunde gelegt wurde. Bei den benignen Tumoren ließ sich nur in einem Fall eine schwache, aber multifokale Expression von uPAR über tumorassoziierten Stromazellen feststellen, dabei auch über einzelnen Gefäßendothelzellen. Dieses Präparat war außer einem Fibrom der einzige gutartige Fall, der auch schwache Tumorzellsignale zeigte. Aufgrund der Ergebnisse im malignen Tumormaterial ließe sich nun vermuten, dass es möglicherweise im weiteren Verlauf zu einer histologisch

sichtbaren Invasivität gekommen wäre. Der tumorfreie Schnitt des bereits bei der Interpretation der uPA Expression beschriebenen muzinösen gut differenzierten Karzinoms hatte an mehreren Stellen - um Gelbkörpernarben, Gefäßendothelzellen und dem perivaskulären Stroma - mittelstark uPAR exprimiert, was diese Vermutung erhärten würde.

Das erwähnte Fibrom zeigte ebenfalls schwache Signale über einzelnen Tumorzellen - da aber nur noch ein weiteres Fibrom zum Vergleich zur Verfügung stand, kann eine Interpretation dieses Befundes in Hinblick auf die Potenz für eine mögliche maligne Entartung nicht erfolgen.

5.4. Hormonelle Beeinflussung der Expression von Komponenten des Plasminogen-Aktivatorsystems

Bei der Interpretation der Befunde der vorliegenden Arbeit kommt erschwerend hinzu, dass sowohl der Hormonstatus der Patientinnen, ihr prä-, peri-oder postmenopausaler Status als auch, im Falle von prämenopausalen Patientinnen, deren prä-oder postovulatorische Zyklusphase nicht in die Bewertungen eingegangen sind. Liu und Feng fanden bereits 1992 durch Untersuchung von Ratten-Ovarialzellen heraus, dass die Produktion von uPA, t-PA und PAI-1 bzw. ihre u.a. durch Gonadotropine koordinierte Genexpression die Voraussetzung für Follikelwachstum und-ruptur ist. Dies wäre für die Bewertung von Präparaten prämenopausaler Frauen durchaus eine wichtige Zusatzinformation, denn wie Li et al. 1997 im Tierexperiment nachwies, besteht darin auch einer der möglichen Gründe für Unterschiede in der Expression von uPA-, PAI-1- und uPAR-mRNA: Innerhalb eines normalen Zyklus kommt es unter Beteiligung von uPA zu einer Degradation der extrazellulären Matrix während der Zellproliferation und -migration, die mit dem Follikelwachstum einhergeht. Damit wurden die in dieser Studie festgestellten hohen uPA-Protein- und Transkriptmengen im Frühstadium des Follikelwachstums und die bis zum erwarteten Ovulationszeitpunkt stark abfallenden Werte begründet. Im Gegensatz dazu war für PAI-1 und uPAR genau das Gegenteil festzustellen, was für die Regulation der präovulatorischen Wiederherstellung der extrazellulären Matrix (ECM) wichtig zu sein scheint. Auch Liu unterstrich 1999 die Bedeutung einer koordinierten Expression von uPA und PAI-1 in Follikeln der frühen Zyklusphase für die ECM-Degradation. Ebenso wichtig ist die Modulation der proteolytischen tPA-Aktivität durch PAI-1 im Hinblick auf eine kontrollierte und zielgerichtete Proteolyse bei der Ovulation (Liu 1999).

Zu erwähnen ist darüber hinaus, dass sowohl der Anstieg der tPA und PAI-1-Expression in Corpora lutea der Spätphase des Zyklus als auch der Anstieg von uPA- mRNA im Frühstadium der Corpora lutea- Entwicklung durch den physiologischen abrupten Abfall der Progesteronproduktion bedingt zu sein scheinen (Liu 1999).

Bereits vor ca 21 Jahren wurde über eine östrogenabhängige PAI-Aktivitätssteigerung in Brusttumoren von Ratten in vivo und in Zellkultur berichtet (Yamashita et al. 1984). Noch länger zurück liegt die Erkenntnis, dass Östrogen die uPA-Aktivität im Rattenuterus erhöht (Katz et al. 1976; Kneifel et al. 1982; Peltz et al. 1983). Für Progesteron konnte festgestellt werden, dass es die durch Prolaktin geförderte Stimulierbarkeit der Plasminogenaktivität damals noch unbestimmten Typs in Explantaten von Mammatumoren der Ratte blockiert (Mira-y-Lopez 1983). Des Weiteren wiesen Casslen et al. 1995 an kultivierten endometrialen Stromazellen nach, dass Progesteron neben einer Stimulierung der uPA-Degradation eine gesteigerte PAI-1 und uPAR – Expression bewirkt.

Ovulationsabhängige Änderungen der Expression von tPA und PAI-1 in Ovarien nach Gonadotropin (gewonnen aus dem Serum schwangerer Stuten)- und folgender hCG-Stimulation (humanes Choriongonadotropin) führten bei Ratten zu einer Steigerung der PAI-1-Expression, hierbei vor allem in Stroma- und Theka externa-Zellen (Shen et al. 1997). Daraus folgerten die Autoren eine Beteiligung von PAI-1 beim Follikelwachstum, der Ovulation und Luteinisierung.

Es wurde also einerseits durch o.g. Erläuterungen gezeigt, dass eine Hormonabhängigkeit für die Aktivität von Plasminogenaktivatoren in steroidbeeinflussten Geweben besteht, andererseits muss nicht ausschließlich der Hormonstatus der Probandin für eine ausgeprägtere oder schwächere mRNA-Expression verantwortlich sein. Dies wären auch mögliche Erklärungen dafür, warum sich maligne und benigne Tumoren in der vorliegenden Arbeit nicht anhand ihrer PAI-1-mRNA-Expression unterscheiden lassen.

Innerhalb der benignen Tumoren ließ sich eine PAI-1-Expression in Tumorzellen lediglich in den untersuchten fünf Fibromen feststellen. Die stärkste Expression war hier bei einer 30jährigen Patientin ausschließlich perivaskulär und in Endothelzellen zu beobachten. Aber auch die Präparate der anderen vier Patientinnen (79, 89, 58 und 61 Jahre alt und damit sicher post- bzw. perimenopausal) zeigten perivaskuläre PAI-1 spezifische Signale.

Für die in dieser Arbeit sicher prämenopausalen Patientinnen, deren Ovarialpräparate untersucht wurden, kann bzgl ihres Zyklusstadiums keine Aussage gemacht werden, und auch eine Zuordnung der anderen Patientinnen in prä-, post- oder perimenopausale Gruppen nur aufgrund von Altersangaben ist bis auf die eindeutig prä-oder postmenopausalen Patientinnen nicht möglich.

5.5. Hilus- und Sertolizellen und das Plasminogen-Aktivatorsystem

Unter den benignen Tumoren zeigte lediglich ein Adenom eine mittelstarke uPA-Expression, und zwar im nicht tumorassoziierten Stroma. Hier waren es bemerkenswerterweise Konglomerate von Hiluszellen, die an zwei Stellen auffielen. Der Zusammenhang von Hiluszellen und dem Plasminogenaktivatorsystem ist vor allem in der Fertilisationsforschung gut untersucht worden. Verfügbar war v.a. Literatur über andrologische Studien: Deutlich wurde die Hormonabhängigkeit (des Follikel-stimulierendem Hormons) der Plasminogenaktivität (uPA und uPAR) und-inhibition (PAI-1) in Sertoli- und Hiluszellen betont, die hier vor allem für den Prozess der Spermatogenese eine Rolle spielt und zyklischen Einflüssen unterworfen ist. Bereits 1986 wiesen Perrard-Sapori et al. in vitro nach, dass die gemeinsame Kultivierung von Sertoli- und Hiluszellen in Anwesenheit von humanem Choriogonadotropin (hCG) zu einem signifikanten Anstieg von FSH-Rezeptoren und damit FSH-induzierter Plasminogenaktivität führt. 1993 konnten Liu et al. u.a. feststellen, dass unter FSH- und cAMP-Einfluss Sertolizellen aus Mäusen v.a. tPA und Hiluszellen vor allem uPA produzieren. Zhang et al. fanden 1997 mittels in situ-Hybridisierung von Rhesusaffen Hoden heraus, dass Hiluszellen für sich allein keine Plasminogenaktivatoren exprimieren können, sondern nur in einer gemeinsamen Kultur mit Sertolizellen. Dies bestätigt die von Liu et al. 1996 postulierte These (aufgrund von in vitro-Untersuchungen an Sertoli- und Hiluszellen von Ratten), dass Sertolizellen wie auch die Granulosazellen des Ovars uPA (tPA und PAI-1) sezernieren können (siehe auch Johnson et al. 1997). Außerdem wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls auf die Interaktion zwischen Sertoli- und Hiluszellen hingewiesen, die für eine adäquate Antwort auf eine hormonelle Stimulation durch Gonadotropine essentiell ist.

Hiermit wird die Vielzahl der möglichen Einflüsse auf das Plasminogenaktivatorsystem und damit auf das Expressionsverhalten der hier untersuchten Ovarialtumoren deutlich.

5.6. Kritische Betrachtung der in situ Hybridisierung

Wie bisher dargestellt, lassen sich nicht alle Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit eindeutig interpretieren. Zum einen liegt dies sicher an der stark differierenden Anzahl der pro Tumortyp untersuchten Fälle.

Zum anderen können die zum Teil sogar widersprüchlichen Ergebnisse darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den Schnitten der untersuchten Tumoren nur um eine Art Momentaufnahme des zum Zeitpunkt der Entnahme noch vitalen Gewebes handelt. Mit der in der vorliegenden Arbeit angewandten in-situ-Hybridisierung kann lediglich die RNA-Menge, die zum Zeitpunkt der Untersuchung (im mittlerweile avitalen Tumorgewebe) noch angehäuft vorliegt, im Schnitt

dargestellt werden. Damit wird jedoch, wie ich später noch erläutern werde, den vielfältigen zellulären Interaktions- und Signaltransduktionsvorgängen, die in einem Tumor ablaufen und zum Zeitpunkt der Untersuchung noch kein morphologisches Korrelat zeigen, nicht Rechnung getragen. Die Schnittebene des Präparates spielt ebenfalls eine maßgebliche Rolle bei der Bewertung. Es müssten zur sicheren Beurteilung der Tumoren mehrere Schnitte pro Fall hybridisiert werden, da wir nicht davon ausgehen können, mit einem einzigen Schnitt die repräsentative Ebene des Präparates getroffen zu haben. Hier möchte ich den Begriff des „adäquaten Samplings“ nennen, den Seidman et al. 2000 in ihre kritische Übersichtsarbeit bzgl der Untersuchung von serösen Borderline-Tumoren einbrachten. In dieser Arbeit schlugen die Autoren eine standardisierte Anzahl von Schnitten pro Präparat vor, um die jeweiligen Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können.

Hierin liegt also eine der Schwachstellen der in situ Hybridisierung an lediglich einem Schnitt pro Fall, und es wäre eine Kopplung mit dem Nachweis der uPA/uPAR- oder PAI-1-Antigenmengen im Tumorzytosol durch ELISA zur Bewertung des gesamten Tumorpräparates von Vorteil.

5.7. Die Bedeutung des Plasminogen-Aktivatorsystems für physiologische und tumorbiologische Prozesse

Auch in normalen Geweben spielen die durch uPA, seinem Rezeptor sowie seinem Inhibitor PAI-1 vermittelten Vorgänge extrazellulärer Proteolyse eine Rolle. Dies ist schon länger z.B. für die Angiogenese (Pepper-MS et al. 1991, Rifkin-DB et al. 1990), die Wundheilung (Grondahl-Hansen et al. 1988; Pepper et al. 1987 und 1992; del Rosso et al. 1990), die Trophoblastenimplantation und Gametogenese (Sappino et al. 1989) bekannt. Auch in den zyklischen Umbauvorgängen des Ovars sind Proteolyse und Wiederherstellung der Extrazellulärmatrix (Liu et al. 1999) wichtige Voraussetzungen für den koordinierten Ablauf der Ovulation. Entscheidend ist der Unterschied in der Regulation dieser Vorgänge in normalen und malignen Zellen und Zellverbänden. Wie bereits eingangs beschrieben, ist die Transformation von normalem Gewebe in einen benignen oder malignen Tumor ein sehr komplexer Vorgang, und genauso sind sein Wachstum, seine Vaskularisierung und Metastasierung das Ergebnis von bisher nur unvollständig erforschten Signalwegen zwischen Tumor- und Stromazellen. Vor allem in Karzinomzellen wird viel uPA gebildet, um eine gewisse Mobilität dieser Zellen im Hinblick auf mögliche Invasion und Metastasierung zu erzielen. Die Synthese von uPA und seinem Rezeptor spielen also eine wichtige Rolle bezüglich des invasiven Potentials der entarteten Zellen (Blasi 1993). Das uPA-System ist auch an der von Krebszellen gesteuerten Wiederherstellung von Gewebestrukturen beteiligt, die

durch seine Wirkung zuvor lysiert wurden (Andreasen et al. 2000). Inzwischen ist auch die bislang unklare Rolle von PAI-1 bei der Tumorinvasion und-metastasierung beleuchtet worden. Grob vereinfacht ausgedrückt, wurde zunächst postuliert, dass uPA das Tumorwachstum fördert und PAI-1 dasselbe hemmt. Neuere Studien belegen jedoch, dass ein hoher PAI-1-Gehalt überraschenderweise mit einer schlechteren Prognose für die betroffenen TumorpatientInnen einhergeht (beispielsweise für Lungenkarzinome: Pedersen et al. 1994 a und b; für das Ovarialkarzinom: Chambers-S. et al. 1998; Kuhn et al. 1999). PAI-1 reguliert nicht nur die proteolytische Aktivität von uPA, sondern bestimmt auch die Menge an uPA, die an den uPA-Rezeptor gebunden wird, um eine Optimierung der Proteolyse bei der Tumorinvasion und Metastasierung zu erzielen (Conese und Blasi 1995, Blasi 1997). Die Plasmin-vermittelte Proteolyse ist zwar für das Tumorwachstum von entscheidender Wichtigkeit - vor allem aber während der Genese der Tumorgefäße scheint eine Kontrolle der Vorgänge durch PAI-1 für die Gefäßstabilisierung und -reifung unabdingbar zu sein (Bajou et al. 2001).

5.8. Die vielschichtige Rolle der Stromazellen

Aber nicht nur die epithelialen Zellen, sondern auch die Stromazellen spielen für das Tumorwachstum und seine Metastasierung eine wichtige Rolle. So konnte von Pyke et al. (1991 a und b) in Adenokarzinomen des Kolons nachgewiesen werden, dass uPA auch von Stromazellen exprimiert wird und dass eine Kommunikation zwischen Stroma- und Tumorzellen die Voraussetzung für das invasive Wachstum darstellt. In Tumoren können also nicht nur die Tumorzellen selbst an den Invasionsprozessen beteiligt sein, sondern auch die mehr oder weniger direkt benachbarten Stromazellen - hierbei vor allem durch ihre Bereitstellung von Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems zur Proteolyse und Wiederherstellung der ECM (Andreasen et al. 1997). Borgfeldt et al. fanden 1998 eine fast nur in Stromazellen des Ovars lokalisierte uPA-mRNA Expression, was sie auf die Stromazellen als Hauptproduktionsort für uPA schließen ließ. Eine neuere Studie belegt ebenfalls die Bedeutung von nicht direkt am Invasionsort des Tumors befindlichen Stromazellen für das Tumorwachstum (u.a.) in Ovarialkarzinomen. Die Stromazellen werden durch stromal-epitheliale Zellinteraktion vom sich entwickelnden Tumor rekrutiert, damit sie den Tumor ihrerseits invadieren und sein Wachstum unterstützen. So werden die Stromazellen zum Tumorstroma (Parrott et al. 2001).

5.9. Epitheliale mesenchymale Transition

Es wird auch in Zukunft sehr interessant sein, das Stroma der Tumoren näher zu untersuchen. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang die epitheliale mesenchymale Transition, die eine zentrale Rolle spielt. Gerade im Stroma finden sowohl vielschichtige Zellinteraktionen zwischen Tumor- und Stromazellen als auch Umwandlungsprozesse statt, was im Folgenden näher erläutert werden soll: Birchmeier et al. beschrieben 1996 einen komplexen Mechanismus, durch den epitheliale Zellen eine Konversion zu Zellen mesenchymalen Charakters durchmachen: Zunächst wird die Integrität des epithelialen Zellverbandes (vermittelt durch E-Cadherine, die die Zelladhäsion der epithelialen Zellen regulieren) des Tumorgewebes aufgelöst. Entweder werden hierfür die Catenine (Proteine, die mit dem zytoplasmatischen Anteil der E-Cadherine interagieren) mittels einer Tyrosinkinase unkontrolliert phosphoryliert, es kommt zu einer (oder mehreren) Mutation(en) des E-Cadherin- oder Cateningens, oder auf Transkriptions-Ebene kommt es zu einer Repression der E-Cadherin- Expression. Dies führt zu einer verstärkten Expression von uPA, wie Frixen und Nagamine bereits 1993 anhand der Hemmung der E-Cadherin-Funktion *in vitro* nachweisen konnten.

Die epitheliale mesenchymale Transition kommt aber auch physiologischerweise in der menschlichen Entwicklung vor, z.B. während der Bildung der mesodermalen Gewebe. Dort laufen diese Vorgänge jedoch zeitlich und örtlich begrenzt ab (Hay 1995). Kontrolliert werden sie durch die Tyrosinkinase-Aktivität bzw. durch die geregelte Bereitstellung von Tyrosinkinaserzeptoren [wie c-Ros, c-Met, c-Neu, c-Ret oder KGF (Keratinocyte Growth Factor)- Rezeptor] v.a. auf epithelialen Zellen, was im Falle einer malignen Entartung nicht mehr der Fall ist (Aaronson 1991). Diese Erkenntnisse haben der Krebsbehandlung einige interessante Möglichkeiten eröffnet. In der internistischen Onkologie werden derzeit vermehrt Tyrosinkinase-Inhibitoren angewendet, hierbei mit vielversprechenden Ergebnissen vor allem bei gastro-intestinalen Stromatumoren (GISTs) oder der chronisch-myeloischen Leukämie (Hochhaus et al. 2001). Die Tyrosinkinaserzeptoren brauchen Liganden zu ihrer Aktivierung, z.B. HGF (Hepatocyte Growth Factor) - bzw. SF/HGF (Surface Factor), EGF (Epithelial Growth Factor) oder TGF- β (Transforming Growth Factor). Plasmin und uPA (in an uPAR gebundener Form) sind in die proteolytische Aktivierung dieser Wachstumsfaktoren eingebunden, und genauso kann auch die Plasmin-katalysierte ECM-Degradation eine intrazelluläre Signalkaskade durch Veränderung der Zelladhäsion (s.o.) in Gang setzen. Die so aktivierten Wachstumsfaktoren können nun ihrerseits u.a. die Expression von PAI-1 (Sato et al. 1990; Odekon et al. 1994) oder uPA/uPAR der Zelle regulieren und ihre Motilität beeinflussen (Pepper et al. 1992), was wiederum zu einer Steigerung der Invasivität führen kann.

Die invadierenden Zellen verlieren dann ihr epitheliales Erscheinungsbild und nehmen eine spindelförmige, fibroblastenähnliche Gestalt an (Behrens et al. 1989; Birchmeier et al. 1996).

In verschiedenen malignen epithelialen Tumoren wurde eine Verringerung oder gar ein Fehlen der E-Cadherin-Expression nachgewiesen, z.B. in lobulären (nicht aber duktalem) Mammakarzinomen (Moll et al. 1993; Gamallo et al. 1993), kolorektalen Karzinomen (Dorudi et al. 1993; Kinsella et al. 1993) oder auch Prostata- und Blasen-Karzinomen (Bringuir et al. 1994; Otto et al. 1994).

Der Verlust der epithelialen Morphologie korreliert in einigen Tumoren mit einer schlechten Prognose (Birchmeier et al. 1996).

Aus dem bisher Gesagten lässt sich ableiten, dass epitheliale Tumorzellen durch die beschriebenen Mechanismen mesenchymalen Charakter annehmen können. Die Folge ist, dass im histologischen Bild anhand der Zellform die Zugehörigkeit zum Tumor oder Stroma nicht eindeutig zu erkennen ist. Denn zum einen sind die Zellen mobil - sie können in das Stroma migrieren, zum anderen ist gerade in den Tumorrandgebieten, die in das Stroma übergehen, eine eindeutige Unterscheidung zwischen Tumor- und Stromazelle nicht mehr möglich. Dies ist ein weiterer Punkt, der bei der Interpretation der Lokalisation von Signalen in der in situ-Hybridisierung berücksichtigt werden muss.

5.10. Unterschiedliche Lokalisation von Signalen. Ergebnisse bei verschiedenen Tumoren mittels unterschiedlicher Untersuchungsmethoden

Unterschiedliche Methoden zum Nachweis von Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems führten bisher zu nicht einheitlichen Ergebnissen. Schon Andreasen et al. (1997) wiesen in ihrem Reviewartikel über die Rolle des uPA-Systems in der Metastasierung darauf hin, dass sich kein einfaches Metastasierungs- und Invasionsmodell aus den verschiedenen Ergebnissen ableiten lässt. Verschiedene Arbeitsgruppen erzielten bei ihren Untersuchungen innerhalb der gleichen Tumortypen (wie z.B. Lungenkarzinom, Adenokarzinom des Kolons oder Mammakarzinom) mittels immunhistochemischer Färbung verschiedene Ergebnisse: Skriver et al. beschrieben 1984 für das Lewis-Lungenkarzinom, dass uPA nur in Tumorzellen nachzuweisen war. Ebenfalls in Lewis-Lungenkarzinomen fanden Kristensen et al. 1990 nur in Tumorzellen PAI-1. UPAR wurde sowohl in Tumorzellen als auch Makrophagen und Mastzellen von Mammakarzinomen (Christensen et al. 1996) oder nur in Tumorzellen und Fibroblasten (Carriero et al. 1994) gefunden. Die Untersuchung des Plasminogenaktivator- bzw. Inhibitorgehalts in Tumoren kann hohe Werte ergeben, die nicht tumorspezifisch sind. So sind z.B. Thrombozyten reich an PAI-1, und in einer Gewebesuspension eines gut vaskularisierten Tumors kann nicht mehr festgestellt werden, ob PAI-

1 nun aus den in Gefäßen enthaltenen Thrombozyten oder den Tumorzellen stammt (Andreasen et al. 1990). Auch wenn die in diesen Zellen gebildeten Komponenten ursächlich mit dem Tumor in Zusammenhang stehen, ist nicht zuletzt auch die Tumorzellmasse ein entscheidender Faktor bei der Messung des Proteingehalts. Maligne Tumoren haben häufig eine größere Zellmasse als benigne, genauso wie besser differenzierte eher aus weniger Zellen bestehen als schlecht differenzierte Karzinome. So werden auch hier die Ergebnisse in gewisser Hinsicht ein Ausdruck der Zellmassenverhältnisse sein (Andreasen et al. 1997).

Auch für die in -situ- Hybridisierung gibt es eine Reihe widersprüchlicher Ergebnisse.

So wurde z.B. die uPA-mRNA-Expression von Mammakarzinomen in Tumorzellen und Fibroblasten beobachtet (Escot et al. 1996), wohingegen die Gruppe um Nielsen (1996) die Signale über Myofibroblasten fand. In Adenokarzinomen des Kolons fanden Delbaldo et al. (1995) uPA- und uPAR-mRNA nur über Entzündungs- und nicht über Krebszellen, wohingegen Naitoh et al. (1995) uPA-mRNA über Krebszellen und Myofibroblasten feststellten.

Borgfeldt et al. fanden in schlecht differenzierten Ovarialkarzinomen die Signale überwiegend in Stromazellen und kaum in Tumorzellen, wohingegen in gutartigen und gut differenzierten Tumoren die Signale hauptsächlich in den epithelialen Zellen zu detektieren waren (1998). In der vorliegenden Arbeit konnten wir keine uPA - Expression in Tumorzellen der gutartigen Tumoren entdecken. Die uPA-spezifischen Signale waren über Stromazellen der malignen Tumoren (31/45) häufiger vorzufinden als über Tumorzellen (21/45). Dieser beobachtete Trend steht in Einklang mit den Ergebnissen von Borgfeldt, jedoch ließ sich in unserer Arbeit kein Einfluss des Differenzierungsgrades auf die Expressionsstärke von uPA feststellen.

All diese scheinbar widersprüchlichen Aussagen spiegeln die Komplexität dieses Themas wider. So sind z.B. im Falle des uPA und PAI-1- Proteinnachweises durch immunhistochemische Färbung verschiedene Lokalisationen möglich: In den produzierenden Zellen, an den Bindungsorten und während / nach der Endozytose durch andere Zellen (Andreasen et al. 1997). Auch der bevorzugte Nachweis von mRNA über Tumor- und/oder Stromazellen (Borgfeldt 2001) ist ein Ausdruck der vielschichtigen Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen mit dem Ziel der optimalen Tumorausbreitung. Andreasen et al. betonten 1997 außerdem, dass die Detektion von Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems an bestimmten Stellen im Tumor, entweder mit immunhistochemischen Methoden oder der in-situ-Hybridisierung, noch nichts über die Aktivität dieser Komponenten aussagt. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass man mit immunhistochemischen Untersuchungsmethoden nicht den primären Bildungsort der gesuchten Proteine darstellen kann, sondern lediglich Hinweise auf die Lokalisation zum jeweiligen

Untersuchungszeitpunkt. Dagegen lassen sich mit der in-situ-Hybridisierung Aussagen über den primären Synthesort im Gewebe (Tumor- oder Stromazellen) treffen.

5.11. Schlussfolgerung

Aus den bisher genannten Studien geht hervor, dass die uPA-, uPAR- und PAI-1- Antigenmengen prognostische Signifikanz für verschiedene Tumoren haben. Hierbei ist zur verlässlichen Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch ein standardisiertes Vorgehen zur Aufbereitung und Konservierung des Tumorgewebes notwendig (Van der Burg 1996).

Außerdem ist zur Optimierung der Ergebnisse eine Kopplung verschiedener Methoden vorzuschlagen: Erstens die Antigenmengenbestimmung im Tumor mittels ELISA im Zytosol homogener Tumoren, zweitens die Feststellung des primären Synthesortes und der Signalintensität über bestimmten Zellen des Präparats durch in situ-Hybridisierung und drittens die Bestimmung der exprimierten epithelialen und/oder mesenchymalen Antigene durch immunzytochemische Untersuchungen - am besten mittels eines Antikörpersets, das den Aspekt der epithelialen mesenchymalen Transition und auch das hierbei veränderte Expressionsverhalten der Zellen berücksichtigt.

Zum zweiten Punkt lässt sich sagen, dass die in situ-Hybridisierung, die wir mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt haben, für die Routineuntersuchungen sowohl zeitlich als auch technisch viel zu aufwändig ist. Sie ist für wissenschaftliche Zwecke eine sehr sensitive Methode, jedoch für den klinischen Alltag nicht geeignet. Hierfür steht mittlerweile die nicht radioaktive in situ-Hybridisierung zur Verfügung, die schneller, weniger aufwändig und darüber hinaus für das Personal nicht radioaktiv belastend ist.

Mit der Kopplung der vorgeschlagenen Untersuchungsmethoden würde dem komplexen Geschehen in Tumorgeweben am ehesten Rechnung getragen. Auf jeden Fall sollten die Tumorzellen und ihr Expressionsverhalten nicht allein und losgelöst vom Gewebezellverband betrachtet werden, sondern vielmehr in Bezug zu den beteiligten Stromazellen im Tumor untersucht und interpretiert werden.

5.12. Vorschläge zur Optimierung der Untersuchung

Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, muss den vielschichtigen Vorgängen während des Tumorwachstums Rechnung getragen werden. Das bedeutet im Falle der vorliegenden Arbeit, dass zur sicheren Interpretation noch zusätzliche Untersuchungen der Präparate z.B. auf Expression von Zytokeratinen (als epitheliale Marker) hilfreich gewesen wären, welche auch Borgfeldt 1998 zur

Unterscheidung der Stromalen und epithelialen Zellen durchgeführt hatte. Doch selbst dann ist das Ergebnis nicht immer eindeutig. Die morphologisch veränderten - eigentlich epithelialen Zellen - scheinen auch ihre Fähigkeiten zur spezifischen Proteinproduktion nach und nach verändern zu können. Es ist bekannt, dass im Zuge der EMT beispielsweise die Zytokeratinexpression der epithelialen Zellen verloren geht, aber auch, dass dafür Vimentin -als eigentlich mesenchymales Markerantigen -von ihnen produziert werden kann.

Um die Zellen eines Tumors histologisch eindeutig den Stroma - oder Tumorzellen zuordnen zu können, müsste der zu untersuchende Schnitt mit einer Serie von verschiedenen Antikörpern inkubiert werden, um dadurch möglichst viele Hinweise auf die mesenchymale oder epitheliale Herkunft der Zellen zu gewinnen.

6. Zusammenfassung:

Es gibt schon lange Hinweise dafür, dass das Plasminogenaktivatorsystem eine bedeutende Rolle beim Tumorwachstum und der Metastasierung spielt. Bisher wurden eine Reihe verschiedener Tumorarten untersucht und dabei wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der zellulären Vorgänge, die zu einer sowohl lokalen als auch organübergreifenden Ausbreitung führen, gewonnen.

Nach wie vor scheint jedoch unklar, inwieweit die verschiedenen Zellarten innerhalb des Tumors (die eigentlichen Tumor-, die tumorassoziierten Stroma- und die zum nichttumorösen Stroma zählenden Zellen) an der Bildung der Stoffe beteiligt sind, die diese Vorgänge steuern oder zumindest beeinflussen können. Weiter wäre zu klären, welche Zellen vor allem für deren Produktion verantwortlich sind. Bisher konnten durch die angewandten Methoden, wie z.B. Immunhistochemie oder in situ-Hybridisierung, keine eindeutigen Aussagen über die Herkunft der untersuchten mRNA und Proteine gemacht werden.

Mittels der RNA- RNA- in situ Hybridisierung untersuchten wir die Expression von Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems in 45 Karzinomen und 25 Adenomen. Dabei setzte sich das Untersuchungsmaterial wie folgt zusammen: Bei den Karzinomen wurden 25 seröse, neun muzinöse, vier endometrioid, zwei mischdifferenzierte, zwei Krukenberg-, ein Klarzelltumor und zwei als G III-Tumoren klassifizierte Ovarialmetastasen anderer Herkunft untersucht. Bei den Adenomen rekrutierte sich das Material aus 18 serösen und zwei muzinösen Adenomen und fünf Fibromen.

In Abhängigkeit vom **Differenzierungsgrad** ($G I < G II < G III$) fanden wir für die malignen Tumoren eine Zunahme der *PAI-1* - Signalintensität über tumorassoziierten Stromazellen mit einem p von 0,043.

Die *uPAR* – Signale waren über den Tumorzellen der weniger differenzierten Tumoren stärker als in den gut differenzierten ($p = 0,014$).

Außerdem ließ sich in Tumorzellen eine ausgedehntere Verteilung der Signale beobachten ($p = 0,007$).

Bei der Untersuchung auf eine mögliche Beziehung zwischen **FIGO-Stadium**, **histologischem Tumorsubtyp** und Signalverteilung und - intensität fanden wir für keinen der verwendeten Marker (*uPA*, *uPAR* oder *PAI-1*) eine Abhängigkeit, weder in Stroma – noch in Tumorzellen. Dieses

Ergebnis ist allerdings im Hinblick auf die inhomogene Gruppengröße innerhalb der einzelnen Stadien und Typen der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt aussagekräftig.

Für die Signalintensität und – verteilung im Zusammenhang mit der **Tumordignität** ließen sich für die Karzinome in Stroma- und Tumorzellen eindeutig stärkere und im Schnitt ausgedehnter verteilte *uPA*- und *uPAR* - Signale als für Adenome und Fibrome feststellen (p jeweils $< 0,001$).

In Adenomen konnten wir keinerlei Signale im tumorassoziierten Stroma oder den Tumorzellen beobachten.

Ebenso war der Anteil der *uPA* - negativen G III- Karzinome höher als der der negativen G I- und G II- Tumoren. Wir konnten damit die in vorherigen Studien beschriebene Zunahme der *uPA* – Expression mit zunehmender Entdifferenzierung nicht bestätigen.

Darüber hinaus fanden wir deutliche Hinweise dafür, dass die Produktion von Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems sich nicht nur im tumorassoziierten Stroma abspielt. Wir fanden sowohl in gut- als auch bösartigen Tumoren starke und auch diffus verteilte Signale über Corpora albicantia, dem sie umgebenden Stroma, in Gefäßendothel – und perivaskulären Stromazellen und in zwei Fällen auch in Hiluszell-Konglomeraten für alle drei Ribosonden.

Dies bestätigt zumindest teilweise den bisher postulierten Zusammenhang zwischen der Menge an exprimierter RNA und dem biologischen Verhalten eines Tumors.

Andererseits wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Produktion von Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems noch von weiteren, in den bisherigen Studien vernachlässigten, Faktoren beeinflusst werden kann. Zu nennen sind hier z.B. der hormonelle Status der Patientin und ihre Zyklusphase zum Zeitpunkt der Tumorentnahme. Um diesen Faktoren Rechnung zu tragen, wäre also eine diesbezügliche weitere Einteilung des Gewebematerials angebracht.

Bisher ist es für das Ovarialkarzinom noch nicht möglich, anhand von Messungen des *uPA*-, *uPAR*- und *PAI-1*-Antigengehalts im Zytosol verlässliche prognostische Aussagen zu machen. Dies macht die adäquate und individuelle Therapiefestlegung und Risikoeinschätzung für die betroffenen Patientinnen nach wie vor unbefriedigend. Für das Mammakarzinom sind diesbezügliche Untersuchungen bereits fest etabliert (Harbeck, Jänicke et al. 2002). Zur Nutzung dieser Erkenntnisse für das Ovarialkarzinom sind jedoch noch weiterführende Untersuchungen notwendig. Es wird in diesem Zusammenhang auch in Zukunft sehr interessant sein, der Rolle der Stromazellen in Bezug auf die Expression von Genen, die für regulatorisch wichtige Proteine kodieren, weiter nachzugehen.

7. Bibliografie

Aaronson-S. (1991) Growth factors and cancer. *Science* 254, 1146-53

Andreasen-P, Georg-B. et al. (1990) Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Molecular and Cellular endocrinology* 68, 1-19

Andreasen-P.,Kjoller-L. et al. (1997) The urokinase type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review . *Int.J of cancer* 72, 1-22

Andreasen-PA, Egelund-R et al. (2000) The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol. Life Sci* 57 (1), 25-40

Astedt-B., Holmberg-L. (1976) Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature* 261, 595-96

Atiomo-WU, Bates-SA et al. (1998) The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*69 (2), 236-41

Atiomo-WU, Hilton-D. et al. (2000) Immunohistochemical detection of plasminogen activator Inhibitor-1 in polycystic ovaries. *Gynecol. Endocrinol.* 14 (3), 162-68

Bajou-K., Masson-V. et al. (2001) The plasminogen Activator Inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin: Implications for antiangiogenic strategies. *J. Of cell biology* 152 (4), 777-84

Behrens-J, Mareel-M et al. (1989) Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 108, 2435-47

Bell DA, Scully RA (1994) Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases. *Cancer* 1994; 73: 1859-64

Berchuck-A, Rodriguez-GC et al. (1991) Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 164, 669-74

Blasi-F. (1993) Molecular mechanisms of protease-mediated tumor invasiveness. *J.of Surgical Oncology* 3, 21-23

Blasi-F. (1997) UPA, uPAR and PAI-1: Key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol. Today* 18 (9), 415-17

Birchmeier-C., Birchmeier-W. et al. (1996) Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta anatomica* 156, 217-226

Borgfeldt-C, Casslen-B et al. (1998) High tissue content of urokinase plasminogen activator (uPA) is associated with high stromal expression of uPA m-RNA in poorly differentiated serous ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 79 (6), 588-95

Borgfeldt-C., Hansson-S. et al. (2001) Dedifferentiation of serous ovarian cancer from cystic to solid tumors is associated with increased expression of mRNA for urokinase plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR) and its inhibitor (PAI-1) .*Int. J. Of cancer* 92, 497-502

Bringuir-P, Umbas-R et al. (1994) Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res.*53, 3241-45

Carriero-MV et al. (1994) Tissue distribution of soluble and receptor-bound urokinase in human breast cancer using a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 54, 5445-54

Casslén-B., Gustavsson-B. et al. (1991) Cell membrane receptors for urokinase plasminogen activator are increased in malignant ovarian tumors. *Eur. J. Of cancer* 27 (11), 1445-48

Casslén-B., Bossmar-T. et al .(1994) Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in blood and tumor fluids of patients with ovarian cancer. *Eur. J. Of cancer* 30A (9), 1302-09

Casslen-B, Nordengren-J et al. (1995) Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (uPA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor surface expression of the uPA Receptor. *J Clin. Endocrinol.Metab* 80, 2776-84

Chambers-S. et al. (1998) Plasminogen activator inhibitor-1 is an independent poor prognostic factor for survival in advanced stage epithelial ovarian cancer patients. *Int. J. Of cancer* 79, 449-54

Chambers-S. et al. (1995) The significance of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors and its receptor in ascites of patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer* 75, 1627-33

Cho-JY, Chung-HC et al. (1997) High levels of urokinase-type plasminogen activator is a new prognostic marker in patients with gastric cancer. *Cancer* 79, 878-883

Choong-PFM., Ferno-M. et al. (1996) Urokinase plasminogen activator levels and prognosis in 69 soft tissue sarcomas. *Int. J of cancer* 69, 268-272

Christensen-L, Wiborg Simonsen-AC et al. (1996) Immunohistochemical staining of urokinase-type plasminogen activator, type-1 plasminogen activator inhibitor, urokinase receptor, and alpha-2-macroglobulin receptor in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 66, 441-52

Conese-M, Blasi-F. (1995) Urokinase/Urokinase receptor system: Internalization/Degradation of urokinase-serpin complexes: Mechanisms and regulation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 143-55

Delbaldo-C, Cunningham-M et al. (1995) Plasmin-catalysed proteolysis in colorectal neoplasia. *Cancer Res.* 55, 4688-95

Del Rosso-M et al. (1990) Role of specific membrane receptors in urokinase-dependent migration of human keratinocytes. *J Invest. Dermatol.* 94, 310-16

Dizon DS et al. (2002) Retrospective analysis of carboplatin and paclitaxel as initial second-line therapy for recurrent epithelial ovarian carcinoma ...*J. Of clinical oncology* 20 (5), 1238 - 47

- Dorudi-S, Sheffield-JP et al. (1993) E-cadherin expression in colorectal cancer: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol.* 142, 981-86
- Duffy-M., O'Grady-P. et al. (1988) Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. *Cancer* 62, 531-533
- Duffy-M, Reilly-D et al. (1990) Urokinase plasminogen activator and prognosis in breast cancer. *Lancet* 335, 109
- Duffy-M., Duggan-C. et al. (1996) Urokinase plasminogen activator as a predictor of aggressive disease in breast cancer. *Enzyme Proteine* 49, 85-93
- Duffy-M.,Maguire-T. et al. (1999) Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J. Of surgical oncology* 71, 130-35
- Dvorak-HF, Brown-LF et al. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpemeability and angiogenesis. *Amer. J Pathol.* 146, 1029-39
- Escot-C et al. (1996) Cellular localization by in situ hybridization of cathepsin D, stromelysin 3 and urokinase plasminogen activator RNAs in breast cancer. *Breast cancer Res. Treat.* 38, 217-26
- Fleuren GJ, Hazelbag-S et al. (2004) Prognostic relevance of TGF-Beta-1 and PAI-1 in cervical cancer. *Int J Cancer* Dec. 20; 112 (6): 1020-28
- Fischer-A. (1946) Fibrinolytic enzymes. *Nature* 157, 442
- Fleisher-MS, Loeb-L. (1915) Fibrinolytic enzymes. *J biol.chem.* 21, 477-501
- Foca-C., Moses-EK et al. (2000) Differential mRNA expression of urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitor type-2 in normal human endometria and endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 79, 244-50

Foekens-JA, Peters-HA et al. (2000) The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res.* 60 (3), 636-43

Folkman-J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature (Med)* 1, 27-31

Friedlaender-ML, Quinn-MA et al. (1989) The relationship of steroid receptor expression to nuclear DNA distribution and clinicopathological characteristics in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 32, 184-190

Frixen-H and Nagamine-Y (1993) Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-Cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res.* 53, 3618-23

Gamallo-C, Palacios-A et al. (1993) Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol.* 142, 987-93

Gershenson-D, Deavers-M et al. (1999) Prognostic significance of p 53 Expression in advanced stage ovarian serous borderline tumors. *Clin Cancer Res.* 5, 4053-58

Gibbs et al. (2001) Pursuit of optimum outcomes in ovarian cancer : methodological approaches to therapy. *Drugs* 2001; 61 (8), 1103 - 20

Gleeson-N, Gonsalves-R. et al. (1992) Plasminogen activator urokinase and its inhibitor PAI-2 in endometrial cancer. *Gynecol.oncol.* 47 (1), 58-61

Gleeson-N, Gonsalves-R. et al. (1993 a) Plasminogen activator inhibitors in endometrial adenocarcinoma. *Cancer* 72 (5), 1670-72

Gleeson-N, Gonsalves-R et al. (1993 b) Uterine fibrinolytic enzymes in endometrial cancer. *Eur J. Gynecol. Oncol.* 14 (5), 369-73

Grondahl-Hansen-J, Lund-LR et al. (1988) Urokinase- and tissue-type Plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. *J invest. Dermatol.* 90 (6), 790-95

Harbeck-N, Janicke-F et al. (2002) Clinical utility of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts. *Clin Breast Cancer* 3 (3), 196-200

Harris-AL, Fox-S et al. (1995) Breast cancer angiogenesis. Therapy target and prognostic factor. *Eur J Cancer* 31 A, 831-32

Hasui-Y. et al (1992) The content of urokinase-type plasminogen activator as a prognostic factor in bladder cancer. *Int J Cancer* 50, 871-73

Hay, ED (1995) An overview of epithelial-mesenchymal transition. *Acta anatomica* 154, 8-20

Hochhaus-A, Lahaye-T et al. (2001) Selective inhibition of tyrosin kinases-a new therapeutic principle in oncology. *Onkologie* 5, 65-71

Hsu-DW et al. (1995) Prognostic role of urokinase-type plasminogen activator in human gliomas. *Am J Pathol.* 147, 114-23

Jänicke-F, Schmitt-M et al. (1993) Urokinase plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent factors in node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 24 (3), 195-208

Johnson-AL, Bridgham-JT et al. (1997) Expression of avian urokinase and tissue-type plasminogen activator messenger ribonucleic acid during follicular development and atresia. *Biol. Reprod.* 56 (3), 581-88

Katz-J., Krone-P. et al. (1972) Effect of proteases on in vitro RNA synthesis by rat uteri in different hormonal status. *Endocrinology* 90 (5), 1147-53

Kinsella-AR, Green-GC et al. (1993) The role of the cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumor cell invasion and metastasis. *Brit J Cancer* 67, 904-09

Kneifel-MJ, Leytus-SP. et al. (1982) Uterine plasminogen activity, modulated by steroid hormones. *Endocrinology* 111 (2), 493-99

Knoop-A., Andreassen-PA et al. (1998) Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *British J Cancer* 77 (6), 932-40

Kobayashi-H., Fujishiro-S. et al. (1994) Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer Res.* 54, 6539-48

Konecny-G., Untch-M. et al. (2001) Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression and prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 7, 1743-49

Kuhn-W., Schmalfeldt-B. et al. (1999) Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO III. *British Journal of cancer* 79 (11/12), 1746-51

Kuhn-W., Pache-L. et al. (1994) Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum based chemotherapy. *Gynecol. Oncol.* 55, 401-09

Kristensen-P, Pyke-C et al. (1990) Plasminogen activator inhibitor type-1 in Lewis lung carcinoma. *Histochemistry* 93, 559-66

Lage-JM, Weinberg-DS et al. (1992) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in ovarian tumors. *Cancer* 69, 2668-75

Lengyel-E, Schmalfeldt-B et al. (2001) Expression of latent Matrix Metalloprotease 9 (MMP 9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 82, 291-98

Li-M., Karakji-EG et al. (1997) Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor during ovarian follicular development. *Endocrinol.* 138 (7), 2790-99

Liotta-LA, Steeg-PS et al. (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336

Liu-YX., Feng-Q. (1992) Hormonal regulation of PAI-1 secretion by cultured rat ovarian cells. *Sheng Xue Bao* 44 (3), 282-89

Liu-YX, Du-Y.(1993) Hormonal regulation of tissue-type Plasminogen activator and Plasminogen activator inhibitor-1 in cultured mouse Sertoli cells. *Sci China B* 36 (3), 319-28

Liu-YX, Liu-K. (1996) Regulation of tPA/PAI-1 secretion in cultured rat Sertoli and Leydig cells. *Sci China C Life Sci* 39 (1), 37-44

Liu-YX (1999) Regulation of the Plasminogen activation system in the ovary. *Biol. Sign. Recept.* 8 (3), 160-77

Mira-y-Lopez-R., Reich-E. (1983) Modulation of plasminogen activator in rodent mammary tumors by hormones and other effectors. *Cancer Res.* 43 (11), 5467-77

Moll-R, Mitze-M et al. (1993) Differentiated loss of E-cadherin expression on infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol.* 143, 1731-42

Nagy-JA, Brown-LF et al. (1988) Pathogenesis of tumor stroma generation : a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochem.biophys. Acta* 948, 305-26

Naitoh-H, Eguchi-Y et al. (1995) Localization of urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, 2 and plasminogen in colon cancer. *Jpn J Cancer Res.* 86, 48-56

Nekarda-H., Schmitt-M. et al. (1994) Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res.* 54, 2900-07

Nielsen-BS et al. (1996) Messenger RNA for urokinase plasminogen activator is expressed in myofibroblasts adjacent to cancer cells in human breast cancer. *Lab. Invest.* 74, 168-77

- Odekon-LE, Blasi-F et al. (1994) Requirement for receptor-bound urokinase in plasmin-dependent cellular conversion of latent TGF- β to TGF- β . *J Cell. Physiol.* 158, 398-407
- Oka-T, Ishida-T et al. (1991) Immunochemical evidence of urokinase plasminogen activator in primary and metastatic tumors of pulmonary carcinoma. *Cancer Res.* 51, 3522-25
- Otto-T, Birchmeier-W et al. (1994) Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as prognostic factors in patients with bladder carcinoma. *Cancer Res.* 54, 3120-23
- Parrott-J, Nilsson-E et al. (2001) Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 175, 29-39
- Pedersen-AN, Christensen-IJ et al. (2000) The complex between urokinase and its type-1 inhibitor in primary breast cancer. *Cancer Res.* 60 (24), 6927-34
- Pedersen-H., Schmitt-M et al. (1993) A ligand-free, soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer. *J. Clin. Invest.* 92, 2160-67
- Pedersen-H., Br nner-N et al. (1994 a) Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor and type-1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res.* 54, 4671-75
- Pedersen-H., Grondahl-Hansen-J. et al. (1994 b) Urokinase and plasminogen inhibitor type-1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 54, 120-23
- Peltz-SW., Katzenellenbogen-BS. et al. (1983) Plasminogen activation in tissues of the immature rat uterus. *Endocrin.* 112 (3). 890-97
- Pepper-MS, Vassalli-JD et al. (1987) Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell. Biol.* 105, 2535-41

Pepper-MS and Montesano-R (1991) Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Diff Dev.* 32, 319-28

Pepper-MS, Sappino-AP et al. (1992) Plasminogen activator Inhibitor-1 is induced in migrating endothelial cells. *Journal of cellular Physiology* 153, 129-39

Perrard-Sapori-MH, Chatelain-P et al. (1986) In vitro interactions between Sertoli cells and steroidogenic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 134 (2), 957-62

Protiva-P, Sordat-I et al. (1998) Alterations in plasminogen activation correlate with epithelial cell dysplasia grading in colorectal adenomas. *Brit J of cancer* 77 (2), 297-304

Pujade-Lauraine-E., Lu-H. et al. (1993) The plasminogen-activation system in ovarian tumors. *Int J. Of cancer* 55, 27-31

Pyke-C, Kristensen-P et al. (1991 a) The plasminogen activation system in human colon cancer. Messenger RNA for the inhibitor PAI-1 is located in endothelial cells of tumor stroma. *Cancer Res.* 51, 4067-71

Pyke-C, Kristensen-P et al. (1991 b) Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Amer. J. Pathol.* 1059-1067

Riethdorf-L, Riethdorf-S et al. (1999) Urokinase gene expression indicates early invasive growth in squamous cell lesions of the uterine cervix. *J Pathol.* Oct; 189 (2): 245-50

Rifkin-DB, Moscatelli-D et al. (1990) Growth factor control of extracellular Proteolysis. *Cell Diff. Develop.* 32, 313-18

Santesson-L (1935) Fibrinolytic enzymes. *Acta pathologica Microbiol. Scand.* 24

Sappino-AP, Huarte-J et al. (1989) Plasminogen activators in tissue remodelling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell. Biol.* 109, 2471-79

Sato-Y, Tsubo-R et al. (1990) Characterization of the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells : a self-regulating system. *J Cell Biol.* 111, 757-63

Schmalfeldt-B, Kuhn-W et al. (1995) Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator , its receptor and inhibitors type 1 and 2. *Cancer Res.* 55, 3958-63

Schmalfeldt-B, Prechtel-D et al. (2001) Increased expression of Matrix Metalloproteases (MMP)-2, MMP-9 and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 7, 2396-2404

Scully-RE, Young-RH (1998): Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. *Atlas of Tumor Pathology. Third series, Fasc. 23, Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.*

Sehouli-J, Mustea-A et al. (2004): Etablierte und experimentelle Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms. *Zentralbl. Gynäkol.* 126: 315-322

Seidman-J and Kurman-R (2000) Ovarian serous borderline tumors: A critical review of the Literature with emphasis on prognostic indicators. *Human Path.* 31, 539-557

Shen-X, Minoura-H et al. (1997) Changes in ovarian expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 messenger ribonucleic acids during ovulation in rat. *Endocrin J.* 44 (3), 341-48

Sier-C, Stephens-R et al. (1998) The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients. *Cancer Res.* 58, 1843-49

Silverberg-S (2000) Histopathologic grading of ovarian carcinoma: A review and proposal. *Int J Gyn Pathol* 19, 7-15

- Skelly-M, Troy-A et al. (1997) Urokinase-type plasminogen activator in colorectal cancer: Relationship with clinicopathological features and patient outcome. *Clin Cancer Res.* 3, 1837-40
- Skriver-L, Larsson-LI et al. (1984) Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator in Lewis lung carcinoma. *J. Cell. Biol.* 99, 752-57
- Stephens-RW et al. (1999) Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer; relationship to prognosis. *J Natl cancer Inst.* 91 (10), 869-74
- Svanberg-L et al. (1975 a) Fibrinolytic activity in ovarian tumors. *Acta Path. Microbiol. Scand* 83, 193-98
- Svanberg-L et al. (1975 b) Fibrinolytic activity in ascitic fluid. *Cancer* 35, 1382-87
- Taponeco-F et al. (2001) Expression and prognostic significance of urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in endometrial hyperplasia and cancer. *J exp. Clin. Cancer Res.* 20 (2), 239-46
- Tyson-FL, Boyer-CM et al. (1991) Expression and amplification of the HER 2/neu (c-erbB2) protooncogene in epithelial ovarian tumors and cell lines. *Am J obstet gynecol* 165, 640-46
- Van der Burg-M, Henzen-Logmans-S et al. (1996) Expression of urokinase-type Plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in benign, borderline, malignant primary and metastatic ovarian tumors. *Int J Cancer* 69, 475-79
- Van Roy-F, Mareel-M et al. (1992) Tumor invasion: Effects of cell adhesion and motility. *Trends Cell Biol.* 2, 163-69
- Werb-Z, Tremble-P et al. (1990) Regulation of extracellular matrix degradation by cell-extracellular matrix interactions. *Cell. Diff. Develop.* 32, 299-306
- Yamashita-J, Horiuchi-S et al. (1984) Estrogene-dependent plasminogen activation in 7, 12 Dimethylbenz-anthracene-induced rat mammary tumors in vivo and in vitro. *Gann* 75 (8), 681-89

Zhang, Zhou et al. (1997) Expression of urokinase-type Plasminogen activator, inhibitor and receptor in rhesus monkey testes. *Mol-Hum Reprod.* 3 (3), 223-31

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning, der mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglichte.

Fr. Dr. rer. nat. Sabine Riethdorf und Herrn PD Dr. med. Lutz Riethdorf für die immer geduldige Unterstützung und die trotz der eigenen vielen Arbeit stets offenen Ohren für meine vielen Fragen.

Fr. Sonja Santjer (geb. Petersen) und Fr. Tanja Karstens für die Einarbeitung in die RNA -RNA -in situ Hybridisierung und die Gestaltung eines außerordentlich angenehmen kollegialen Arbeitsklimas

Meinem Partner Philipp für die Geduld, auch auf immer wiederkehrende Fragen bzgl. des Computermediums gleichbleibend ruhig zu antworten.

Meiner Familie, die mich während des Studiums immer wieder unterstützt und zum Durchhalten ermutigt hat.

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um die Zulassung zur Promotion beworben habe.

10. Lebenslauf

- 29.07.1969:** Als dritte Tochter von Dieter und Annemarie Gödert
(geb. Egner) in Esslingen / Neckar geboren.
- 1989:** Abitur
- 1990 – 1993:** Ausbildung zur Krankenschwester im Diakonie-
Krankenhaus in Schwäbisch Hall
- Oktober 1994:** Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität
Hamburg
- März 1997:** Ärztliche Vorprüfung
- März 1998:** Erstes Staatsexamen
- April 2001:** Zweites Staatsexamen
- Bis zu diesem Zeitpunkt studienbegleitende Arbeit als Krankenschwester.
- April 2002:** Drittes Staatsexamen
- 1.09.02 -29.2.04** Ärztin im Praktikum in der Onkologie / Hämatologie des
Klinikums Oldenburg (Chefarzt : Prof. Dr. H.-J. Illiger)
- Seit 1.07.2004** Assistenzärztin in der inneren Abteilung des Ev. Krankenhauses
Alsterdorf (Chefarzt: Dr. med. Georg Poppele)

Famulaturen:

- Juli-August 1997:** Allgemeine Internistische Medizin im Diakonie-Krankenhaus Schwäbisch Hall (Prof. Dr. H-H. Heissmeyer)
- Mai-August 1998:** Allgemeinchirurgie im Mackinnon-Memorial Hospital in Broadford / Isle of Skye (Dr. R. Ball)
Allgemeinchirurgie im Raigmore Hospital / Inverness (Dr. P. Walsh)
Allgemeine Internistische und Tropenmedizin im Paul-Lechler Krankenhaus in Tübingen
- Juli-Oktober 2000:** Pulmologie, Dermatologie und traditionelle chinesische Medizin im North China Coal Medical College Hospital in Tangshan, VR China

Praktisches Jahr:

- Mai Aug. 2001:** **Chirurgisches Tertial** im Allgemeinen Krankenhaus St. Georg (Prof. Dr. C. Eggers)
- Aug.-Okt. 2001:** **Inneres Tertial**
Allgemeine Internistische Medizin im Inselspital / Bern (Prof. Dr. H.J. Peter)
- Okt.-Dez. 2001:** Hämatologie / Onkologie im Allgemeinen Krankenhaus Altona (Dr. med. D. Braumann)
- Dez. 2001-März 2002:** **Wahlfach**
Gynäkologie und Geburtshilfe im Allgemeinen Krankenhaus Altona (PD Dr. V. Ragosch)

Zusatzqualifikation:

Einjähriger Kursus für Akupunktur bei Fr. Dr. Renate Ostertun, Hamburg mit Abschluss des A-Diploms