

Aus dem Institut für
Gynäkopathologie des Instituts für Pathologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Th. Löning

**Expression von AP-1 Faktoren in Ovarialtumoren:
Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von Christine Kanowski
aus Berlin

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 04. März 2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Löning

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. K. Milde-Langosch

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. R. Simon

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	- I -
Tabellenverzeichnis	- III -
1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1. Das Ovarialkarzinom	- 1 -
1.1.1. Anatomie, Histologie und Physiologie des Ovars	- 1 -
1.1.2. Epidemiologie	- 2 -
1.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren	- 3 -
1.1.4. Pathologie der Ovarialtumore	- 5 -
1.1.5. Klinik und Diagnostik.....	- 10 -
1.1.6. Stadieneinteilung	- 14 -
1.1.7. Grading	- 16 -
1.1.8. Therapie und Prognose	- 17 -
1.2. Die AP-1-Faktoren	- 21 -
1.2.1. Funktion der AP-1-Proteine in normalen und Tumorzellen	- 23 -
1.2.2. Regulation der AP-1-Proteine	- 26 -
1.3. Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit	- 29 -
2. MATERIALIEN UND METHODEN	- 30 -
2.1. Materialien	- 30 -
2.1.1. Darstellung des Patientenkollektivs	- 30 -
2.1.2. Darstellung des Untersuchungsgutes	- 31 -
2.1.3. Verwendete Chemikalien	- 34 -
2.1.4. Verwendete Antikörper und Marker	- 35 -
2.2. Methoden	- 36 -
2.2.1. Proteinextraktion	- 36 -
2.2.2. Proteinbestimmung	- 37 -
2.2.3. Western-Blot-Analyse	- 38 -
2.2.4. Immunhistochemie	- 46 -
2.3. Auswertung	- 50 -
2.3.1. Auswertung der Western-Blots	- 50 -
2.3.2. Auswertung der Immunhistochemie	- 52 -

3. ERGEBNISSE	- 53 -
3.1. Ergebnisse für die Proteine des AP-1-Komplexes	- 53 -
3.1.1. Darstellung der Western-Blot-Analyse.....	- 53 -
3.1.2. c-Jun – phosphorylierte Form	- 55 -
3.1.3. Jun B	- 57 -
3.1.4. Jun D.....	- 59 -
3.1.5. c-Fos	- 61 -
3.1.6. c-Fos – phosphorylierte Form.....	- 63 -
3.1.7. Fos B.....	- 64 -
3.1.8. Fra 1.....	- 66 -
3.1.9. Fra 2.....	- 68 -
3.1.10. Fra 2 – phosphorylierte Form.....	- 70 -
3.2. Korrelation der AP-1-Faktoren mit den klinisch-pathologischen Parametern	- 71 -
3.3. Vergleich der Karzinome und Metastasen	- 76 -
3.3.1. Vergleich der korrespondierenden Karzinome und Metastasen.....	- 78 -
3.4. Vergleich der Karzinome mit den Borderline- und gutartigen Tumoren	- 79 -
3.5. Vergleich der Karzinome mit den Normalgeweben	- 82 -
4. DISKUSSION	- 85 -
4.1. Möglichkeiten und Grenzen der Methoden.....	- 85 -
4.2. Die Jun-Proteine.....	- 86 -
4.3. Die Fos-Proteine.....	- 89 -
5. ZUSAMMENFASSUNG	- 96 -
6. LITERATURVERZEICHNIS	- 97 -
7. DANKSAGUNG	- 112 -
8. ERKLÄRUNG	- 113 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alter der Tumorpatientinnen	- 30 -
Abbildung 2: Expression der AP-1-Faktoren im Western-Blot 1	- 54 -
Abbildung 3: Expression der AP-1-Faktoren im Western-Blot 2	- 55 -
Abbildung 4: Jun B-Expression in der Immunhistochemie	- 58 -
Abbildung 5: Jun D-Expression in der Immunhistochemie	- 60 -
Abbildung 6: c-Fos-Expression in der Immunhistochemie.....	- 62 -
Abbildung 7: Fos B-Expression in der Immunhistochemie	- 65 -
Abbildung 8: Fra 1-Expression in der Immunhistochemie	- 67 -
Abbildung 9: Fra 2-Expression in der Immunhistochemie	- 69 -
Abbildung 10: Korrelation von Jun B und den Gewebetypen	- 71 -
Abbildung 11: Korrelation von Jun D und den Gewebetypen	- 72 -
Abbildung 12: Korrelation von Fra 2 und den Gewebetypen	- 72 -
Abbildung 13: Korrelation von pFra 2 und den Gewebetypen	- 73 -
Abbildung 14: Korrelation von c-Fos und dem Grading.....	- 73 -
Abbildung 15: Korrelation von c-Fos und dem histologischen Typ	- 74 -
Abbildung 16: Korrelation von Fra 1 und dem Alter.....	- 75 -
Abbildung 17: Mittelwerte der Jun-Proteine mit Standardabweichung für die Karzinome und Metastasen.....	- 76 -
Abbildung 18: Mittelwerte der Fos-Proteine mit Standardabweichung für die Karzinome und Metastasen.....	- 77 -
Abbildung 19: Mittelwerte von Fra 1 mit Standardabweichung für die Karzinome und Metastasen.....	- 77 -
Abbildung 20: Mittelwerte der Jun-Proteine mit Standardabweichung nach Tumortyp	- 79 -
Abbildung 21: Mittelwerte der Fos-Protein-Expression mit Standardabweichung nach Tumortyp.....	- 80 -
Abbildung 22: Mittelwerte der Fra 1-Expression mit Standardabweichung nach Tumortyp.....	- 80 -
Abbildung 23: Mittelwerte der c-Fos- und pc-Fos-Expression mit Standardabweichung nach Tumortyp.....	- 81 -
Abbildung 24: Mittelwerte der Fra 2- und pFra 2-Expression mit Standardabweichung nach Tumortyp.....	- 82 -

Abbildung 25: Mittelwerte der Jun-Proteine mit Standardabweichung für die Karzinome und Normalgewebe	- 82 -
Abbildung 26: Mittelwerte der mit Standardabweichung für die Karzinome und Normalgewebe	- 83 -
Abbildung 27: Mittelwerte der Fra 1-Expression mit Standardabweichung für die Karzinome und Normalgewebe	- 84 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der epithelialen Tumore durch die WHO (World Health Organisation)	- 5 -
Tabelle 2: Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome (Stauber et al. 2005)	- 14 -
Tabelle 3: Grading der Ovarialkarzinome	- 16 -
Tabelle 4: Silverberg Grading System	- 17 -
Tabelle 5: 5-Jahresüberlebensraten (FIGO Annual Report 1998)	- 20 -
Tabelle 6: untersuchte Primärkarzinome	- 31 -
Tabelle 7: untersuchte Metastasen	- 32 -
Tabelle 8: weitere untersuchte Tumore	- 33 -
Tabelle 9: untersuchte Normalgewebe	- 33 -
Tabelle 10: Chemikalien Western-Blot	- 34 -
Tabelle 11: Chemikalien Immunhistochemie	- 35 -
Tabelle 12: Antikörper und Marker	- 35 -
Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenngels	- 39 -
Tabelle 14: Zusammensetzung des Sammelgels	- 40 -
Tabelle 15: Antikörper Verdünnung 1	- 43 -
Tabelle 16: Filmbelichtungszeiten	- 45 -
Tabelle 17: Ausgewählte Fälle für die immunhistochemische Untersuchung	- 47 -
Tabelle 18: Antikörper Verdünnung 2	- 49 -
Tabelle 19: Einteilung der densitometrisch ermittelten Werte	- 51 -
Tabelle 20: Einteilung der auszuwertenden Daten	- 51 -
Tabelle 21: Relative Expression von pc-Jun in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben ..	- 56 -
Tabelle 22: Relative Expression von Jun B in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben ..	- 57 -
Tabelle 23: Relative Expression von Jun D in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben ..	- 59 -
Tabelle 24: Relative Expression von c-Fos in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben ..	- 61 -

Tabelle 25: Relative Expression von c-Fos phosphoryliert in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben	- 63 -
Tabelle 26: Relative Expression von Fos B in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben ..	- 64 -
Tabelle 27: Relative Expression von Fra 1 in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben ..	- 66 -
Tabelle 28: Relative Expression von Fra 2 in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben ..	- 68 -
Tabelle 29: Relative Expression von Fra 2 phosphoryliert in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben	- 70 -
Tabelle 30: Jun-Expression der korrespondierenden Karzinome und Metastasen.....	- 78 -
Tabelle 31: Fos-Expression der korrespondierenden Karzinome und Metastasen.....	- 78 -

1. Einleitung

1.1. Das Ovarialkarzinom

1.1.1. Anatomie, Histologie und Physiologie des Ovars

Das Ovar hat bei der geschlechtsreifen Frau eine Größe von durchschnittlich 4x2x1 cm und ein Gewicht von 7-14 g. Durch den hormonellen Zyklus sind Größe und Gewicht jedoch Schwankungen unterworfen. Es ist mit mehreren Bändern intraperitoneal an der seitlichen Beckenwand verankert. Am Hilus des Ovars treten Gefäße und Nerven ein und aus. Das Ovar weist eine intensive Durchblutung, sowohl durch die Arteria ovarica, als auch durch den Ramus ovaricus aus der Arteria uterina auf. Der venöse Abfluß erfolgt über die Vena ovarica in die Vena cava inferior bzw. die Vena renalis sinistra. Die Lymphe wird im Stroma des Ovars gesammelt und gelangt in die Nodi lymphatici lumbales (Schiebler 2003).

Der histologische Aufbau des Ovars gliedert sich in die Rinde, Cortex ovarii und das Mark, Medulla ovarii. Die Oberfläche des Ovars bildet ein einschichtiges Epithel, welches darunter von einer straffen Bindegewebsschicht, der Tunica albuginea, gefolgt wird. Die Rinde besteht aus dem Stroma ovarii (dichtes spinozelluläres Bindegewebe) und den Folliculi ovarii, welche die Eizellen enthalten. Das Mark hingegen besteht aus lockerem Bindegewebe und beinhaltet die Nerven und Gefäße des Ovars (Junqueira et al. 1996).

Die Follikelentwicklung bis zur Entstehung von Primordialfollikeln beginnt bereits pränatal mit der Einwanderung der Gonozyten (Urgeschlechtszellen) in die Ovaranlage. Kurz nach der Menarche stehen ca. 20000 Eizellen zur Verfügung, von diesen werden ungefähr 400-450 befruchtungsfähig. Während der Reproduktionsphase einer Frau sind die verschiedenen Follikelstadien (Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel) gleichzeitig in den Ovarien vorhanden. In jedem Ovar gibt es allerdings nur einen präovulatorischen Follikel, da pro Zyklus in der Regel nur ein Follikel zur Ovulation kommt (Junqueira et al. 1996). In allen Follikelstadien kann es zur Degeneration kommen. Die atretischen Follikel werden unter Narbenbildung langsam abgebaut (Junqueira et al. 1996).

Die hormonelle Regulation des weiblichen Zyklus unterliegt einem hypothalamo-hypophysären-ovariellen Kreislauf. Der Hypothalamus sezerniert Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH). GnRH wirkt auf den Hypophysenvorderlappen und stimuliert dort die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH), diese beiden bewirken am Ovar das Wachstum der Follikel und die Sezernierung von Östradiol und Progesteron (Schmidt 1999).

1.1.2. Epidemiologie

Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms beträgt in Deutschland 15 Neuerkrankungen pro 100 000 Frauen im Jahr (Stauber et al. 2005), somit gibt es jährlich rund 8000 Neuerkrankungen (Bender 2003). Das Ovarialkarzinom macht 4,5% aller weiblichen Tumore aus und ist damit ein relativ seltener Tumor, während der häufigste Tumor mit 25% das Mammakarzinom ist (Stauber et al. 2005).

Ovarialtumore können grundsätzlich in jedem Alter auftreten, allerdings gibt es Unterschiede entsprechend der Dignität der Tumore. Der Altersgipfel der Ovarialkarzinome liegt zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr (Rubin et al. 1999), aber ca. 10% betreffen Frauen unter 40 Jahren (Stauber et al. 2005). Benigne Ovarialtumore hingegen treten bereits im Alter zwischen 20 und 45 Jahren auf (Böcker et al. 2001), das gleiche gilt auch für Borderline-Tumore (Rubin et al. 1999). Bei Frauen in den Wechseljahren ist die Inzidenz, einen malignen Ovarialtumor zu entwickeln, um den Faktor 3 erhöht (Bender 2003).

Bei ca. 75% der Frauen ist der Tumor bei Diagnosestellung bereits über das kleine Becken ausgebreitet (Sehouli et al. 2004). Davon befinden sich 40-50% bereits im Stadium FIGO III und 15-20% im Stadium FIGO IV, somit ist das Ovarialkarzinom ein prognostisch ungünstiger Tumor. Ursächlich dafür ist, dass die Tumore aufgrund ihrer Symptomarmut erst relativ spät erkannt werden, und es sich um schnell proliferierende Tumore handelt (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Das Ovarialkarzinom macht 4,2% aller Krebstodesfälle unter Frauen auf der ganzen Welt aus (Parkin et al. 2002) und steht damit an vierter Stelle der Todesursachen der Frau (Du Bois et al. 2004).

In Deutschland sterben jährlich 4800 bis 5000 Frauen an einem Ovarialkarzinom (Bender 2003). Allerdings hat sich die Überlebenschance in den letzten Jahren, durch Fortschritte in der Diagnostik und Therapie deutlich verbessert und die Ein-Jahresüberlebenschance beträgt stadienunabhängig 76% (Bender 2003).

1.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Entstehung des Ovarialkarzinoms ist noch weitgehend ungeklärt, allerdings wurden aus den Ergebnissen epidemiologischer Studien drei Risikokonstellationen ermittelt. Die „Incessant-Ovulation-Hypothese“ von Fathalla sieht die regelmäßigen Ovulationen, die zu einer Ruptur des Epithels führen, ursächlich für die Entstehung. Darauf folgend finden reparative Proliferationen statt, die die Möglichkeit von spontanen Mutationen und somit der malignen Entartung fördern (Fathalla 1971). Die „Gonadotropin-Theorie“ von Stadel macht die langandauernde Gonadotropin-Stimulation des Ovars durch die Hypophyse verantwortlich. Diese führt zu einer verstärkten mitotischen Aktivität der Epithelzellen, welche ebenfalls eine günstige Voraussetzung für die maligne Transformation ist (Stadel et al. 1975). Die dritte Konstellation bezieht sich auf eine exogene Karzinogenese durch kanzerogene Nahrungs- und Genussmittel, sowie durch aufsteigende Infektionen des weiblichen Genitaltraktes (Bender 2003). Ein beobachtetes vermindertes Auftreten von Ovarialkarzinomen nach Hysterektomie und Tubenligatur weist darauf hin (Holschneider et al. 2000, Stauber et al. 2005). Neuere Studien belegen allerdings auch die Tuben als möglichen Ort der „Ovarialkarzinom“-Entstehung (Crum et al. 2007).

95% aller Ovarialkarzinome treten sporadisch auf. Bei ca. 5% (3-10%) aller Patientinnen kann eine familiäre Häufung von Mamma- und Ovarialkarzinomen beobachtet werden. Bei zwei Dritteln dieser Patientinnen finden sich Mutationen in dem Tumorsuppressorgen BRCA-1 (Chromosom 17q21) und bei einem Drittel in dem Gen BRCA-2 (Chromosom 13q12-13) (Frank et al. 1998, Bender 2003). In der Normalbevölkerung liegt die Häufigkeit der BRCA1-Mutation bei 0,06% (Ford et al. 1995).

Das Risiko bis zum 70. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, steigt mit einer BRCA-1-Mutation auf ca. 30-45% an (Whittemore et al. 1997, Stauber et al. 2005). Zusätzlich fiel auf, dass Frauen aus Risikofamilien im Schnitt 7 - 10 Jahre früher erkranken. Dieser so genannte „early onset“ (Erkrankungsalter < 50 Jahre) wurde damit begründet, dass in diesen Familien der erste genetische Mutationsschritt bereits in der Keimbahn erfolgte (Bender 2003).

Das generelle Risiko für Frauen an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, liegt in den USA zwischen 1,4 und 1,8%. Bei Frauen mit belasteter Familiengeschichte steigt das Risiko allerdings auf 9,4% (Hartge et al. 1994). Zu den Risikofaktoren gehören in erster Linie das familiäre Vorkommen von Ovarialkarzinomen (Holschneider et al. 2000), das Alter, Kinderlosigkeit (Negri et al. 1991), Infertilität und Sterilitätsbehandlungen (Bristow et al. 1996) sowie vorausgegangene Karzinom-erkrankungen (Mamma-, Endometrium-, Kolonkarzinom). Der Gebrauch einer postmenopausalen Hormonersatztherapie mit Östrogen- und Progesteron-Präparaten hat in einigen Studien ein erhöhtes Risiko für Ovarialkarzinome gezeigt (Greiser et al. 2007), in anderen allerdings keine Risikoerhöhung ergeben (Purdie et al. 1995, Whittemore et al. 1992). Des Weiteren ist aufgefallen, dass bei Ovarialkarzinom-Patientinnen der Zeitraum zwischen Menarche und Menopause, im Gegensatz zu gesunden Frauen, verlängert ist (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Die Risikofaktoren für gutartige Ovarialtumore unterscheiden sich etwas von denen der malignen. Rauchen und Übergewicht (BMI \geq 30) stellen die wichtigsten signifikanten Risikofaktoren für benigne Tumore dar. Im Gegensatz zu den Karzinomen bewirkt die Einnahme von oralen Kontrazeptiva keine Risikoreduktion bei gutartigen Tumoren. Eine Familiengeschichte von Mamma- und Ovarialkarzinomen stellt für die benignen Tumore ebenfalls keine Risikoerhöhung dar (Jordan et al. 2007).

Protektiv wirken viele Schwangerschaften (> als 4 Kinder) und eine längere Dauer des Stillens. Mehrgebärende zeigen im Vergleich zu kinderlosen Frauen eine Risikoreduktion von 40-60% (Risch et al. 1994, Hankinson et al. 1995). Die Einnahme von hormonalen Kontrazeptiva senkt das Risiko, da auf diese Weise die Proliferation des ovariellen Epithels eingeschränkt wird.

Durch die Einnahme von Ovulationshemmern sinkt das Risiko zu erkranken um 40%, 53% und 60% bei Einnahme für 4, 8 und 12 Jahre, dieser Effekt setzt sich auch bei diskontinuierlicher Einnahme fort (Holschneider et al. 2000). Nach einer Einnahme von mehr als 5 Jahren haben auch Nulliparae dasselbe Risiko wie Multiparae. Frauen aus belasteten Familien können das Risiko durch eine Einnahme länger als 10 Jahre unter die Grenze der Normalbevölkerung senken (Gross et al. 1994). Der protektive Effekt von Ovulationshemmern hält auch noch nach Absetzen an (10-15 Jahre) (Bender 2003). Zusätzlich wirken die Entfernung des Uterus bzw. der Eileiter protektiv (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

1.1.4. Pathologie der Ovarialtumore

Das Ovar besteht, wie bereits vorn beschrieben, aus histogenetisch unterschiedlichen Geweben. Daraus ergeben sich drei Hauptgruppen von Tumoren: epitheliale Tumore (60-70%), Keimstrang-Stroma-Tumoren (5-10%) und Keimzelltumoren (10-20%) (Böcker et al. 2001). In dieser Arbeit wurden ausschließlich Tumore epithelialen Ursprungs untersucht, daher werden nur diese näher erläutert. Die epithelialen Tumore machen zwei Drittel aller Ovarialtumore und 85% der malignen Ovarialtumore aus. Entsprechend ihrer Dignität werden sie in benigne, Borderline und maligne Tumore unterteilt (Blümcke 1995). Alle epithelialen Tumore leiten sich vom Müller-Oberflächenepithel ab und können entsprechend der Entwicklungspotenzen des Müller-Zölomepithels in seröse, muzinöse, endometrioid und urotheliale Tumore differenzieren (Böcker et al. 2001).

Tabelle 1: Einteilung der epithelialen Tumore durch die WHO (World Health Organisation)

Einteilung der epithelialen Tumore	Häufigkeit (in %)	durchschnittliches Erkrankungsalter (in Jahren)
seröse Tumore	45	
Adenokarzinom	25	60
Borderline-Tumor	15	45
Zystadenom	60	40

muzinöse Tumore	30	
Adenokarzinom	10	60
Borderline-Tumor	20	45
Zystadenom	70	40
sonstige Tumore		
endometrioides Adenokarzinom	20	60
klarzelliges Adenokarzinom	3	57
benigner Brenner-Tumor	2	45

Bisher wurde angenommen, dass die epithelialen Ovarialkarzinome vom Oberflächenepithel des Ovars oder vom Epithel in den Inclusionszysten ausgingen. Daneben finden sich Beweise für eine Tumorentstehung in den Tuben.

So fanden sich bei Studien mit Patientinnen mit BRCA-Mutationen bei prophylaktischen Salpingektomien und Oophorektomien in 40-100% frühzeitige seröse Karzinome in den Tuben (Colgan et al. 2001, Powell et al. 2005, Finch et al. 2005). Diese Tumoren zeigten wie die Ovarialkarzinome p53-Mutationen (Crum et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass, neben der Entstehung von Tumoren im Oberflächenepithel der Ovarien, ein großer Teil der serösen Ovarialkarzinome seinen Ursprung in den Tuben nimmt und von dort frühzeitig auf die Ovarien übergreift (Crum et al. 2007).

Ein durch mehrere Studien belegtes Modell zur Tumorgenese der epithelialen Ovarialtumore unterteilt diese in zwei Tumortypen, die sich getrennt voneinander entwickeln. Die Tumorentstehung nach Typ I beinhaltet hochdifferenzierte seröse, muzinöse, endometrioides und klarzellige Karzinome und maligne Brenner-Tumore. Diese entwickeln sich in einem schrittweisen Prozess aus Zystadenomen und Borderline-Tumoren. Sie sind gekennzeichnet durch ein langsames Wachstum und sind bei Diagnosestellung meist noch auf das Ovar begrenzt. Es finden sich BRAF- und KRAS-Mutationen in ca. zwei Dritteln der Tumore. In 20% der endometrioiden Tumoren finden sich PTEN-Mutationen (Shih et al. 2004, Bell 2005, Dehari et al. 2007).

Dahingegen gehören zum Typ II niedrigdifferenzierte seröse und undifferenzierte Karzinome. Sie sind durch ein schnelles aggressives Wachstum mit früher Metastasierung gekennzeichnet. Bei dieser Art von Tumoren findet sich eine p53-Mutation in 50-80% der Tumore und BRCA 1 und 2 Dysfunktionen (Shih et al. 2004, Bell 2005, Dehari et al. 2007).

In seltenen Fällen können jedoch auch niedrigdifferenzierte Karzinome aus Borderline-Tumoren entstehen, aber in der Mehrheit entwickeln sie sich unabhängig (Shih et al. 2004, Bell 2005, Dehari et al. 2007).

Die **serösen Tumore** bilden die größte Gruppe mit 45% aller Ovarialtumore, davon sind 60% benigne, 15% Borderline- und 25% maligne Tumore (Böcker et al. 2001). Makroskopisch sind es zystische Tumore, die in unterschiedlichem Maße auch solide und papilläre Proliferationen aufweisen. Sie ähneln somit dem Epithel der Tuben (Williams et al. 2007).

Die Zysten sind von einem flachkubischen bis zylindrischem Epithel mit mittelständigen Kernen ausgekleidet und weisen einen serösen Inhalt auf (Böcker et al. 2001, Blümcke 1995). Bei den gut differenzierten Tumoren ähnelt der Aufbau des Epithels dem der Tuba uterina (WHO 2003).

Die benignen Zystadenome (15% aller Ovarialtumore) entwickeln sich bevorzugt in der Rinde bzw. auf der Oberfläche des Ovars (WHO 2003). Es handelt sich um ein- oder mehrkammerige Zysten, die in ihrer Größe zwischen 1 bis über 50 cm schwanken können. Sie treten in ca. 25% der Fälle bilateral auf. Die glattwandigen Zysten sind von einem einschichtigen Epithel ausgekleidet, welches keine Atypien aufweist (Böcker et al. 2001). Tumore, die zum größeren Teil fibröse Gewebe aufweisen, werden auch als Adenofibrome bezeichnet (WHO 2003).

Seröse Borderline-Tumore besitzen ein niedriges malignes Potential (LMP), welches sie von den Karzinomen abgrenzt. Sie treten in 25-35% bilateral auf. Histologisch weisen sie ein verbreitertes, mehrschichtiges Epithel mit unregelmäßigen Brückenbildungen und mitotischer Aktivität auf; es besteht allerdings keine zerstörende Stromainfiltration (Böcker et al. 2001).

Das seröse Adenokarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Ovars. Die Tumore zeigen ein sehr variables Aussehen und können eine Größe von bis zu 20 cm erreichen (WHO 2003). In 65% der Fälle liegt ein bilaterales Auftreten vor. Häufig finden sich Nekrosen und Einblutungen in die soliden Areale des Tumors (Rubin et al. 1999), des Weiteren können Psammokörperchen, das sind kleine zwiebelschalenartige Verkalkungen, vorkommen (Blümcke 1995). Histologisch zeigen sich ausgeprägte Zellatypien, die je nach Differenzierungsgrad von zylindrischen Zellen mit Flimmerbesatz (G1) bis zu undifferenzierten, rudimentär drüsenbildenden Zellen (G3) reichen (Blümcke 1995).

Die zweitgrößte Gruppe der Ovarialtumore sind mit 30% die **muzinösen Tumore**, davon sind 70% benigne, 20% Borderline- und 10% maligne Tumore (Böcker et al. 2001). Generell handelt es sich ebenfalls um zystische Tumore mit soliden und papillären Anteilen, die allerdings meist unilateral vorkommen. Die Zysten können eine beträchtliche Größe erreichen und sind mit einem schleimigen bis gallertigen Inhalt gefüllt (Blümcke 1995). Sie besitzen ein zylindrisches, schleimbildendes Epithel mit basalständigen Zellkernen (Böcker et al. 2001).

Das im Vergleich zu den serösen Tumoren meist gut differenzierte Epithel kann an die Epithelien der Endozervix oder des Gastrointestinaltraktes erinnern (WHO 2003).

Das muzinöse Zystadenom besteht aus mehrkammerigen, dünnwandigen Zysten, deren Größe bis zu 25 cm betragen kann. Ein bilaterales Auftreten ist nur in ca. 5% der Fälle. Das die Zysten auskleidende Epithel ist einschichtig und zeigt keine Atypien (Böcker et al. 2001).

Muzinöse Borderline-Tumore, die in 10% bilateral auftreten, weisen ein fokales mehrschichtiges Epithel mit Papillen- und Brückenbildung auf. Es kommen Zellatypien vor, allerdings fehlt ein invasives Wachstum (Böcker et al. 2001).

Muzinöse Karzinome sind durch ihr invasives Wachstum gekennzeichnet und zeigen häufig eine Infiltration der Kapsel des Ovars (Rubin et al. 1999). Ca. 20% der Tumore kommen bilateral vor und sind aus soliden Anteilen und unterschiedlich großen Zysten aufgebaut. Die Tumore bestehen aus atypischem, muzinösem Drüsengewebe mit vielen Mitosen (Böcker et al. 2001).

Endometrioides Karzinom sind mit 20% der Ovarialmalignome häufig und entstehen meist durch direkte Entartung des ovariellen Epithels mit endometrioider Differenzierung (Blümcke 1995). Es hat sich gezeigt, dass 10-17% der endometrioiden Tumore bei einer gleichzeitig vorliegenden Endometriose entstehen (Böcker et al. 2001). In ca. 15-50% der Fälle tritt gleichzeitig ein Endometriumkarzinom des Corpus uteri auf, wobei man allerdings annimmt, dass diese getrennt voneinander entstehen (Rubin et al. 1999).

Makroskopisch haben die Tumore eine weiche Konsistenz und sind von Zysten durchsetzt, z.T. gibt es auch solide Anteile mit Nekrosen. Die Größenordnung liegt zwischen 15-25 cm und ca. 25% davon treten bilateral auf. Mikroskopisch sieht man polymorphe atypische Drüsenformationen mit hyperchromatischen Zellkernen und basophilem Zytoplasma (Böcker et al. 2001). Histologisch können alle Varianten des Endometriumkarzinoms ausgebildet sein (Blümcke 1995).

Klarzellige Karzinome sind sehr seltene, meist maligne Tumore und machen nur 3% der Ovarialtumore aus. Es besteht ein starker Bezug zur Endometriose und zum Endometriumkarzinom des Uterus, in 15-30% besteht ein gemeinsames Auftreten (Böcker et al. 2001).

Die meisten Tumore sind zystisch, mit papillären und soliden Proliferationen und es treten Nekrosen und Einblutungen in die soliden Anteile auf (Rubin et al. 1999). Die Tumore erreichen eine durchschnittliche Größe von 15 cm (WHO 2003) und treten in 20-40% beidseitig auf (Böcker et al. 2001). Im Mikroskop sieht man große polygonale Tumorzellen mit hellem Zytoplasma, deutlichen Zellgrenzen und großen, polymorphen Kernen (Böcker et al. 2001). Die Zellkerne springen typischerweise ins Lumen vor und werden daher als Hobnail-Zellen bezeichnet. Die Karzinomzellen weisen eine große Ähnlichkeit mit den Zellen der Nierenkarzinome auf (Blümcke 1995).

Brenner-Tumore sind zu 99% gutartig und sind mit einem Anteil von 2% aller Ovarialtumore ebenfalls sehr selten. Ihre Größe ist stark schwankend, zwischen 1-20 cm, und sie kommen in 10-20% der Fälle bilateral vor (Böcker et al. 2001).

Sie sind derbe, grau-weiße Neoplasien, die histologisch aus fibrösem Stroma und Nestern aus Platten- oder Übergangsepithel aufgebaut sind (Blümcke 1995), sie gleichen daher in ihrem Aufbau den Tumoren des urothelialen Epithels (WHO 2003).

4-5% der Ovarialkarzinome sind undifferenziert und es ist keine histogenetische Zuordnung möglich. Es sind makroskopisch meist solide Tumore mit großen nekrotischen Anteilen. Im histologischen Bild zeigen sich Gruppen von anaplastischen Tumorzellen, mit vielen Mitosen und Atypien. Es finden sich meist auch Gebiete mit differenzierten serösen Zellen, allerdings reichen diese für eine Zuordnung nicht aus (WHO 2003).

1.1.5. Klinik und Diagnostik

Grundsätzlich gibt es keine typischen Symptome, die auf einen Ovarialtumor hinweisen. Mögliche Symptome sind Zunahme des Bauchumfanges, entweder durch einen großen Tumor (> 10 cm) oder durch Aszitesbildung. Die am häufigsten beschriebenen Symptome beziehen sich auf das Verdauungssystem wie Druckgefühl im Bauch, Schmerzen bei der Defäkation oder Miktion, gastrointestinale Beschwerden wie Völlegefühl, Obstipation, Appetitlosigkeit und Subileusbeschwerden. (Stauber et al. 2005, Bender 2003).

Zusätzlich kann es zu Harnleiterstauungen und insbesondere bei fortgeschrittenen Karzinomen zu Pleuraergüssen und Kreuzschmerzen kommen (Schmidt-Matthiesen et al. 2002, Bender 2003). Ein weiteres Zeichen eines fortgeschrittenen Karzinoms ist die Kachexie, besonders mit einem eingefallenen Gesicht (Facies ovarica) und einem aufgetriebenen Abdomen. Es kann sowohl zu Gewichtsabnahme als auch -zunahme kommen. Bei mehr als der Hälfte der Ovarialkarzinome liegt bei Diagnosestellung eine Peritonealkarzinose vor. Einige Tumore bilden Hormone (Östrogene, Androgene) und können demnach Blutungsanomalien (25% der Ovarialkarzinome) oder Virilisierungserscheinungen hervorrufen. Als mögliche Komplikation und Notfallsituation kann es zu einem akuten Abdomen kommen, als Folge einer Drehung des Gefäßstiels des Tumors, der Ruptur eines zystischen Prozesses, oder auch peritonealer Reizung durch nekrotisierende Tumore (Stauber et al. 2005).

Ein sehr typisches Symptom ist die Aszitesbildung, die immer an ein Ovarialkarzinom denken lässt. Man nimmt an, dass es durch ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Resorption entsteht, ursächlich durch eine Reizung des Peritoneums und einer Behinderung des Abflusses bedingt (Bender 2003).

Das Ovarialkarzinom ist ein Tumor, der sich durch seine Entstehung an der Oberfläche des Ovars sehr früh intraperitoneal ausbreitet, d.h. es gibt ein frühes Übergreifen auf andere Organe des kleinen Beckens. Zuerst finden sich Absiedelungen im Douglas-Raum, dem Pelveoperitoneum, den Adnexen und dem Uterus, dem großen Netz, dem Rektum und Sigma (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). Entsprechend der Druckverhältnisse gelangt das Ovarialkarzinom durch den Aspirationsdruck in den Oberbauch. Über die Peritonealflüssigkeit gelangen Tumorzellen bevorzugt unter die rechte Zwerchfellkuppel und können von dort auf die Leber und die Pleura übergehen (Stauber et al. 2005). Die Lymphknotenmetastasierung erfolgt zunächst in die pelvinen und dann in die paraaortalen Lymphknoten, sie liegt bei früher Diagnose bei 10-20% und bei fortgeschrittenen Karzinomen bei 60-70% (Stauber et al. 2005). Die Metastasierung über das Blut ist relativ selten (< 3%), meist kommt es erst bei Rezidiven oder Terminalstadien zu Lungen-, Leber-, Milz- oder Gehirnetastasen (Schmidt-Matthiesen et al. 2002, Bender 2003).

In der Diagnostik steht zunächst die bimanuelle Tastuntersuchung an erster Stelle, sie gibt Aufschluß über die Verhältnisse im kleinen Becken. Allerdings schließt ein unauffälliger Befund einen Ovarialtumor nicht aus (Stauber et al. 2005).

Typisch für ein Ovarialkarzinom ist ein irregulärer Tumor in der Ovargegend, der durch Adhäsionen nicht frei beweglich ist, zusätzlich kann man häufig kleine kugelige Resistenzen im Douglas-Raum tasten (Bender 2003).

Neben der gynäkologischen Untersuchung sollten zusätzlich die Lymphknotenregionen der Leiste, als auch die supraklavikulären und axillären Lymphknoten abgetastet werden und ggf. bei Verdacht auf Aszites eine Perkussion des Abdomens erfolgen (Bender 2003, Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Als weitere Basisuntersuchung wird die transvaginale Sonographie (TVS), inklusive Farb-Doppler-Sonographie, durchgeführt. Dabei besteht die Möglichkeit auch sehr kleine Tumore (< 1 cm) zu erkennen. Die TVS hat bereits in mehreren Studien eine gute Sensitivität für die Entdeckung von Ovarialtumoren ergeben, hat aber eine geringe Spezifität (van Nagell et al. 2000). Daher wurden bestimmte Diagnosekriterien festgelegt. Diese sind Tumorgröße, Binnenstruktur, Zystenarchitektur, Wand- und Septumdicke, innere Zystenoberfläche, Echogehalt der flüssigen und soliden Anteile, Tumoroberfläche, Aszites, Vaskularisation sowie Durchblutung (Bender 2003). Eine glatte Begrenzung und einkammerige, homogene Zysten sprechen für einen gutartigen Tumor. Unscharf begrenzte, inhomogene, zystisch-solide Tumore, die eine eingeschränkte Beweglichkeit aufweisen, weisen dahingegen eher auf das Vorliegen eines malignen Prozesses hin (Schmidt-Matthiesen et al. 2002, Stauber et al. 2005). Des Weiteren kann mittels der Sonographie auch das Vorliegen von freier Flüssigkeit (Aszites) im Bauchraum beurteilt werden, ebenso das Vorliegen von Metastasen. Ein vorliegender Aszites sollte punktiert und zytologisch auf maligne Zellen hin untersucht werden (Stauber et al. 2005).

Nach der Ultraschalluntersuchung wird das weitere Vorgehen festgelegt. Zum weiteren Staging erfolgt in der Regel eine Oberbauchsonographie zur Beurteilung der Leber und eine Röntgen-Thorax-Aufnahme in zwei Ebenen, die für die Beurteilung der Operabilität der Patientin herangezogen wird. Um weitere Informationen zu sammeln, können auch CT- oder MRT-Aufnahmen gemacht werden. Zur Beurteilung einer Darm- und Harnblasenbeteiligung empfiehlt sich eine Rektos- bzw. Koloskopie und eine Zystoskopie (Stauber et al. 2005).

Zusätzlich sollte auch eine präoperative Tumormarkeruntersuchung stattfinden, diese ist aber eher in Hinblick auf die Verlaufskontrolle und den Therapieerfolg sinnvoll (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). **Tumormarker** sind Proteine, Antigene oder Hormone, die in der Regel bei gesunden Personen niedrige Werte im Blut haben und bei einer malignen Erkrankung ansteigen (Bender 2003). Es gibt mehrere Marker, die bei Ovarialtumoren reagieren, allerdings erfolgt dies weder generell noch spezifisch, daher muss in jedem Fall individuell damit umgegangen werden (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Der wichtigste Marker beim Ovarialkarzinom ist **CA 12-5**, dies ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche; allerdings ist es biochemisch noch nicht analysiert (Bender 2003). In den Testverfahren hat CA 12-5 eine Spezifität von 90% und eine Sensitivität von 75% (Rubin et al. 1999). CA 12-5 ist besonders beim Ovarialkarzinom im Serum (> 35 U/l) erhöht (Bender 2003). Viele benigne gynäkologische als auch nicht-gynäkologische Erkrankungen können jedoch auch zu einem CA 12-5-Anstieg führen, daher steigt die Rate an falsch positiven Ergebnissen (Munkarah et al. 2007). Bei den serösen Karzinomen finden sich in den fortgeschrittenen Stadien (FIGO III & IV) bei 80-90% richtig positive Werte und CA 12-5 ist in diesen Fällen gut als Verlaufs- und Therapieerfolgsparemeter verwendbar. Für die frühen Stadien (FIGO I & II) liegen die richtig positiven Ergebnisse nur bei 50% und es gibt einen hohen Anteil unspezifischer Reaktionen (Zurawski et al. 1988, Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Ein weiterer Tumormarker, das **CEA**, ist bei 30-65% der Patientinnen mit fortgeschrittenen Stadien erhöht (Munkarah et al. 2007). Muzinöse Tumore zeigen allerdings einen signifikant geringeren Wert an CA 12-5 (Bender 2003). Daher bieten sich bei muzinösen Karzinomen die Tumormarker CA 19-9 und CA 72-4 an (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). Generell ist zu bemerken, dass der Anstieg der Tumormarker vom Volumen des Tumors abhängt und ein Anstieg meist erst relevant ist, wenn die Normalwerte deutlich überschritten sind und sich eine steigende Tendenz zeigt. Demnach sind Tumormarker kein Frühdiagnostikum, sondern nur im Verlauf zu bewerten (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Eine 100%-ige Unterscheidung zwischen gut- und bösartigen Tumoren ist nach klinischen Gesichtspunkten meist nicht möglich. Daher wird jeder Tumor als potenziell maligne angesehen. Der endgültige Dignitätsnachweis gelingt nur mittels diagnostischer Laparoskopie bzw. Laparotomie und anschließender histopathologischer Untersuchung (Stauber et al. 2005). Dabei ist die neue Methode der Laparoskopie umstritten und wird nur bei Prozessen, die sehr wahrscheinlich benigne sind und bei jungen Frauen mit Kinderwunsch, empfohlen. In anderen Fällen ist eine Laparotomie nicht vermeidbar (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Aufgrund der hohen Mortalität wäre ein Screening auf Ovarialkarzinome wünschenswert. Dies gestaltet sich allerdings bis heute schwierig. Die Möglichkeit eines Screening bietet sich allenfalls durch die Kombination der Bestimmung von Biomarkern gefolgt von TVS (Munkarah et al. 2007). Dies wurde bereits in mehreren Studien untersucht, z.B. der PLCO-Studie (Buys et al. 2005). Hier muss allerdings noch ein längeres Follow-up abgewartet werden, um einen Einfluss auf die Mortalität sichtbar zu machen (Munkarah et al. 2007).

1.1.6. Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung beim Ovarialkarzinom erfolgt nach anatomisch-pathologischen Richtlinien, wird individuell ermittelt und entscheidet über den Therapieverlauf. Sie wird in drei Abschnitte gegliedert: die präoperative Diagnostik, die diagnostische Laparotomie und die histologische und zytologische Untersuchung aller Biopsien (Bender 2003).

Die Stadieneinteilung beruht auf den Richtlinien der FIGO (Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique). Diese werden in regelmäßigen Abständen überarbeitet und angepasst (Tab. 2).

Tabelle 2: Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome (Stauber et al. 2005)

pTNM	FIGO	
pTX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0		Kein Anhalt für Tumor
pTis	0	Carcinoma in situ (keine Infiltration der Lamina propria)
pT1	I	Karzinom auf die Ovarien begrenzt
pT1a	IA	Nur ein Ovar befallen, kein Aszites, kein Tumor auf der Oberfläche, Kapsel intakt
pT1b	IB	Beide Ovarien befallen, kein Aszites, kein Tumor auf der Oberfläche, Kapsel intakt
pT1c	IC	Wie Stadium IA oder IB, aber mit Tumor auf der Oberfläche eines oder beider Ovarien, oder mit Kapselruptur, oder mit malignen Zellen in Aszites oder Peritonealspülung

pT2	II	Karzinom eines oder beider Ovarien mit Ausdehnung im Becken
pT2a	IIA	Ausdehnung/Metastasen auf Uterus oder Tuben
pT2b	IIB	Ausbreitung/Metastasen auf andere Gewebe des kleinen Beckens
pT2c	IIC	Wie Stadium IIA oder IIB, aber mit Tumor auf der Oberfläche eines oder beider Ovarien, oder mit Kapselruptur, oder mit malignen Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
pT3 &/oder N1	III	Karzinom mit intraperitonealer Metastasierung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitonealen oder inguinalen Knoten, Leberkapselmetastasen
pT3a	IIIA	Tumor makroskopisch auf das kleine Becken begrenzt, aber mit histologisch gesicherter mikroskopischer Metastasierung im viszeralem oder parietalem Peritoneum
pT3b	IIIB	Karzinom mit histologisch gesicherten intraabdominellen Metastasen, deren Größe < 2 cm im Durchmesser beträgt
pT3c &/oder N1	IIIC	Abdominelle Metastasen > 2 cm im Durchmesser und/oder retroperitoneale oder inguinale Knoten
pT4	IV	Karzinom mit Fernmetastasen, bei Pleuraergüssen nur bei positivem Tumorzellnachweis, Leberparenchymmetastasen

Zunächst erfolgt die makroskopische Beurteilung durch den Operateur. Er beurteilt den Lokalbefund der Ovarien nach folgenden Kriterien: Tumor ein- oder doppelseitig, Oberfläche, Begrenzung, Kapsel intakt/nicht intakt, Tumorbeweglichkeit. Die Tumoroberfläche muss genau beurteilt werden, da sie für die Unterscheidung von Stadium IC und IIC wichtig ist. Leichte Adhäsionen können noch dem Stadium I zugeteilt werden, wohingegen feste Verwachsungen als Tumorabsiedelungen im kleinen Becken verstanden werden und dem Stadium IIB zugeordnet werden (Bender 2003).

Anschließend werden die weiteren Bauchorgane (Darm, Magen, Leber, Zwerchfellkuppen etc.) und besonders auch die parakolischen Rinnen sehr gründlich abgetastet. Ist das Karzinom in die Vagina, die Blase oder den Darm eingebrochen, wird es dem Stadium IV zugeordnet, in diesen Fällen wird eine histologische Kontrolle gefordert (Bender 2003).

Von allen verdächtigen Befunden müssen Proben genommen werden, die histologisch untersucht werden. Für den Fall, dass kein makroskopischer Befall vorliegt, werden zytologische Abstriche, insbesondere von Leber und Zwerchfell genommen (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Wenn ein Aszites vorliegt, werden ebenfalls Proben genommen und zytologisch untersucht. Liegt kein Aszites vor, wird eine Peritoneallavage durchgeführt und die Spülflüssigkeit (ca. 200 ml) gewonnen (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). Das Vorliegen eines Aszites bzw. einer positiven Peritonealzytologie, ohne Ausbreitung über das kleine Becken hinaus, bewirkt die Zuteilung zu den Stadien Ic bzw. Ilc (Bender 2003).

Des Weiteren erfolgt auch eine gründliche Untersuchung der pelvinen und para-aortalen Lymphknoten, als auch der Lymphknoten der Mesenterien und des Omentum majus. Ein positiver Lymphknoten bewirkt seit 1988 bereits eine Zuteilung zum Stadium IIIc, was für die weitere Behandlung und Prognose von großer Bedeutung ist. Es erfolgt auch die Einbeziehung rein mikroskopisch erkennbarer Metastasen in die Stadieneinteilung (Bender 2003).

1.1.7. Grading

Für das Ovarialkarzinom gibt es kein weltweit anerkanntes Gradingssystem. Die WHO hat das FIGO-Gradingssystem basierend auf der Architektur der Tumore und der Kernmorphologie entwickelt, allerdings ist dieses System sehr abhängig vom jeweiligen Untersucher, da es keine festgelegten Kriterien gibt (Mayr et al. 2000, Sato et al. 2003) (Tab. 3).

Tabelle 3: Grading der Ovarialkarzinome

Grading	
G X	Keine Beurteilung
G I	gering aufgehobene Differenzierung
G II	mäßige Differenzierung
G III	Entdifferenzierung, anaplastischer Tumor

Silverberg et al. veröffentlichten ein weiteres Gradingssystem, das für alle histologischen Typen des Ovarialkarzinoms gilt. Es stützt sich auf die Architektur, Kernpleomorphismen und die mitotische Aktivität der Tumorzellen (Shimizu et al. 1998, Silverberg 2000). Silverberg entwickelte einen Score, der in die Grade G I-III übersetzt werden kann (Tab. 4).

Tabelle 4: Silverberg Grading System

Score	Architektur	Kernatypien	Mitosen/ 10 HPFs (high-power fields)
1	drüsig	leicht	0-9
2	papillär	mäßig	10-24
3	solide	stark	>25

Die entsprechenden Merkmale des Score werden addiert und ergeben das Grading. 3 bis 5 Punkte entsprechen G I, 6 und 7 Punkte G II und 8 und 9 Punkte entsprechen G III (Mayr et al. 2000).

1.1.8. Therapie und Prognose

Die wichtigste therapeutische Maßnahme beim Ovarialkarzinom stellt die Laparotomie dar. Das Ziel der Operation ist die komplette Tumorresektion, bzw. eine Tumorreduktion auf einen Rest von < 1 cm, da dies direkt mit der medianen Überlebenszeit korreliert (Du Bois et al. 2004). Bei vermutlich gutartigen Tumoren kann als diagnostische und zugleich therapeutische Methode die Adnektomie des veränderten Ovars mittels Laparoskopie durchgeführt werden. In einigen Fällen kann somit auch eine fertilitätserhaltende Therapie durchgeführt werden (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Das Ausmaß des Eingriffes kann erst durch intraoperatives Staging mit Hilfe der Schnellschnitt-Untersuchung festgelegt werden (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). Die Operation umfasst einen Längsschnitt des Abdomens, Adnektomie beidseits mit hoher Resektion der ovariellen Gefäßbündel, Hysterektomie, Omentektomie und Appendektomie.

Des Weiteren erfolgt die Entnahme von Peritonealbiopsien, bzw. ggf. die Entfernung von Douglas- und Blasenperitoneum, die Entnahme von subdiaphragmatischen Abstrichproben und peritonealer Spülzytologie. Alle weiteren verdächtigen Tumorgewebe werden ebenfalls entfernt, dies umfasst z.B. Darmteilresektionen, Zwerchfeldeperitonealisierung, etc (AWMF 2002).

Die pelvine und paraaortale Lymphonodektomie sollte wenn möglich durchgeführt werden, da sie für ein optimales Staging von großer Relevanz ist. Sakurai et al. zeigten in einer retrospektiven Studie, dass 17% (24/141) der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom im Stadium I paraaortale Lymphknotenmetastasen aufwiesen (Sakurai et al. 2002). Dies zeigt die dringende Notwendigkeit einer systematischen Lymphonodektomie auch bei frühen Stadien.

Von den Ergebnissen der histologischen Untersuchung wird die weitere systemische Therapie abhängig gemacht. Die adjuvante Chemotherapie wird Patientinnen mit einem Karzinom des Stadiums II bis IV empfohlen, aber auch high-risk Patientinnen mit Stadium Ia/Ib G3 und Ic profitieren von einer Therapie. Die Chemotherapie erfolgt nach derzeitigem Standard intravenös mit Carboplatin und Paclitaxel, da diese die beste Wirkung und das geringste Toxizitätsprofil zeigen (Du Bois et al. 2004, AWMF 2002). Die Behandlungsdauer sollte als Primärtherapie 5 bis 6 Zyklen umfassen (AWMF 2002). Bei nicht operablen Patientinnen bzw. bei verbliebenem Tumorrest erfolgt eine palliative Chemotherapie. Die Remissionsrate bei der palliativen Chemotherapie liegt bei 54% CR (complete remission) und 23% PR (partial remission). Sie liegt bei mikroskopischem Tumorrest bei 90% CR, sinkt bei Tumorresten <2 cm auf 30-40% und bei Resten >2 cm auf 10% (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). Wenn nach 3 Zyklen kein Therapieerfolg messbar ist (Ultraschall, Marker, etc.), sollte die Therapie gewechselt werden (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). In Ausnahmefällen kann auch eine neoadjuvante Chemotherapie erfolgen, wobei nach 3 bis 4 Zyklen die Operation erfolgen sollte (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). Die intraperitoneale Chemotherapie, ebenfalls mit Platin und Taxanen, ist eine umstrittene Therapiestrategie insbesondere bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen.

Sie hat in mehreren Studien eine höhere Wirksamkeit und längeres Überleben im Vergleich zur intravenösen Chemotherapie gezeigt. Es treten jedoch starke Nebenwirkungen auf, wie Schmerzen, hämatologische, gastrointestinale oder neurologische Toxizität, welche zu Therapieabbrüchen führen (Williams et al. 2007).

Als weitere Therapiemöglichkeit bietet sich bei Symptomen wie Blutung und Schmerzen die palliative Radiotherapie mit einer Dosis von 30 Gy in 10 Sitzungen an. Dies zeigt gute Resultate mit einer Ansprechrate von 88% der Patientinnen mit Blutung und 65% mit Schmerzen (Williams et al. 2007).

Des Weiteren sind individuelle Versuche der Hormontherapie mit Tamoxifen, GnRH-Analoga und Gestagenen, ähnlich dem Mammakarzinom, möglich, da etwa 60% der Ovariakarzinome Östrogenrezeptor-positiv und 50% Progesteronrezeptor-positiv sind. Allerdings zeigen sich nur schlechte Ansprechraten und es ist nicht bekannt, welche Patientengruppen davon profitieren (Schmidt-Matthiesen et al. 2002). Für die Zukunft liegt der Schwerpunkt der Forschung in der Gentherapie mit Adenoviren. Diese sollen die Therapie, mit wenigen Nebenwirkungen, direkt zu den erkrankten Organen bringen (Williams et al. 2007).

Als aussagekräftige **Prognosefaktoren** für das Ovariakarzinom haben sich der postoperative Tumorrest (<1 cm), das Tumorstadium bei Diagnosestellung, der Differenzierungsgrad, der Lymphknotenstatus und die Aszitesbildung erwiesen (Bender 2003, Holschneider et al. 2000, Mayr et al. 2000).

Die klarzelligen und muzinösen Karzinome zeigen im Verhältnis zu den serösen und endometrioiden ein schlechteres Ansprechen auf die platinhaltige Chemotherapie und weisen somit eine signifikant schlechtere Prognose auf (Enomoto et al. 2003, Hess et al. 2003, Silverberg 1989).

Des Weiteren haben das Alter und der klinische Allgemeinzustand Auswirkungen auf das Überleben, so haben Patientinnen mit einem Karnofsky-Index (KI) >70% eine längere Überlebenszeit als Patientinnen mit einem KI <70% (AWMF 2002, Bender 2003, Omura et al. 1991). Es hat sich gezeigt, dass mit dem Alter nicht nur die Häufigkeit maligner Ovarialtumore zunimmt, sondern auch ihre maligne Potenz (Bender 2003).

Dahingegen haben der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus als auch der postoperative CA 12-5-Verlauf nur einen geringen Einfluss auf die Prognose.

Bei den Borderline-Tumoren haben das Tumorstadium und das Lebensalter die größte prognostische Bedeutung. Prognose verbessernd ist allerdings auch bei diesen Tumoren ein möglichst geringer postoperativer Tumorrest (AWMF 2002). Mehrere Studien zeigen, dass Patientinnen die in spezialisierten Zentren von gynäkologischen Onkologen betreut wurden, häufiger und früher nach den chirurgischen Richtlinien der FIGO operiert wurden und anschließend eine Chemotherapie erhielten, als solche, die von nicht spezialisierten Gynäkologen behandelt wurden (Vernooij et al. 2007, Earle et al. 2006, Chan et al. 2007).

Die 5-Jahres-Überlebensrate beim Ovarialkarzinom ist mit insgesamt <40% relativ gering, da sehr viele Patientinnen bereits bei Diagnosestellung in fortgeschrittene Stadien einzuordnen sind (Tab. 5). Dahingegen haben Patientinnen mit gutartigen- bzw. Borderline-Tumoren eine sehr gute Prognose. Die 15-Jahres-Überlebensrate der Borderline-Tumore beträgt bei den serösen 87% und bei den muzinösen 85% (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

Tabelle 5: 5-Jahresüberlebensraten (FIGO Annual Report 1998)

FIGO Stadium	5-Jahres-Überlebensrate (in %)	Häufigkeit (in %)
Ia	86,9	27,7
Ib	71,3	
Ic	79,2	
IIa	66,6	11,0
IIb,c	55-57	
IIIa	41,1	44,7
IIIb	24,9	
IIIc	23,4	
IV	11,1	16,6

Es gibt ebenfalls eine Korrelation zwischen dem verbliebenen Tumorrest nach Operation und der Überlebenszeit. In Bezug auf die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt diese bei einem Tumorrest <2 cm 32,5%, somit liegt das mediane Überleben bei 31-37 Monaten und bei einem Tumorrest >2 cm fällt sie auf 13,1%, bzw. 21 Monate, dies zeigt die Bedeutung der radikalen Operation (Schmidt-Matthiesen et al. 2002, Hoskins et al. 1994).

Im Finalstadium tritt der Tod in der Regel durch Komplikationen ein, diese sind zumeist ein Ileus oder die Urämie. Das Finalstadium erfordert ein gutes Management der Patientinnen durch den Arzt, die Pflegekräfte und die Angehörigen. Eine adäquate Schmerztherapie und ggf. der Einsatz von Psychopharmaka und anderen Medikamenten ist unerlässlich (Schmidt-Matthiesen et al. 2002).

1.2. Die AP-1-Faktoren

Der AP-1-Komplex, „activating protein 1“, umfasst 7 Transkriptionsfaktoren, die in die Gruppe der Jun-Proteine, bestehend aus c-Jun, Jun B und Jun D und in die Gruppe der Fos-Proteine, bestehend aus c-Fos, Fos B, Fra 1 und Fra 2 unterteilt werden. Die AP-1 Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung, der Proliferation der onkogenen Transformation und der Apoptose durch die Regulation der Expression von vielen verschiedenen Zielgenen (Mechta-Grigoriou et al. 2001, Jochum et al. 2001).

Die Stimulation der AP-1-Faktoren erfolgt durch Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF), Zytokine (TNF α , IL-1), Tumor Promoter, Karzinogene (UV-Licht) und erhöhte Expression von Oncogenen (src, ras) (Angel et al. 1991).

Aufgrund der schnellen und hohen transkriptionalen Aktivierung nach Stimulation der Zelle werden die AP-1-Komplexe auch „immediate early genes“ genannt (Mechta-Grigoriou et al. 2001).

In den Zellen liegen die AP-1-Faktoren als Homo- und Heterodimere vor, so können die Jun-Proteine Homodimere untereinander und Heterodimere mit den Fos-Proteinen bilden, wohingegen die Fos-Proteine nur Heterodimere bilden können (Angel et al. 1991, Lallemand et al. 1997, Karin et al. 1997). Die Bindung erfolgt über die „leucine zipper region“, an der durch hydrophobe Wechselwirkung der Leucin-Seitenketten die Dimerbindung von zwei Faktoren entsteht (Ransone et al. 1989, Curran et al. 1988).

Die Dimere sind in der Lage an einen bestimmten DNA-Abschnitt (TRE = 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) responsive element) zu binden. Dieser weist die Sequenz 5'-TGAG/CTCA-3' auf (Angel et al. 1991, Shaulian et al. 2001). Diese AP-1-Bindungsstelle findet sich in zahlreichen Promotorregionen von unterschiedlichen Zielgenen. Durch die Bindung eines AP-1-Komplexes kommt es zur positiven oder negativen Regulation von unterschiedlichen Zielgenen und deren Transkription.

Die Bildung von Heterodimeren durch die AP-1-Faktoren beeinflusst ihre Fähigkeit DNA zu binden ebenso wie die Erkennung durch Proteinkinasen und andere Enzyme (Karin et al. 1997). Jun-Fos-Heterodimere besitzen eine stärkere DNA-Bindungsaktivität verglichen mit Jun-Jun-Homodimeren. Die Bildung eines Jun-Fos-Heterodimers führt so zu einem potenteren Transaktivator, bedingt durch die bessere Stabilität der Heterodimere und die längere Halbwertszeit der Jun-Fos-DNA-Komplexe im Vergleich mit Jun-Jun-DNA-Komplexen. (Angel et al. 1991, Ryseck et al. 1991).

Die Regulation der AP-1-Aktivität aufgrund von extrazellulären Stimuli ist einerseits auf der Ebene der Transkription der Gene, andererseits auch durch posttranslationale Modifikation, insbesondere Phosphorylierung der vorhandenen AP-1-Proteine möglich (Angel et al. 1991, Mechta-Grigoriou et al. 2001, Karin 1995 b, Karin 1998). Dies beeinflusst die Proteinstabilität, DNA-Bindungsaktivität und das Transaktivierungspotential der Transkriptionsfaktoren (Gruda et al. 1994, Hurd et al. 2002, Rosenberger et al. 1999).

1.2.1. Funktion der AP-1-Proteine in normalen und Tumorzellen

Die AP-1-Faktoren scheinen an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt zu sein, da Beobachtungen eine Induktion von AP-1 durch mitogene Stimulation zeigten. Des Weiteren konnten bestimmte Expressionsmuster von verschiedenen Fos- und Jun-Proteinen während des Zellzyklus gezeigt werden (Angel et al. 1991, Lallemand et al. 1997). Die Analysen von Zellkulturen und Tierversuchen beweisen, dass c-Jun und c-Fos wachstumsfördernde Komponenten der AP-1-Faktoren sind, wohingegen Jun B ein negativer Regulator der Zellproliferation ist. Jun D weist eine sehr komplexe Rolle im Rahmen der Zellproliferation auf (Shaulian et al. 2001).

C-Jun ist ein positiver Regulator des Zellzyklus, das heißt die c-Jun-Expression in Zellen fördert deren Eintritt in den Zellzyklus (Mechta-Grigoriou et al. 2001). Auch bei Zerstörung von DNA, z.B. durch UV-Bestrahlung, ist nach deren Reparatur c-Jun für den Wiedereintritt in den Zellzyklus notwendig (Shaulian et al. 2000). Somit ist c-Jun essentiell für die normale Entwicklung von Zellen (Johnson et al. 1993, Kerpola 1996). Die wichtigsten Zielgene von c-Jun im Rahmen der Zellzyklusregulation sind Cyclin D1 und p53. Cyclin D1 ist ein positiver Wachstumsregulator, dieser wird nach Überexpression von c-Jun vermehrt transkribiert (Bakiri et al. 2000). P53 hingegen ist ein negativer Wachstumsregulator, der durch c-Jun in der Expression und zusätzlich in seiner Fähigkeit, andere Zielgene zu aktivieren, gehemmt wird (Shaulian et al. 2000).

Jun B und D hingegen sind negative Regulatoren des Zellzyklus. Eine hohe Expression dieser Proteine in Fibroblasten verlangsamt die Zellteilung (Mechta-Grigoriou et al. 2001).

Der negative Effekt von Jun B in Bezug auf die Proliferation von Zellen hängt mit der Induktion von Inhibitoren des Zellzyklus zusammen, wie z.B. TGF β (Chaloux et al. 1998). Eine Überexpression von Jun B in Fibroblasten verzögert den Übergang von der G1 zur S Phase. Jun B scheint die c-Jun induzierte Expression von cyclin D1 zu antagonisieren und zu reduzierten Cyclin D1-Leveln zu führen (Bakiri et al. 2000). Die Funktion von Jun D in der Kontrolle der Proliferation ist abhängig vom zellulären Kontext. Es scheint, dass Jun D Zellen vor Seneszenz schützt, durch Modulation der Signalketten, die ras und p53 verbinden (Jochum et al. 2001).

Für den Zellzyklus sind c-Fos, Fos B und Fra 1 entbehrlich, da Fibroblasten und embryonale Stammzellen ohne diese Komponenten keine Defekte in der Proliferation zeigen (Field et al. 1992, Gruda et al. 1996, Schreiber et al. 2000). Keines der Fos-Proteine ist allein essentiell für die Zellproliferation, allerdings führt die Neutralisation aller zu einer Blockade der Zellproliferation (Piechaczyk et al. 1994).

Die AP-1-Proteine c-Jun und c-Fos zeigen als Antwort auf eine onkogene Signalkaskade in einer großen Zahl von Tumoren und transformierten Zelllinien eine hohe Aktivität. Experimente, die die AP-1-Aktivität inhibieren, zeigen ihre kritische Rolle in der onkogenen Transformation (Ozanne 2000, Eferl et al. 2003, Milde-Langosch 2005). Deregulierte AP-1-Aktivität allein scheint bereits ausreichend für eine neoplastische Transformation zu sein (Ozanne et al. 2007).

C-Jun ist das zelluläre Homolog von v-jun, dem transformierenden Onkogen des Avian-Sarcoma-Virus 17 (Maki et al. 1987). C-Jun kann zu onkogener Transformation in Säugetierzellen führen, wenn es mit aktivierten Onkogenen wie ras oder src zusammen exprimiert wird (Schütte et al. 1989b). Jun B und D wiesen hingegen keine transformierende Aktivität auf (Castelazzi et al. 1991). Versuche mit Fibroblasten haben gezeigt, dass eine ektopische Expression von Jun B und D die onkogene Transformation durch aktiviertes ras inhibiert. Dies weist darauf hin, dass Jun B und D als Anti-Onkogene auftreten (Pfarr et al. 1994, Schütte et al. 1989a) und somit einen ausgleichenden Effekt auf c-Jun besitzen (Mechta-Grigoriou et al. 2001).

Im Rahmen der Tumorprogression könnte eine Inaktivierung von Jun B und D stattfinden, um eine verstärkte c-Jun-Expression zu ermöglichen (Angel et al. 1991).

C-Fos ist das zelluläre Homolog zu v-fos, dem transformierenden Onkogen der murinen Osteosarkomaviren FBJ-MuSV und FRB-MuSV (Curran et al. 1983). Die onkogene Aktivität von c-Fos ist abhängig von der Bildung von Heterodimeren mit Jun-Proteinen und der Bindung an die DNA (Schuermann et al. 1989). Zusätzlich sind eine bestimmte Dauer der c-Fos-Expression, sowie die Aktivität der DNA-5-Methylcytosin-Transferase notwendig (Miao et al. 1994, Bakin et al. 1999).

Onkogenes Potential wurde auch für Fos B und Fra 1 demonstriert (Kovary et al. 1991, Kustikova et al. 1998). Die onkogene Aktivität von Fos B konnte allerdings nur in vitro an Fibroblasten gezeigt werden (Schuermann et al. 1991), nicht aber bei in vivo Versuchen mit transgenen Mäusen (Grigoriadis et al. 1993). Die transformierende Aktivität von Fra 1 und 2 ist im Vergleich zu c-Fos und Fos B schwach (Jochum et al. 2001). Ursache ist das Fehlen der c-terminalen Transaktivierungsdomäne bei Fra 1 und 2 (Wisdom et al. 1993). Somit konnte kein transformierendes Potential für Fra 1 und 2 bei deren Überexpression in 208F-Fibroblasten nachgewiesen werden (Wisdom et al. 1993). Allerdings führte die Überexpression von Fra 2 in Fibroblasten von Hühnerembryonen, ähnlich c-Fos, zu zellulärer Transformation (Nishina et al. 1990).

AP-1-Aktivität ist an der Regulation der Invasion in menschlichen metastatischen Tumoren beteiligt (Ozanne et al. 2007). Die AP-1-Transkriptionsfaktoren scheinen notwendig für die onkogene Invasion zu sein. Sie regulieren Effektoren der Invasion, wie MMP9, CD44, Ezrin und Krp1, gleichzeitig supprimieren sie Inhibitoren der Invasion wie TSC-36, Fibronektin und STAT6 (Ozanne et al. 2007).

Die ektope Expression von c-Fos in Epithelzellen der Mamma bewirkt einen Verlust der Polarität des Epithels, epitheloide-fibroblastoide Zellkonversion und invasives Wachstum in Kollagengel. Dies ist ein Hinweis auf die Fähigkeit von c-Fos das invasive Wachstum von Tumorzellen zu modulieren (Reichmann et al. 1992). Im Gegensatz dazu bewirkt eine c-Jun-Überexpression in denselben Mammazellen nur einen Verlust der epithelialen Polarität, aber kein invasives Wachstum (Fialka et al. 1996). Fra 1 scheint wiederum invasives Wachstum zu fördern. So haben Mammaadenokarzinom-Zelllinien, die Fra 1 überexprimieren, eine verstärkte Motilität und Invasivität in vitro gezeigt (Kustikova et al. 1998).

AP-1 ist an Apoptoseprozessen von Zellen beteiligt, welche durch den Entzug von Wachstumsfaktoren oder genotoxischen Stress induziert wurden (Shaulian et al. 2001). Während der normalen Entwicklung in vivo sind aber weder c-Jun noch c-Fos essentiell für den Zelltod (Roffler-Tarlov et al. 1996).

C-Jun scheint abhängig vom Zelltyp und der Signalkette sowohl einen fördernden als auch einen hemmenden Einfluss auf die Apoptose zu haben (Karin et al. 1997). So ist eine c-Jun-Aktivität notwendig bei Formen der Apoptose, die eine de-novo-Synthese von Proteinen benötigen (Karin et al. 1997).

Auch Jun B scheint den programmierten Zelltod durch Unterdrückung von Apoptose hemmenden Genen zu unterstützen (Jochum et al. 2001). Dahingegen ist Jun D an Apoptose hemmenden Wegen beteiligt (Jochum et al. 2001).

C-Fos scheint während der embryonalen Entwicklung Gewebeveränderungen zu begünstigen. Als Antwort auf Stress fördert c-Fos Signalketten die zum Zelltod führen (Jochum et al. 2001).

1.2.2. Regulation der AP-1-Proteine

C-Jun wird in vielen Zellen auf einem niedrigen Basislevel exprimiert, und die Expression steigt aufgrund von vielen Stimuli, z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen und UV-Strahlung an (Karin et al. 1995 a, Hill et al. 1995, Karin et al. 1995 b). Jun D zeigt in vielen Geweben eine hohe basale Expression, Jun B hingegen kann eine hohe oder niedrige Expression aufweisen (Hirai et al. 1989, Mechta-Grigoriou et al. 2001).

C-Jun besitzt das höchste Aktivierungspotential der Jun-Proteine (Ryseck et al. 1991) und ist in der Lage die eigene Transkription positiv zu stimulieren (Sassone-Corsi et al. 1988, Schönthal et al. 1989). In Verbindung mit c-Fos verstärkt sich das Aktivierungspotential nochmals durch die Bildung eines stabileren Heterodimers (Angel et al. 1991).

C-Jun weist eine Bindungsstelle für die Jun-N-Terminal-Kinase (JNK) auf, diese phosphoryliert die Serine 63 und 73 und führt zu einer Verstärkung der Stabilität und Fähigkeit zur transkriptionalen Aktivierung (Smeal et al. 1991).

Jun B besitzt ebenfalls eine JNK-Bindungsstelle, aber es fehlen die N-terminalen Serinseitenketten (Chiu et al. 1989). Jun D besitzt keine JNK-Bindungsstelle und kann nicht von der JNK phosphoryliert werden, allerdings ist eine Phosphorylierung in c-Jun-Jun D-Dimeren möglich (Kallunki et al 1996).

Somit sind Jun B- und Jun D-Homodimere schwächere Transaktivatoren und sie sind zusätzlich in der Lage, das Transaktivierungspotential von c-Jun zu unterdrücken (Schütte et al. 1989a, Hirai et al. 1989, Chiu et al. 1989, Angel et al. 1991). Die negative Regulation ist für die normale Zellfunktion sehr wichtig, da c-Jun durch Überexpression zu neoplastischer Transformation führen kann (Schütte et al. 1989b).

Die Regulation der Funktion der Fos-Faktoren erfolgt ebenfalls über posttranslationale Modifikation mittels Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen, z.B. MAPK, PKA, PKC, etc. (Gruda et al. 1994, Hurd et al. 2002, Rosenberger et al. 1999).

In den meisten Zellen sind die Basislevel an c-Fos-mRNA und Protein niedrig. Die Induktion der c-Fos-mRNA-Expression erfolgt sehr schnell (nach 5 min), ist allerdings nur von kurzer Dauer (Cohen et al. 1988). Des Weiteren kann die c-Fos-mRNA-Expression in Anwesenheit von Proteinsynthesehemmern induziert werden, diese scheinen die Stabilität der Transkripte zu erhöhen (Müller et al. 1984).

Die Transkription von c-Fos wird, im Gegensatz zu c-Jun, durch c-Jun und c-Fos gehemmt, somit führt eine Überexpression von c-Fos zu einem schnellen Abfall des Basallevels der c-Fos-Transkription (Sassone-Corsi et al. 1988, Schönthal et al. 1989). Die verschiedene Regulation von c-Jun und c-Fos hängt damit zusammen, dass die c-Fos-Induktion nach Stimulierung der Zelle einen schnellen Anstieg der transkriptionalen Aktivität der Zelle bewirken soll, wohingegen c-Jun für eine fortwährende Aktivität bestimmter Gene zu sorgen hat, um so bspw. die Progression von der G1-Phase des Zellzyklus zur S-Phase zu gewährleisten (Angel et al. 1991).

Die transaktivierende Funktion von c-Fos ist in dessen C-terminaler Region lokalisiert. Diese fehlt bei Fra 1 und 2 (Nguyen et al. 1992). Versuche mit chimären Proteinen zeigten, dass ein Protein mit der N-terminalen Hälfte von c-Fos und der C-terminalen Hälfte von Fra 1 eine ebenso niedrige Aktivität wie Fra 1 aufwies, während ein Protein bestehend aus der N-terminalen Hälfte von Fra 1 und der C-terminalen Hälfte von c-Fos fast so aktiv war wie c-Fos. Das gleiche gilt für Fra 2 (Yoshioka et al. 1995, Suzuki et al. 1991).

Der AP-1-Faktor Fos B ist mit einer Homologie von 70% c-Fos sehr ähnlich. So zeigt auch Fos B eine schnelle Induktion und eine kurze Halbwertszeit der mRNA, wie es typisch ist für „immediate-early-genes“ (Zerial et al. 1989). Des Weiteren besitzt Fos B ebenfalls eine C-terminale Transaktivierungs-Domäne, und die transkriptionale Aktivität und Stabilität der mRNA werden durch die Anwesenheit von Proteinsyntheseinhibitoren erhöht (Zerial et al. 1989).

Während die c-Fos- und Fos B-Transkription sehr schnell induziert wird, erfolgt die Induktion der Fra 1- und Fra 2-Expression verzögert (nach 30 bis 60 min) und die Proteine sind stabiler (Milde-Langosch 2005, Cohen et al. 1988). Die basale Expression von Fra 1 ist niedrig (Cohen et al. 1988).

AP-1-Komplexe, die Fra 1 und 2 enthalten, besitzen ein niedriges Transaktivierungspotential (Suzuki et al. 1991). Fra 1 und Fra 2 scheinen als negative Regulatoren zu wirken, die die Dauer der AP-1-Aktivität begrenzen (Wisdom et al. 1993). In Transfection-assays wurde gezeigt, dass sie die c-Fos und c-Jun bedingte Transaktivierung unterdrücken (Suzuki et al. 1991).

Heterodimere von Fra 2 und c-Jun unterdrückten die Transaktivierung von c-Jun allein in der Mäuseembryonenkarzinom-Zelllinie F9. Dies steht im Gegensatz zu c-Fos, welches die c-Jun-Aktivität fördert (Suzuki et al. 1991). Der unterdrückende Effekt von Fra 2 wurde allerdings nicht in Kombination mit Jun D beobachtet.

Heterodimere aus Fra 2 und Jun D hatten eine höhere transkriptionale Aktivität als Jun D-Homodimere. AP-1-Komplexe aus Fra 2 und Jun D sind stabiler als Jun D-c-Fos-Heterodimere, haben allerdings ein niedrigeres Transaktivierungspotential (Suzuki et al. 1991, Ryseck et al. 1991).

C-Fos verstärkt die transaktivierende Aktivität von Jun D, c-Jun und Jun B deutlich. Fra 1 und 2 verstärken ebenfalls die transaktivierende Aktivität von Jun B und D, allerdings sehr viel geringer als c-Fos. Dahingegen hemmen sie die transaktivierende Aktivität von c-Jun. Dies zeigt, dass Fra 1 und 2 in der Lage sind die transaktivierende Aktivität der Jun-Proteine zu modulieren, abhängig vom Partner mit dem sie ein Heterodimer bilden (Suzuki et al. 1991).

1.3. Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit

Im praktischen Teil dieser Arbeit wurde die Expression der AP-1-Proteine der Jun- und Fos-Familie in Ovarialtumoren verschiedener Histologie, als auch in normalen Ovarien, mit Hilfe der Western-Blot-Analyse und der Immunhistochemie untersucht.

Es bestanden folgende Fragestellungen:

Korreliert die Expression bestimmter AP-1-Faktoren mit den klinisch-pathologischen Parametern (Gewebetyp, Grading, FIGO-Stadium, Histologie, Alter)?

Welche Unterschiede zeigen sich in der Expression der AP-1-Faktoren im Vergleich von gutartigen Tumoren, Borderline-Tumoren, Metastasen und Karzinomen?

Weisen zusammengehörende Primärkarzinome und Metastasen eine ähnliche Expression der AP-1-Faktoren auf?

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Darstellung des Patientenkollektivs

Die Untersuchung fand an 60 Operationspräparaten statt, die in einem Zeitraum von 1993 bis 2003 am Universitätsklinikum Eppendorf gesammelt wurden. Die Operationspräparate wurden zum Teil bei -80°C eingefroren und zum Teil in Paraffin eingebettet. Letzteres erlaubte die Anfertigung von Schnitten, die der Beurteilung des histologischen Typs und des Gradings dienen. Die Einteilung der Karzinome nach der FIGO-Klassifikation erfolgte anhand des makroskopisch-pathologischen Befundes aller bei der Operation entfernten Gewebe (u.a. Lymphknoten, Darmbiopsien, etc.) als auch der zytologischen Untersuchungen von Aszites bzw. Spülflüssigkeit.

Es wurden 29 primäre Ovarialkarzinome, 2 Tubenkarzinome, 4 Borderline-Tumore und 8 gutartige Tumore untersucht. Des Weiteren wurden 13 Metastasen primärer Ovarialkarzinome untersucht, die zum Teil zu den untersuchten Primärkarzinomen gehörten. Zusätzlich wurden zum Vergleich 4 Normalgewebe untersucht, die ebenfalls aus den Operationspräparaten der Primärtumoren stammten, aber tumorfrei waren.

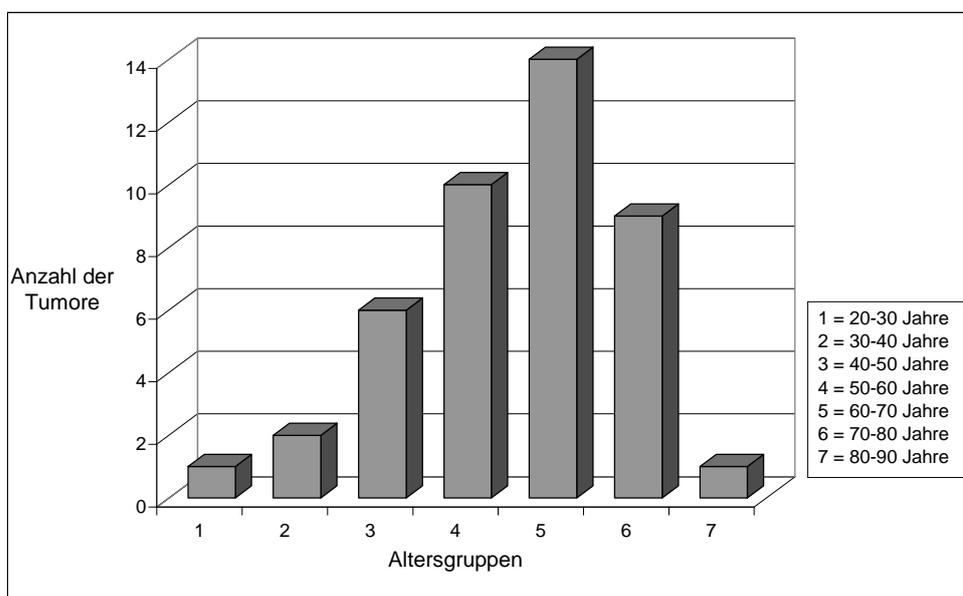


Abbildung 1: Alter der Tumorpatientinnen

Die Altersverteilung der Tumorpatientinnen ist in der Abbildung 1 dargestellt. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Operation 27 Jahre und die älteste Patientin 83 Jahre alt. Der Altersdurchschnitt der Patientinnen mit einem Karzinom lag bei 63,5 Jahren, bei den Frauen, die einen gutartigen Tumor hatten, bei 51 Jahren.

2.1.2. Darstellung des Untersuchungsgutes

Die histologische Begutachtung der Operationspräparate ergab 21 serös-papilläre, 3 endometrioid, 3 muzinöse und 2 serös-klarzellige primäre Ovarialkarzinome und 2 serös-papilläre Tubenkarzinome. Die Borderline-Tumore unterteilten sich in 3 serös-papilläre und 1 muzinösen. Als gutartige Tumore wurden 4 Brennertumore und 4 muzinöse Zystadenome zusammengefasst.

Das Grading der Karzinome ergab 3 hochdifferenzierte (G 1), 8 mäßig differenzierte (G 2) und 19 gering differenzierte (G 3) Karzinome. Ein Tumor wurde nicht eindeutig differenziert und wurde als G 1-2 beurteilt.

Die Stadieneinteilung nach FIGO ergab 2 Tumore als Stadium Ia, 3 Tumore als Stadium Ic, 2 Tumore als Stadium IIa, jeweils einen Tumor der Stadien IIIa und IIIb, 12 Tumore als Stadium IIIc und 10 Tumore als Stadium IV.

Tabelle 6: untersuchte Primärkarzinome

Nr.	Fallnummer	Histologie	Alter	Grading	Staging
Ovarialkarzinome					
1	O-01	serös-papillär	34	2	IIIc
2	O-02	serös-papillär	74	2	IIa
3	O-03	endometrioid	44	2	IIIa
4	O-04	serös-papillär	69	3	IIIc
5	O-05	serös-papillär	70	3	IV
6	O-06	serös-papillär	59	1	IIIb
7	O-07	serös-papillär	63	3	IIIc
8	O-08	serös-papillär	67	3	IIa
9	O-09	serös-solide	59	3	IIIc
10	O-10	seromuzinös	76	1	Ic
11	O-11	papillär z. T. endometrioid	61	2	IIIc

12	O-12	serös-papillär	59	3	IIIc
13	O-13	serös-papillär	46	2	IV
14	O-14	serös-klarzellig	67	3	IV
15	O-15	serös-papillär	73	3	IV
16	O-16	serös-papillär	63	3	IIIc
17	O-17	serös-papillär	63	3	Ic
18	O-18	serös-papillär	66	3	IV
19	O-19	serös-papillär	50	3	IIIc
20	O-21	muzinös	83	1	Ic
21	O-22	serös-papillär	70	3	IV
22	O-23	endometrioid	73	2	Ia
23	O-24	serös-papillär	65	3	IV
24	O-25	serös-papillär	73	3	IIIc
25	O-26	serös-papillär	27	1-2	IIIc
26	O-27	serös-klarzellig	52	3	IV
27	O-28	muzinös	47	2	IV
28	O-29	serös-papillär	49	2	IIIc
29	O-30	papillär	68	3	IIIc
Tuben Karzinome					
1	O-37	serös-papillär	68	3	IV
2	O-38	serös-papillär	79	3	Ia

Tabelle 7: untersuchte Metastasen

Nr.	Fallnummer	Histologie	Alter	Grading
Metastasen				
1	O-04 M	serös-papillär	69	3
2	O-05 M	serös-papillär	70	3
3	O-07 M	serös-papillär	63	3
4	O-19 M	serös-papillär	50	3
5	O-22 M	serös-papillär	70	3
6	O-24 M	serös-papillär	65	3
7	O-27 M	serös-klarzellig	52	3
8	O-28 M	muzinös	47	2
9	O-31 M	serös-papillär	57	3
10	O-32 M	muzinös	62	
11	O-33 M	papillär	67	3

12	O-34 M	papillär	78	3
13	O-35 M	serös-papillär	56	3

Tabelle 8: weitere untersuchte Tumore

Nr.	Fallnummer	Histologie	Alter
Borderline-Tumore			
1	O-32	muzinös	62
2	O-36	serös-papillär	60
3	O-46	serös-papillär	52
4	O-47	serös-papillär	56
Gutartige Tumore			
1	O-39	Brenner-Tumor	45
2	O-40	Brenner-Tumor	62
3	O-41	Brenner-Tumor	70
4	O-42	muzinöses Zystadenom	58
5	O-43	Brenner-Tumor	50
6	O-44	muzinöses Zystadenom	51
7	O-45	muzinöses Zystadenom	30
8	O-48	muzinöses Zystadenom	43

Tabelle 9: untersuchte Normalgewebe

Nr.	Fallnummer	Histologie	Alter
Normalgewebe			
1	O-04 N	Normalgewebe (Ovar)	69
2	O-05 N	Normalgewebe (Ovar)	70
3	O-20 N	Normalgewebe (Ovar)	42
4	O-36 N	Normalgewebe (Ovar)	60

2.1.3. Verwendete Chemikalien

2.1.3.1. Western-Blot

Tabelle 10: Chemikalien Western-Blot

Chemikalien	Hersteller
Western-Blot	
AA/BAA (AcrylamidBisAcrylamid) (37:1)	Sigma
APS (Ammoniumpersulfat)	BioRad Laboratories
BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce
◦ Reagent A	◦ 23228
◦ Reagent B	◦ 1859078
Blocking reagent	Roche Diagnostics GmbH
Bromphenolblau	Sigma
Glycerin	Merck
Glycin	Carl Roth GmbH & Co
Maleinsäure	SERVA Electrophoresis GmbH
2-Mercaptoethanol	BioRad Laboratories
Methanol	Merck
Milchpulver	Bio-Rad Laboratories
NaCl (Natriumchlorid)	Mallinckrodt Baker B.V.
NaOH (1 Mol) (Natronlauge)	Merck
NaOH (Plätzchen)	Mallinckrodt Baker B.V.
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Reblot Plus Mild Solution	Chemicon International
Saccharose	Merck
Salzsäure (25 %) (HCL)	Riedel de Haen, Sigma Aldrich Labor-chemikalien GmbH
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Fluka Bio Chemika
Super Signal West Pico Chemiluminescent Kit	Pierce
◦ Stable Peroxide	
◦ Luminol / Enhancer	
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	SERVA Feinbiochemica
Thimerosal	Sigma Aldrich Co/Chemie GmbH
Tricine	Sigma
Tris – TRIZMA BASE	Sigma

TWEEN 20	Merck – Schuchardt
----------	--------------------

2.1.3.2. Immunhistochemie

Tabelle 11: Chemikalien Immunhistochemie

Chemikalien	Hersteller
Immunhistochemie	
Chem Mate™ ◦ Antikörper-Verdünner	Dako Cytomation, S 2022
Chem Mate™ Detection Kit ◦ A – biotinylierter Sekundärantikörper ◦ B – Streptavidin-Peroxidase ◦ C – DAB (Diaminobenzidin) & Chromogen (x50) ◦ D – HRP-Substrat-Puffer (Horseradish-Peroxidase)	Dako Cytomation, K 5001
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
Hämalaun nach Mayer	Merck
NaCl	Mallinckrodt Baker B.V.
Natriumcitrat	Merck
Salzsäure (25%)	Riedel de Haen, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH
Tris – TRIZMA BASE	Sigma
TWEEN 20	Merck – Schuchardt
Xylol	Riedel de Haen

2.1.4. Verwendete Antikörper und Marker

Tabelle 12: Antikörper und Marker

Antikörper, Marker	Hersteller
Primärantikörper	
Anti-c-Fos (H250)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Fos B (D180)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Fra 1 (H220)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Fra 2 (G101)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Jun B (I1302)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Jun D (A040)	Santa Cruz Biotechnology

Mit Hilfe eines Stößels wurde das Gewebe homogenisiert und die Proteine in der Pufferlösung gelöst. Die entstandene Proteinlösung wurde in vorgekühlte sterile Eppendorfgefäße pipettiert und auf Eis gestellt.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Lösungen für 3 min bei 13000 UPM (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert, dabei setzte sich ungelöstes Material am Boden ab. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße in Aliquots von jeweils 0,5 ml überführt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2. Proteinbestimmung

Zur photometrischen Proteinkonzentrationsmessung wurden die Proteinlösungen auf Eis aufgetaut. Zur Messung benötigt man von jeder Probe zwei Ansätze (Doppelversuch), diese bestehen aus 10 µl Proteinlösung und 100 µl pcsb1-Pufferlösung.

Der BCA-Protein-Assay-Kit setzt sich aus den Lösungen A und B zusammen, welche im Verhältnis 50:1 gemischt wurden.

BCA-Arbeitslösung: 1 ml Reagent A
20 µl Reagent B

Zu jeder Probe (110 µl) wurde jeweils 1 ml BCA-Arbeitslösung zupipettiert und gut vermischt. Anschließend wurden die Proben und ein Leerwert, bestehend aus pcsb1-Pufferlösung (110 µl) und Arbeitslösung, bei 37°C im Wasserbad für 30 min inkubiert.

Die Extinktionsmessung erfolgte am vorher kalibrierten Eppendorf Bio Photometer bei 562 nm. Das Photometer errechnete aus den Eichwerten (Extinktionswerte der Eichlösungen) eine Eichkurve, anhand dieser wurde der Umrechnungskoeffizient k ermittelt, um die Proteinkonzentration der Extrakte aus den Tumoren zu errechnen.

Zunächst wurde der Leerwert gemessen und als Nullwert festgelegt. Im Anschluss erfolgte die Messung der Proben. Die Abweichung der beiden Ansätze einer Probe sollte nicht mehr als 10 Prozent betragen, sonst wurde die Messung wiederholt. Aus den beiden Parallelansätzen einer Probe wurde der Mittelwert als Proteinkonzentration der Lösung ermittelt.

Zur weiteren Verarbeitung in der Western-Blot-Analyse wurde errechnet, welches Volumen der unterschiedlichen Proteinlösungen 20 µg Protein entspricht.

2.2.3. Western-Blot-Analyse

2.2.3.1. Probenvorbereitung

In vorbereitete kleine Eppendorfgefäße wurde nach den Berechnungen (20 µg Protein = x µl Proteinlösung) die entsprechende Menge Proteinlösung pipettiert und mit pcsb 1-Pufferlösung auf 25 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden jeweils 25 µl pcsb 2-Pufferlösung zu jeder Probe gegeben.

Nach dem gleichen Prinzip wurde eine Positivkontrolle vorbereitet, die bei jedem Western-Blot mitgeführt wurde. Es wurden Proteine aus Zelllinien gewählt: für Fos B MCF-7 und für die anderen AP-1-Faktoren MDA-MB 231. Analog zu den Proteinlösungen wurde der Molekulargewichtsmarker (6 µl Marker plus 19 µl pcsb1 plus 25 µl pcsb 2) vorbereitet, somit konnte später das Molekulargewicht der Proteinbanden abgeschätzt werden.

pcsb 2-Pufferlösung:

15 ml	20 % Saccharose
3 ml	0,5 M Tris (pH 6,8)
9 ml	10 % SDS
3 mg	Bromphenolblau
3 ml	2-Mercaptoethanol

Anschließend wurden die Proben kurz durchgemischt und für 1 min bei 13000 UPM zentrifugiert. Im PCR-Gerät erfolgte die Denaturierung der Proteine, wobei die Proben für 5 min auf 99°C erhitzt wurden und dann bei Zimmertemperatur bis zur Elektrophorese aufbewahrt wurden.

2.2.3.2. Herstellung des Trenn- und Sammelgels

Zur Herstellung des Trenn- und Sammelgels benötigte man eine Vorrichtung, die aus einem Fußteil, zwei Glasplatten, zwei Spacern (diese halten die Glasplatten im gewünschten Abstand) und Klammern, welche die Glasplatten zusammenhalten, bestand. Die Glasplatten und die Spacer wurden zunächst mit Ethanol gereinigt und dann zusammengesetzt und mit den Klammern befestigt. Das Fußteil wurde mittels einer Wasserwaage austariert.

Zunächst wurde das Trenngel hergestellt und gegossen (Tab. 13). Es wurde ein 10%iges Trenngel gewählt und aus den angegebenen Mengen jeweils zwei Gele hergestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenngels

10%iges Trenngel:	4 g	Glycerin
	8,5 ml	steriles Aqua dest.
	10 ml	Gelpuffer
	7,5 ml	AA/BAA
	150 µl	10% APS
	15 µl	TEMED

Gelpuffer (3x): 181,7 g Tris (3 M)
auf 400 ml mit Aqua dest. auffüllen
pH 8,45 mit 25% HCL einstellen
auf 485 ml mit Aqua dest. auffüllen
15 ml 10% SDS

Nach Zugabe von TEMED und APS wurde das Gel in die Gelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation des Geles war nach ca. 30 min abgeschlossen.

Anschließend erfolgte die Herstellung des Sammelgeles, welches dem Einfüllen und Sammeln der Proteinproben dient (Tab14). Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen und zur Unterteilung der 20 Taschen benötigte man einen Kamm, der gereinigt in die Gelgieß-Vorrichtung eingesetzt wurde.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Sammelgels

10%iges Sammelgel:	11,9 ml	steriles Aqua dest.
	4,7 ml	Gelpuffer
	2,3 ml	AA/BAA
	225 µl	APS
	22,5 µl	TEMED

Die Zwischenräume des Kammes wurden komplett mit Sammelgel aufgefüllt und das Gel musste 30 bis max. 45 min auspolymerisieren.

Nach dem Polymerisieren wurde der Kamm entfernt und das komplette Gel, bestehend aus Trenn- und Sammelgel war fertig.

2.2.3.3. Elektrophorese

Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurde die Kathodenkammer auf die Glasplatten mit den Gelen aufgesetzt und befestigt. Der Fußteil der Gießvorrichtung wurde gelöst und die Kathodenkammer wurde mit Kathodenpuffer befüllt.

Kathodenpuffer:

Stammlösung (10x): 121,14 g Tris (1 M)
 179,2 g Tricine (1 M)
 auf 800 ml mit Aqua dest. auffüllen
 pH 8,25 mit 25% HCL einstellen
 auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Gebrauchslösung: 70 ml Stammlösung
 7 ml 10% SDS
 auf 700 ml mit Aqua dest. auffüllen

Die Elektrophoresekammer wurde mit Anodenpuffer gefüllt.

Anodenpuffer:

Stammlösung (10x):	242,28 g	Tris (2 M)
	auf 800 ml	mit Aqua dest. auffüllen
	pH 8,9	mit 25% HCL einstellen
	auf 1000 ml	mit Aqua dest. auffüllen

Gebrauchslösung:	400 ml	Stammlösung
	3600 ml	Aqua dest.
	4 ml	5% Thimerosal

Nun wurden die Gele mit den vorbereiteten Proben befüllt. Es wurde darauf geachtet, dass alle Taschen des Gels beladen wurden, ggf. wurden Leertaschen mit einer Mischung aus pcsb 1 (25 µl) und 2 (25 µl) befüllt.

Die Kathodenkammer wurde in die Elektrophoresekammer (Hoefer SE 600 Standard Vertical Units) eingesetzt, mit einem Deckel verschlossen und mit der Stromeinheit verbunden. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 60 Volt durchgeführt, die Laufzeit betrug im Mittel 18 Stunden.

2.2.3.4. Blotting

Nach Auftrennung der Proteine wurden sie vom Trenngel auf eine haltbare Membran mittels der Transferkammer (Hoefer TE 42 Transphor II Tanks) überführt.

Zuerst wurden die Glasplatten mit den Gelen aus der Elektrophoresekammer entnommen, gesäubert und vorsichtig mit einem Spatel getrennt, die Gele wurden zurechtgeschnitten und mit Wasser abgespült. Das Blotting-Papier (Millipore Co.) wurde zu jeweils drei Bögen zusammen in einer Schale mit Transferpuffer eingeweicht.

Transferpuffer:

Stammlösung (10x): 242,28 g Tris (1 M)
289,78 g Glycin (2 M)
auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Gebrauchslösung: 100 ml Stammlösung
900 ml Aqua dest.

Die hydrophobe Blotting-Membran (Immobilon Transfer Membranes, Millipore Co.) wurde zunächst in Methanol und danach in Aqua dest. geschwenkt, um sie an den hydrophilen Transferpuffer anzupassen und die optimale Aufnahme der Proteine aus dem Gel zu gewährleisten. Anschließend wurde die Membran auf das Gel gelegt und glatt gestrichen, um Luftblasen zu vermeiden.

Das Gel und die Blotting-Membran wurden beidseits von jeweils drei Blättern Blotting-Papier bedeckt. Dieses Paket wurde in einem Gitter befestigt und in die Transferkammer gesetzt, welche ebenfalls mit Transferpuffer gefüllt wurde.

Die Transferkammer wurde verschlossen und an die Stromeinheit angeschlossen, es wurde eine Stromstärke von 400 mA gewählt und die Laufzeit betrug im Mittel 4 Stunden.

2.2.3.5. Blockierung

Nach dem Blotten wurde die Membran entnommen und das Gel entsorgt. Zur Fixierung der Proteine auf der Membran wurde sie erneut in Methanol geschwenkt und für mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur Weiterverarbeitung wurde die getrocknete Membran erneut in Methanol und Aqua dest. geschwenkt und in einer Box mit Blockierungslösung überschichtet.

Für den Nachweis von pc-Jun, Jun B, Jun D, c-Fos, Fos B, Fra 2 und Aktin wurde Blockierungslösung 1 mit Blocking Reagent verwendet. Für Fra 1 wurde Blockierungslösung 2 mit Milchpulver eingesetzt, da so bessere Ergebnisse bei der Detektion erzielt wurden.

Blockierungslösung 1: 23,2 g Maleinsäure (0,1 M)
 17,52 g Natriumchlorid (0,15 M)
 auf 1800 ml mit Aqua dest. auffüllen
 15,5 g NaOH
 pH 7,5 mit NaOH (1 M) einstellen
 20 g Blocking Reagent
 auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Blockierungslösung 2: 1 g 5% Milchpulver
 20 ml TBST (s. u. 2.2.3.6.)

Die überschichtete Membran wurde für ca. 24 Stunden bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen auf der Membran zu sättigen.

Für den Fall, dass die Membran nicht gleich weiterverwendet wurde, konnte sie nach dem Trocknen eingeschweißt und bei -20°C eingefroren werden. Nach dem Auftauen wurde die Membran ebenfalls in Methanol und Aqua dest. geschwenkt und anschließend in Blockierungslösung über Nacht inkubiert.

2.2.3.6. Inkubation mit den Antikörpern

Zur Detektion der gewünschten Proteine wurden spezifische Primär- und Sekundärantikörper eingesetzt. Die Primärantikörper richteten sich gegen die verschiedenen zu untersuchenden AP-1 Faktoren (pc-Jun, Jun B, Jun D, c-Fos, Fos B, Fra 1, Fra 2) und gegen Aktin. Die Sekundärantikörper waren Meerrettich-Peroxidasegekoppelt und richteten sich gegen die Primärantikörper.

Primär- und Sekundärantikörper wurden in jeweiliger Verdünnung mit der Antikörper-Verdünnungslösung versetzt und auf die Membran gegeben (Tab. 15). Die Verdünnungslösung richtete sich nach der Blockierungslösung.

Tabelle 15: Antikörper Verdünnung 1

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-pc-Jun	Maus	1:200	Anti-Mouse	1:8000
Anti-Jun B	Kaninchen	1:100	Anti-Rabbit	1:8000
Anti-Jun D	Kaninchen	1:2000	Anti-Rabbit	1:8000
Anti-c-Fos	Kaninchen	1:1000	Anti-Rabbit	1:8000

Anti-Fos B	Kaninchen	1:200	Anti-Rabbit	1:8000
Anti-Fra 1	Kaninchen	1:400	Anti-Rabbit	1:8000
Anti-Fra 2	Kaninchen	1:800	Anti-Rabbit	1:8000
Anti-Aktin	Ziege	1:10000	Anti-Goat	1:8000

Antikörper-Verdünnungslösung 1: 18 ml TBST
2 ml Blockierungslösung 1

Antikörper-Verdünnungslösung 2: 20 ml TBST
0,3 g Milchpulver

TBS-Stammlösung (10x): 48,44 g Tris (200 mM)
160,12 g Natriumchlorid (1,37 M)
auf 1800 ml mit Aqua dest. auffüllen
pH 7,6 mit 25% HCL einstellen
auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen

TBST-Gebrauchslösung: 100 ml TBS (10x)
900 ml Aqua dest.
5 ml 10% Tween

Die Membran wurde mit den Primärantikörpern für eine Stunde auf dem Taumel-schüttler (Fröbel Labortechnik), der die gleichmäßige Benetzung der Membran gewährleistete, bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten drei 10-minütige Waschgänge mit TBST-Lösung.

Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte nach dem gleichen Ablauf für eine Stunde. Anschließend wurde viermal 10 min mit TBST-Lösung gewaschen.

2.2.3.7. Detektion

Um die mit Antikörper markierten Proteine sichtbar zu machen, verwendete man eine Chemilumineszenz-Reaktion. Der Super-Signal-Kit besteht aus einer Lumi-nol/Enhancer-Lösung und einer stabilen Peroxid-Lösung, diese wurden im Verhältnis 2:1 gemischt und vor Gebrauch frisch zubereitet.

Die Membran wurde mit 20 ml Chemilumineszenz-Lösung für 5 min auf dem Taumelschüttler inkubiert. Die Enhancer-Lösung reagiert mit der Peroxidase des Sekundärantikörpers, wobei Lichtquanten entstehen, die Röntgenfilm schwärzen können. Der Grad der Schwärzung des Röntgenfilms gibt einen Hinweis auf die Menge (Quantität) des entsprechenden Proteins auf der Membran bzw. im untersuchten Gewebe.

Nach der Inkubation wurde die Membran in eine Klarsichtfolie in die Röntgenkassette gelegt und in der Dunkelkammer erfolgte die Belichtung des Röntgenfilms, der anschließend in der Entwicklungsmaschine entwickelt und fixiert wurde. Die Belichtungszeit war für jeden Antikörper unterschiedlich (Tab. 16). Es wurde darauf geachtet, dass bei den verschiedenen Experimenten mit einem Antikörper die gleiche Belichtungszeit gewählt wurde, da nur so die Vergleichbarkeit der Proteinbanden gewährleistet werden konnte.

Tabelle 16: Filmbelichtungszeiten

Primärantikörper	durchschnittliche Belichtungszeit
Anti-pc-Jun	20 min
Anti-Jun B	3 min
Anti-Jun D	20 min
Anti-c-Fos	5 min
Anti-Fos B	2 min
Anti-Fra 1	3 min
Anti-Fra 2	8 min
Anti-Aktin	3 min

2.2.3.8. Re-blot-Verfahren

Mit Hilfe des Re-blot-Verfahrens konnte man bereits detektierte Membranen erneut mit Antikörpern beladen und andere Proteine nachweisen. Sinnvoll ist es, Proteine mit einem anderen Molekulargewicht zu wählen, um eventuell während des Re-Blot-Verfahrens nicht komplett entfernte Reste der ursprünglich verwendeten Antikörper nicht erneut zu detektieren.

Für den Re-blot wurde eine gebrauchte Western-Membran aufgetaut und für die nächste Detektion vorbereitet. Zunächst wurde die Membran für fünf Minuten in Aqua dest. gespült. Alle Arbeitsschritte fanden auf dem Laborrüttler statt, um eine gleichmäßige Benetzung der Membran zu gewährleisten. Die Re-blot-Plus-Mild-Solution wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und die Membran für 25 Minuten darin inkubiert. Anschließend erfolgte zweimal eine fünf-minütige Spülung in Blockierungslösung. Diese Vorbereitung der Membran diente der Entfernung der alten Antikörper und der erneuten Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.

Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgte nun wie unter 2.2.3.6. und 2.2.3.7. beschrieben.

2.2.4. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde als zweite Methode für diese Doktorarbeit gewählt, um die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zu überprüfen. Die Immunhistochemische Untersuchung fand an ausgewählten Fällen statt (Tab. 17). Diese ergaben sich je nach der Expression der AP-1-Faktoren im Western-Blot. Es wurden für jedes Protein 8 Fälle untersucht, wobei wenn möglich jeweils 4 Fälle mit starker und 4 Fälle mit schwacher Expression gewählt wurde.

Tabelle 17: Ausgewählte Fälle für die immunhistochemische Untersuchung

	schwach exprimiert im Western-Blot	stark exprimiert im Western-Blot
pc-Jun		
	O-04M	O-03
	O-04N	O-05N
	O-16	O-18
	O-38	O-35M
Jun B		
	O-06	O-04N
	O-34M	O-05M
	O-41	O-14
		O-17
		O-20N
Jun D		
	O-02	O-03
	O-19	O-05N
	O-27M	O-14
		O-20N
		O-28M
c-Fos		
	O-02	O-03
	O-05N	O-20N
	O-19	O-34M
	O-32M	O-38
Fos B		
	O-04N	O-05N
	O-11	O-10
	O-35M	O-32M
	O-37	O-44
Fra 1		
	O-03	O-01
	O-05N	O-04N
	O-19	O-29
	O-28M	O-32M

Fra 2		
	O-05N	O-07M
	O-06	O-11
	O-27M	O-18
	O-41	O-20N

Das für diese Methode in Paraffin eingebettete Operationsgut wurde mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica) in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und auf beschichtete Objektträger aufgebracht. Zum Trocknen der Schnitte wurden diese über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt und ggf. danach bei Raumtemperatur gelagert.

Um das Gewebe für die Analyse zugänglich zu machen, musste das Paraffin entfernt werden, dafür wurden die Schnitte zweimal 5 min in Xylol gebadet und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe (100% - 80%) hydrophilisiert.

Zur weiteren Aufbereitung wurden die Schnitte für 30 min in der Mikrowelle gekocht. Dafür wurden die Schnitte in mikrowellengeeignetes Geschirr gesetzt, dass mit 1:10 verdünnter TEC-Pufferlösung gefüllt war. In 10-minütigen Abständen wurde verdunsteter Puffer durch Aqua dest. aufgefüllt.

TEC-Pufferlösung: 2,5 g Tris (20 mM)
 5 g EDTA
 3,2 g Natriumcitrat (12 mM)
 pH 7,8 mit 25% HCL einstellen
 auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Die Mikrowellenvorbehandlung diente der Freilegung der Antigene, um eine bessere Antikörperaffinität zu erreichen.

Die Inkubation der Schnitte mit den verschiedenen Antikörpern und Lösungen erfolgte im Dako-Autostainer (3400-9010-03).

Die Schnitte wurden in das Dako-Gerät eingelegt und mit TBST-Pufferlösung befeuchtet, um eine Austrocknung zu vermeiden. Anschließend wurde das Dako-Gerät programmiert und mit den entsprechenden Lösungen beladen (s.u.).

Im ersten Schritt wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper für 30 min inkubiert, dieser wurde vorher in entsprechender Verdünnung mit dem Chem Mate™ Antikörper-Verdünner zubereitet (Tab. 18).

Tabelle 18: Antikörper Verdünnung 2

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-pc-Jun	1:200
Anti-Jun B	1:50
Anti-Jun D	1:400
Anti-c-Fos	1:100
Anti-Fos B	1:50
Anti-Fra 1	1:100
Anti-Fra 2	1:50

Darauf folgte die Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper für 10 min, mit Streptavidin-Peroxidase für 5 min und mit HRP-Substrat-Puffer für 10 min. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte jeweils mit TBST-Pufferlösung gespült. Zum Schluß erfolgte zweimal für 5 min die Inkubation mit der DAB-Lösung. Die Diaminobenzidin-Lösung (DAB) ist ein Chromogengemisch, welches bei erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion von der Peroxidase des Sekundärantikörpers oxidiert wird und die braune Färbung der Areale, die das gesuchte Antigen enthalten, bewirkt.

Anschließend wurden die Schnitte aus dem Dako-Autostainer genommen und es erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer. Damit wurden die Schnitte für ca. 20 sek. gefärbt und anschließend mit Leitungswasser für einige Minuten gespült. Die Gegenfärbung mit Hämalaun dient der Anfärbung der Zellkerne (blau) und somit der besseren histologischen Beurteilung und Differenzierung der Zellen. Nun erfolgte die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe (80% - 100%) und die Schnitte wurden mit Deckgläschen und Eukitt (Eindeckmedium) zugedeckelt.

2.3. Auswertung

2.3.1. Auswertung der Western-Blots

Die Auswertung der Western-Blot-Analyse erfolgte im Densitometer (BioRad). Die Röntgenfilme wurden eingescannt, die jeweiligen Proteinbanden markiert und von jeder Bande wurde die Intensität des Grautons gemessen und entsprechend einem Wert zugeordnet. Der Wert der Bande der Positivkontrolle (MDA-MB 231 bzw. MCF-7) wurde als 100% angenommen und anhand diesem die Werte für die Proteinbanden in Prozent umgerechnet.

Als Qualitätskontrolle der Proteinextraktion, Proteinbestimmung und der Western-Blot-Analyse (jede Probe sollte eine Proteinmenge von 20 µg enthalten) wurden alle Proteinproben, mittels Reblot-Verfahren, auf das Protein Aktin (43 kDa) hin untersucht. Das Protein Aktin wird in allen menschlichen Zellen ungefähr gleich stark exprimiert und ist somit eine gute Kontrolle für den Proteingehalt der Proben. Die Ergebnisse der Aktinuntersuchung wurden für die Korrektur der Grauwerte der Proteine eingesetzt. Dafür wurde aus den Grauwerten eines Aktinscans der Mittelwert des jeweiligen Blots ermittelt und bei Abweichungen der einzelnen Proteinproben von mehr als 20% vom Mittelwert ein Korrekturfaktor (Mittelwert/Aktinwert der Probe) für die Probe errechnet. Dieser Korrekturfaktor wurde mit den Grauwerten der Ergebnisse der AP-1-Faktoren dieser Probe multipliziert, wodurch mögliche Abweichungen korrigiert wurden und man auf die Menge der einzelnen gesuchten Proteine (Transkriptionsfaktoren) schließen konnte.

Die Auswertung für den Transkriptionsfaktor Fra 1 konnte nicht mit dem Densitometer durchgeführt werden, da die Anfärbung insgesamt zu schwach war und viel Hintergrundfärbung vorhanden war. Daher wurden die Ergebnisse semiquantitativ durch zwei Betrachter in die drei Gruppen negativ (1), schwach (2) und mäßig (3) eingeteilt. Einzig die Kontrolle zeigte eine stark angefärbte Bande.

Statistisch erfolgte die Auswertung der Western-Blots mit dem Computerprogramm SPSS. Die ermittelten Daten für die AP-1-Faktoren wurden jeweils in 2 Gruppen aufgeteilt. Dabei sollten möglichst zwei gleich große Gruppen mit schwacher bzw. starker Expression entstehen (Tab. 19).

Tabelle 19: Einteilung der densitometrisch ermittelten Werte

	Gruppe 1 (schwach exprimiert)	Gruppe 2 (stark exprimiert)
Transkriptionsfaktoren (% in Relation zur Kontrolle)		
Jun B	0-75%	75,1-750%
Jun D	0-10%	10,1-350%
pc-Jun	0-10%	10,1-125%
Fra 1	1	2-3
Fra 2	0-70%	70,1-350%
pFra 2	0-70%	70,1-400%
c-Fos	0-40%	40,1-300%
pc-Fos	0-100%	100,1-900%
Fos B	0-70%	70,1-450%

Tabelle 20: Einteilung der auszuwertenden Daten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
klinische Parameter					
Gewebetyp	Primärkarzino- nome	Metastasen	Borderline- Tumore	Gutartige Tumore	Normalge- webe
FIGO Stadium	Ia-IIa	IIb-IIIb	IIIc-IV		
Grading	G I-II	G III			
Histologie	serös	nicht serös			
Alter	0-50	51-100			

Die Expression der Transkriptionsfaktoren wurde mit dem Gewebetyp, dem FIGO Stadium, der Histologie, dem Grading und dem Alter der Patientinnen korreliert (Tab. 20). Es erfolgte die Ermittlung der Mittelwerte für die Expression der einzelnen AP-1-Faktoren und die Errechnung der p-Werte mittels des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und Werte zwischen 0,05 und 0,1 wurden als richtungweisend mit berücksichtigt.

2.3.2. Auswertung der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie diente der genauen Beurteilung, in welchen Zellen die bereits mit dem Westernblot nachgewiesenen Proteine vorkommen und inwiefern sie tumorspezifisch sind. So wurde beurteilt, welche Zelltypen (Tumor-, Epithel-, Bindegewebs-, Endothel-, Muskelzellen) die Proteine produzieren und ob sie im Zellkern oder Zytoplasma lokalisiert sind. Des Weiteren wurde auch die Farbintensität der angefärbten Zellen beachtet und mit den Ergebnissen der Western-Blots verglichen. Der Grad der Färbung wurde eingeteilt in negativ, leicht, moderat und stark.

3. Ergebnisse

In den durchgeführten Versuchsreihen dieser Arbeit wurden alle 31 Primärkarzinome, 13 Metastasen, 4 Borderline-Tumore, 8 gutartige Tumore und 4 Normalgewebe in der Western-Blot-Analyse auf die Expression der AP-1 Faktoren (pc-Jun, Jun B, Jun D, c-Fos, Fos B, Fra 1, Fra 2) untersucht. Es wurde der Antikörper der phosphorylierten Form von c-Jun anstelle von c-Jun verwendet, da die Antikörper Qualität von pc-Jun deutlich besser war. C-Jun lieferte keine konstant auswertbaren Ergebnisse.

Ausgewählte Fälle wurden zusätzlich immunhistochemisch untersucht, je nach der Expression im Western-Blot (Tab. 17).

3.1. Ergebnisse für die Proteine des AP-1-Komplexes

3.1.1. Darstellung der Western-Blot-Analyse

Die Abbildungen 2 und 3 stellen exemplarisch die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse dar. Abbildung 2 zeigt verschiedene Karzinome, z. T. mit dazugehörigen Metastasen und Normalgeweben. Die gutartigen - und die Borderline-Tumore sind in Abbildung 3 dargestellt.

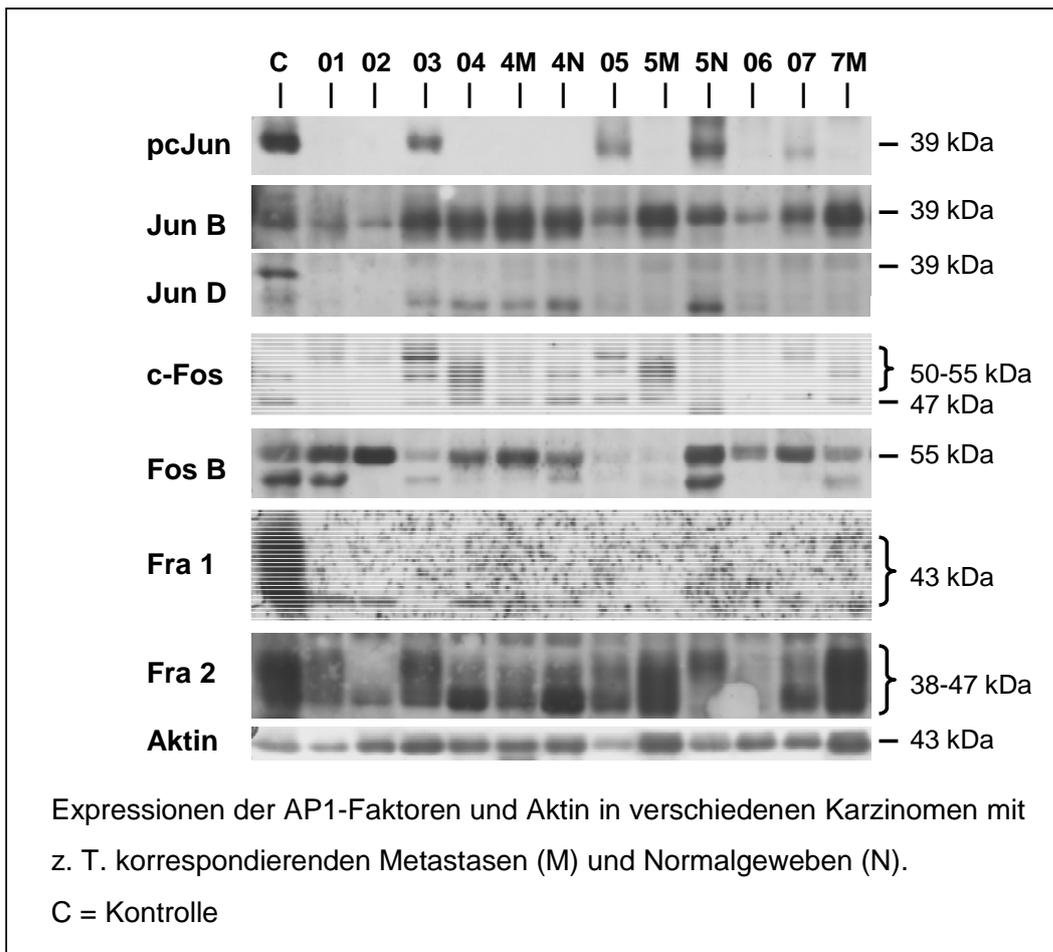


Abbildung 2: Expression der AP-1-Faktoren im Western-Blot 1

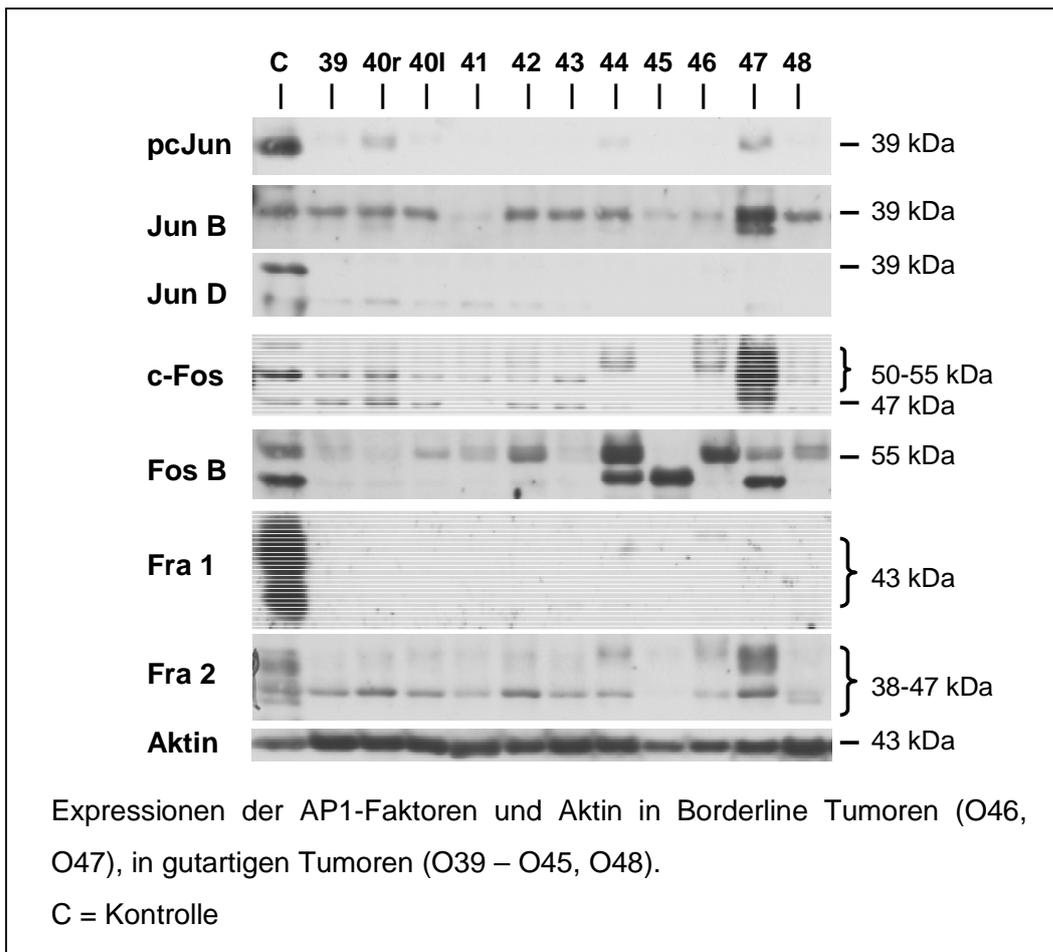


Abbildung 3: Expression der AP-1-Faktoren im Western-Blot 2

3.1.2. c-Jun – phosphorylierte Form

3.1.2.1. Expression von pc-Jun im Western-Blot

In allen Tumoren, Metastasen und den Normalgeweben konnte pc-Jun in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Pc-Jun stellte sich mit einer Bande von 39 kDa Molekularwicht dar.

Die Expressionsstärke war bei den Karzinomen sehr unterschiedlich und reichte von 0,3-121,4% im Verhältnis zur Kontrolle, wobei die meisten Karzinome eine niedrige Expression von pc-Jun zeigten und nur wenige eine hohe, dies zeigte sich auch durch den Unterschied zwischen Mittelwert (17,4%) und Median (9,6%) (Tab. 21).

Tabelle 21: Relative Expression von pc-Jun in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

	Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231
Expressions- stärke (%)	0,3-121,4%	1,9-47,3%	4,8-49,8%	1,9-14,4%	1,8-76,7%
Mittelwert	17,4%	22,0%	20,9%	5,0%	27,9%
Median	9,6%	10,5%	14,5%	3,9%	16,6%

Im Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Gewebetypen fiel auf, dass die gutartigen Tumore eine geringere pc-Jun-Expression und eine sehr enge Verteilungsbreite aufwiesen. Die Expression bei den Karzinomen, Metastasen und Borderline-Tumoren fiel ähnlich aus. Die Normalgewebe zeigten im Mittel die höchste pc-Jun-Expression aller Gewebetypen, wobei ein großer Unterschied zwischen Mittelwert (27,9%) und Median (16,6%) bestand (Tab. 21).

3.1.2.2. Expression von pc-Jun in der Immunhistochemie

Die Karzinome zeigten in der Immunhistochemie eine sehr heterogene Anfärbung. Die Tumornester waren zusammengesetzt aus an den Rändern stark positiven Zellkernen und im Inneren schwach bis nicht gefärbten Zellkernen. Die Bindegewebszellen zeigten keine Anfärbung, Endothelien und glatte Muskelzellen waren schwach gefärbt.

Die Metastasen färbten sich insgesamt im Vergleich zu den Karzinomen schwächer an. Die Zellkerne wiesen eine schwache Färbung auf, die Stromazellen färbten sich nicht an.

Das Oberflächenepithel der Normalgewebe zeigte eine schwache bis mittlere Kernfärbung, die Färbung der Rinde war schwächer. Bindegewebige Zellen färbten sich nicht an, Endothelien und glatte Muskulatur waren schwach bis mäßig positiv.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse konnte durch die Immunhistochemie in den hier untersuchten Karzinomen nicht bestätigt werden. Allerdings färbten sich bei den Metastasen und Normalgeweben die Fälle stärker bzw. schwächer an, wie bereits im Western-Blot nachgewiesen.

3.1.3. Jun B

3.1.3.1. Expression von Jun B im Western-Blot

In der Western-Blot-Analyse konnte Jun B in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Die Bande von Jun B lag bei einem Molekulargewicht von 39 kDa.

In den Karzinomen bewegte sich die Expressionsstärke von Jun B zwischen 19,5-326% relativ zur Kontrolle (Tab. 22). Die meisten Karzinome (42%) lagen in einem Bereich von 60-90%.

Tabelle 22: Relative Expression von Jun B in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

	Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231
Expressions- stärke (%)	19,5- 326,0%	43,4- 187,5%	33,1- 203,4%	8,8-58,0%	81,0- 721,6%
Mittelwert	100,5%	94,5%	87,23%	40,5%	254,5%
Median	86,5%	86,1%	56,2%	44,2%	107,7%

Im Vergleich der verschiedenen Gewebetypen lässt sich feststellen, dass analog zu pc-Jun die gutartigen Tumore eine geringere Jun B-Expression als die anderen Gewebetypen aufwiesen. Die Karzinome (Mittelwert = 100,5%) und die Metastasen (Mittelwert = 94,5%) wiesen in etwa die gleiche mittlere Jun B-Expression auf. Die Borderline-Tumore zeigten eine etwas geringere mittlere Expression, sind aber von der Verteilungsbreite ähnlich. Die Normalgewebe zeigten die höchste mittlere Jun B-Expression, wobei eine deutliche Diskrepanz zwischen Mittelwert (254,5%) und Median (107,7%) bestand (Tab. 22).

3.1.3.2. Expression von Jun B in der Immunhistochemie

Die Expression von Jun B in der Immunhistochemie führte bei den Karzinomen zu einer heterogenen Anfärbung, wobei die Zellkerne keine bis eine schwache Färbung aufwiesen, zusätzlich zeigte sich eine cytoplasmatische Färbung. Einzelne Tumorzellnester zeigten eine mittlere Färbung. Die Bindegewebs- und glatten Muskelzellen färbten sich nicht an (Abb. 4).

Die Metastasen zeigten ein ähnliches Bild wie die Karzinome. Die schwache Färbung war besonders im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 4). Es zeigten sich ebenfalls Zellnester mit mittlerer Färbung. Die Fibrozyten wiesen eine schwache Färbung auf, ebenso die Endothelien.

Das Oberflächenepithel der Normalgewebe färbte sich in der Immunhistochemie schwach bis mittel stark. Die Färbung der ovariellen Rinde war etwas schwächer. Endothel und Fibroblasten zeigten eine schwache Anfärbung.

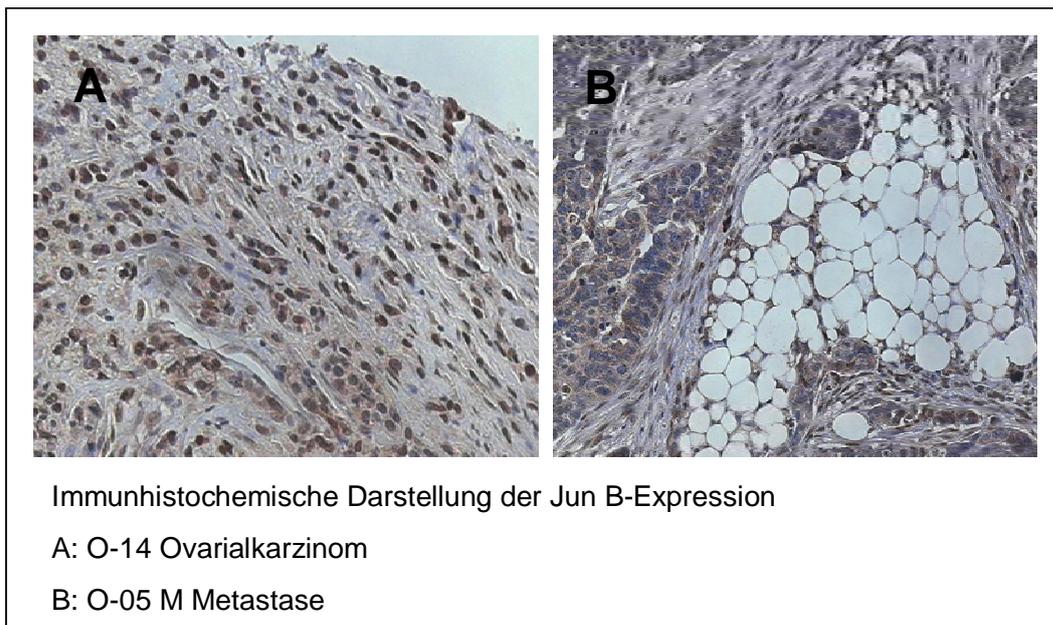


Abbildung 4: Jun B-Expression in der Immunhistochemie

Im Vergleich der beiden Methoden entsprach die Stärke der Anfärbung in der Immunhistochemie nicht der des Western-Blots bei den Fällen der Karzinome und Metastasen. Bei den Normalgeweben wurden 2 stark exprimierte Fälle des Western-Blots untersucht, die sich auch in der Immunhistochemie stark färbten.

3.1.4. Jun D

3.1.4.1. Expression von Jun D im Western-Blot

Eine Expression des AP-1 Faktors Jun D konnte in der Western-Blot-Analyse in allen Tumoren, Metastasen und Normalgeweben nachgewiesen werden. Bei einem Molekulargewicht von 39 kDa stellte sich die Bande von Jun D dar. Jun D zeigte im Western-Blot insgesamt eine niedrige Expression in allen Gewebetypen. In den Karzinomen reichte die Expressionsstärke von 1,3-347,8% im Verhältnis zur Positivkontrolle, allerdings liegen 26 von 31 Werten unter 40% (Tab. 23).

Tabelle 23: Relative Expression von Jun D in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

	Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231
Expressions- stärke (%)	1,3-347,8%	2,2-31,8%	7,4-22,2%	3,6-9,7%	30,1-50,6%
Mittelwert	29,1%	17,1%	15,7%	4,9%	40,7%
Median	12,6%	22,4%	16,6%	4,15%	41,0%

Im Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Gewebetypen wird sichtbar, dass die gutartigen Tumore Jun D am geringsten exprimieren. Die Karzinome wiesen eine höhere Expression auf verglichen mit den Metastasen und auch den Borderline-Tumoren. Allerdings waren Mittelwert (29,1%) und Median (12,6%) stark verschieden. Wie auch im Fall der bisher betrachteten Proteine zeigten die Normalgewebe die stärkste mittlere Jun D-Expression (Tab. 23).

3.1.4.2. Expression von Jun D in der Immunhistochemie

Die Karzinome zeigten in der Immunhistochemie eine schwache bis mäßige Kernfärbung, auch das Zytoplasma färbte sich an (Abb. 5). Die Endothelzellen wiesen keine bis eine schwache Färbung auf, bindegewebige Zellen färbten sich nicht an. Die glatte Muskulatur hatte eine moderate Färbung.

Die Metastasen färbten sich insgesamt schwächer an als die Karzinome. Dies erstreckte sich auf die Zellkerne und das Zytoplasma (Abb. 5). In den Fibroblasten sah man keine bis eine schwache Anfärbung.

Das Oberflächenepithel der Normalgewebe färbte sich schwach bis mäßig stark an, die Zellen der Rinde zeigten eine schwächere Färbung. Stromazellen der Tumoren färbten sich nicht an.

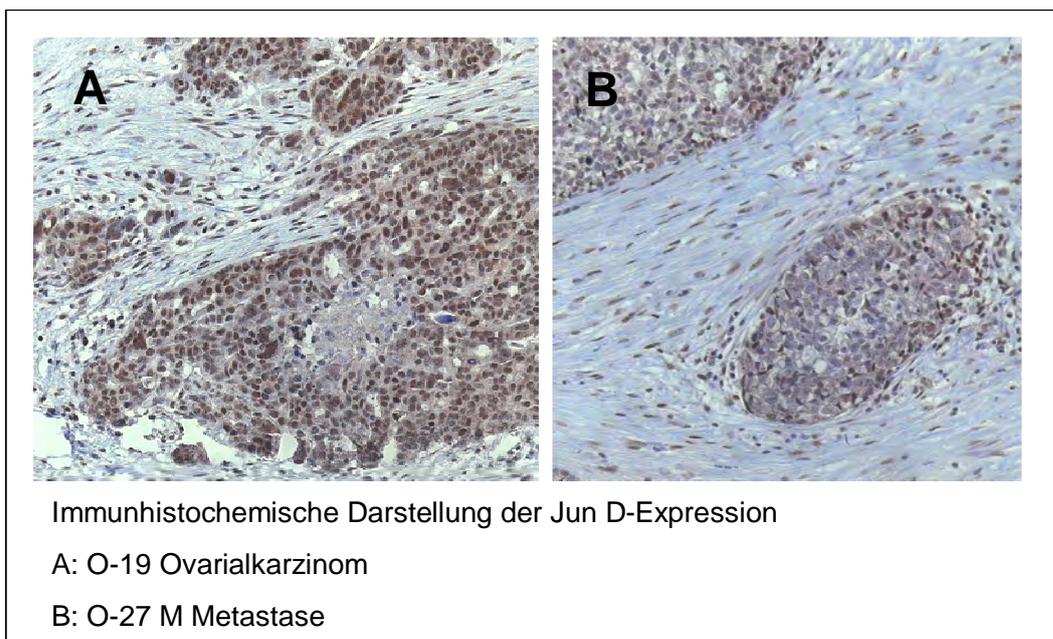


Abbildung 5: Jun D-Expression in der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie bestätigte zum Teil die Expression der Western-Blot-Analyse. So zeigten die Metastasen und Normalgeweben eine starke bzw. schwächere Färbung passend zur Expressionsstärke im Western-Blot.

3.1.5. c-Fos

3.1.5.1. Expression von c-Fos im Western-Blot

In der Western-Blot-Analyse konnte c-Fos in allen Tumoren, Metastasen und Normalgeweben nachgewiesen werden. C-Fos wies drei Banden auf, die um ein Molekulargewicht von 50 kDa (47-, 50-, 55 kDa) liegen. Zur Auswertung wurde zunächst die unphosphorylierte Form mit der Bande bei 47 kDa verwendet. Unter 3.1.5. erfolgt anschließend die Auswertung der phosphorylierten Form pc-Fos.

Die Expressionstärke der unphosphorylierten Form von c-Fos in den Karzinomen lag zwischen 2,9-256,9% relativ zur Kontrolle (Tab. 24).

Tabelle 24: Relative Expression von c-Fos in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

	Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231
Expressions- stärke (%)	2,9-256,9%	6,3-68,9%	19,0- 115,5%	6,8-181,7%	74,1- 146,3%
Mittelwert	61,2%	34,7%	56,1%	59,4%	101,7%
Median	44,5%	43,0%	44,9%	46,0%	93,3%

Unter den Mittelwerten für die verschiedenen Gewebetypen wiesen die Metastasen die geringste mittlere c-Fos-Expression auf. Karzinome, Borderline- und gutartige Tumore exprimierten c-Fos in ähnlicher Art und Weise. Normalgewebe zeigten die höchste mittlere c-Fos-Expression (Tab. 24).

3.1.5.2. Expression von c-Fos in der Immunhistochemie

In der Immunhistochemie erkannte man in den Tumorzellen eine mäßige Kernfärbung, das Zytoplasma färbte sich ebenfalls leicht an. Ebenso zeigten Endothelien und Fibroblasten eine mäßig starke Färbung. Die glatte Muskulatur färbte sich moderat bis stark an (Abb. 6).

Die Färbung der Metastasen war ähnlich der der Karzinome. Die Tumorzellkerne und Endothelien zeigten eine mäßige Färbung. Die Bindegewebs- und Muskelzellen wiesen eine schwache Färbung auf.

Bei den Normalgeweben färbte sich das Oberflächenepithel moderat bis stark an, ebenso die Zellen der Rinde des Ovars. Endothelien und Fibroblasten hingegen zeigten eine mäßig starke Kernfärbung.

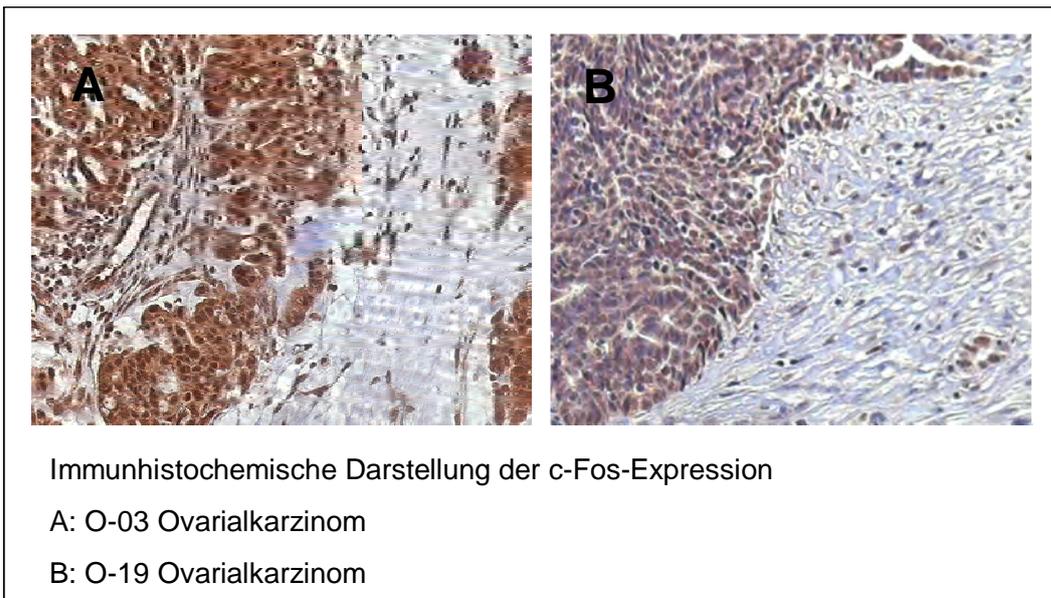


Abbildung 6: c-Fos-Expression in der Immunhistochemie

Im Vergleich der Ergebnisse der immunhistochemischen mit denen der Western-Blot-Analyse zeigten sich keine Gemeinsamkeiten. Die Stärke bzw. Schwäche der Expression von c-Fos im Western-Blot wiederholte sich nicht in der Immunhistochemie.

3.1.6. c-Fos – phosphorylierte Form

3.1.6.1. Expression von pc-Fos im Western-Blot

Bei der Auswertung von c-Fos erfolgte zusätzlich die Auswertung der phosphorylierten Form. Pc-Fos stellte sich in den Banden bei 50- und 55 kDa dar.

Die Karzinome hatten eine Expressionsstärke von 11,3-840,8% im Verhältnis zur Kontrolle (Tab. 25).

Tabelle 25: Relative Expression von c-Fos phosphoryliert in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

	Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231
Expressions- stärke (%)	11,3- 840,8%	12,5- 328,0%	32,3- 321,9%	10,7-46,9%	91,6- 191,2%
Mittelwert	148,8%	86,5%	135,8%	23,8%	142,9%
Median	86,3%	46,4%	94,4%	18,3%	144,4%

Verglich man die Mittelwerte der verschiedenen Gewebetypen fiel für gutartige Tumore eine geringere pc-Fos-Expression auf. Die Karzinome zeigten die höchste mittlere pc-Fos-Expression. Die Expression in den Metastasen war im Mittel deutlich niedriger. Die Borderline-Tumore und die Normalgewebe exprimierten pc-Fos im Mittel auf ähnlichem Niveau wie die Karzinome (Tab. 25).

Es zeigten sich einige Unterschiede zwischen der Auswertung von c-Fos und pc-Fos. So war die Expression der phosphorylierten Form in den Karzinomen höher und in den gutartigen Tumoren niedriger als die der nicht-phosphorylierten Form.

3.1.7. Fos B

3.1.7.1. Expression von Fos B im Western-Blot

In allen Tumoren, Metastasen und den Normalgeweben konnte Fos B in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Fos B stellte sich mit einer Bande von 55 kDa Molekularwicht dar.

In den Karzinomen lag die Expressionsstärke zwischen 11,5-390,0%. Auffallend war ein deutlicher Unterschied zwischen Mittelwert 90,7% und Median 69,1% (Tab. 26).

Tabelle 26: Relative Expression von Fos B in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

	Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)	MCF 7	MCF 7	MCF 7	MCF 7	MCF 7
Expressions- stärke (%)	11,5- 390,0%	1,4-147,7%	24,4- 259,2%	17,5- 235,4%	89,2- 410,4%
Mittelwert	90,7%	44,3%	102,3%	61,4%	243,3%
Median	69,1%	36,8%	62,9%	28,2%	236,7%

Im Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Gewebetypen fiel auf, dass die Metastasen die geringste mittlere Fos B-Expression aufwiesen, ähnlich der c-Fos Expression. Die gutartigen Tumore zeigten ebenfalls eine niedrige Expressionsstärke. Die Karzinome und Borderline-Tumore wiesen eine ähnlich hohe mittlere Expression auf, mit Mittelwerten von 90,7% und 102,3%. Die Normalgewebe zeigten die höchste mittlere Fos B-Expression (Tab. 26).

3.1.7.2. Expression von Fos B in der Immunhistochemie

Die Expression von Fos B in der Immunhistochemie zeigte bei den Karzinomen eine heterogene Anfärbung. Die Tumorzellen wiesen keine bis eine moderate Färbung der Kerne auf, das Zytoplasma färbte sich schwach an. An den Rändern der Zellnester war die Färbung deutlich stärker als zentral. Fibroblasten färbten sich nicht an. Endothelien und glatte Muskulatur zeigten keine bis eine schwache Färbung (Abb. 7).

Die Metastasen färbten sich im Vergleich zu den Karzinomen schwächer an, aber ebenfalls sehr variabel. Die Kernfärbung reichte von schwach bis mäßig. Die Endothelien, Fibroblasten und glatten Muskelzellen färbten sich analog zu denen in den Präparaten der Karzinome.

Das Oberflächenepithel der Normalgewebe stellte sich schwach bis mäßig positiv dar. Die Färbung der Rinde war insgesamt etwas schwächer. Die Anfärbung der Stromazellen war analog der bei den Karzinomen und Metastasen.

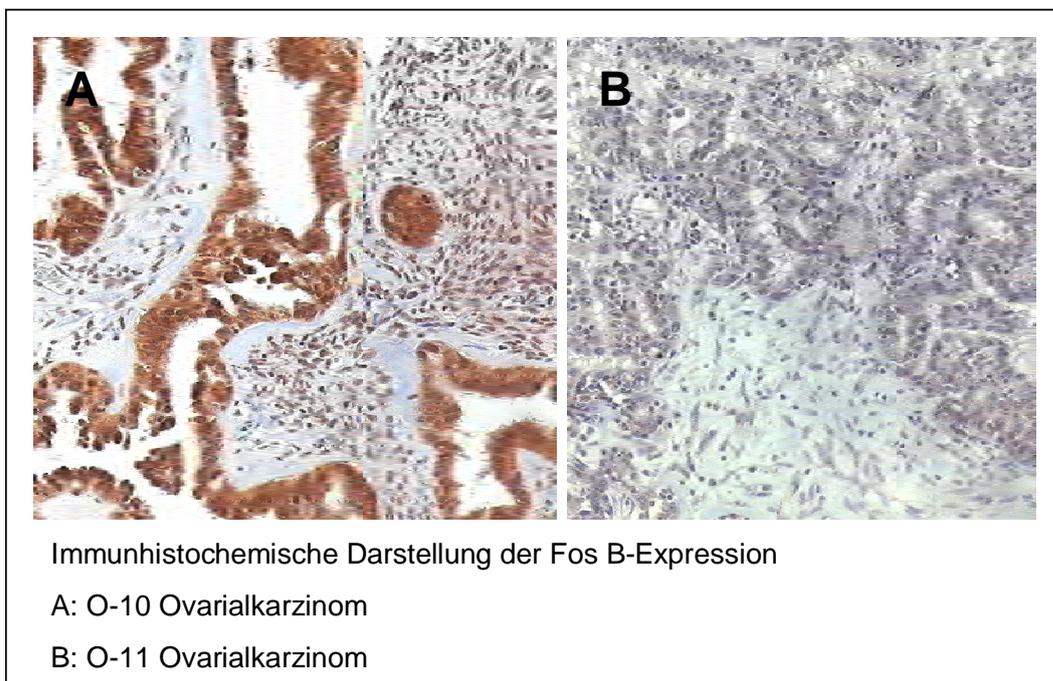


Abbildung 7: Fos B-Expression in der Immunhistochemie

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse ließen sich durch die Immunhistochemie vollständig bestätigen. Die ausgewählten Fälle mit starker Expression zeigten eine stärkere Färbung als die der Fälle mit schwacher Expression. Dies galt für alle drei untersuchten Gewebearten.

3.1.8. Fra 1

3.1.8.1. Expression von Fra 1 im Western-Blot

In der Western-Blot-Analyse konnte Fra 1 in allen Tumoren, Metastasen und Normalgeweben nachgewiesen werden. Die Bande von Fra 1 lag bei einem Molekulargewicht von 43 kDa.

Aufgrund der unzureichenden Antikörper-Qualität von Fra 1 und starker Hintergrundfärbung der Röntgenfilme war eine Auswertung mit dem Densitometer nicht möglich und erfolgte daher durch zwei Betrachter mit Einteilung in drei Gruppen: negativ (1), schwach (2) und mäßig (3) (Tab. 27). Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich insgesamt eine schwache Fra 1-Färbung.

Tabelle 27: Relative Expression von Fra 1 in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

		Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)		MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231
Expressions- stärke	negativ	13	4	0	3	1
	schwach	3	3	4	2	3
	mäßig	15	6	0	3	0

Im Vergleich der verschiedenen Gewebetypen zeigte sich für die Fra 1-Expression in den gutartigen und Borderline-Tumoren eine eher schwache Ausprägung. In den Normalgeweben war, im Gegensatz zu den anderen Fos- und Jun-Proteinen, die geringste Fra 1-Expression beobachtet worden. Die höchste Fra 1-Expression war in den Karzinomen und Metastasen zu finden.

3.1.8.2. Expression von Fra 1 in der Immunhistochemie

Die Färbung von Fra 1 in der Immunhistochemie war insgesamt sehr schwach. Die meisten Tumorzellen der Karzinome zeigten keine Anfärbung. Vereinzelt fanden sich Nester mit schwacher Färbung. Die Stromazellen zeigten keine Anfärbung (Abb. 8).

Die Metastasen färbten sich noch schwächer an als die Karzinome. Es fanden sich vereinzelt Zellen mit einer sehr schwachen Färbung. Die Stromazellen blieben ebenfalls ungefärbt.

Genauso zeigte das Oberflächenepithel der Normalgewebe eine vereinzelte schwache Kernfärbung, bei ungefärbter Rinde und Stromazellen.

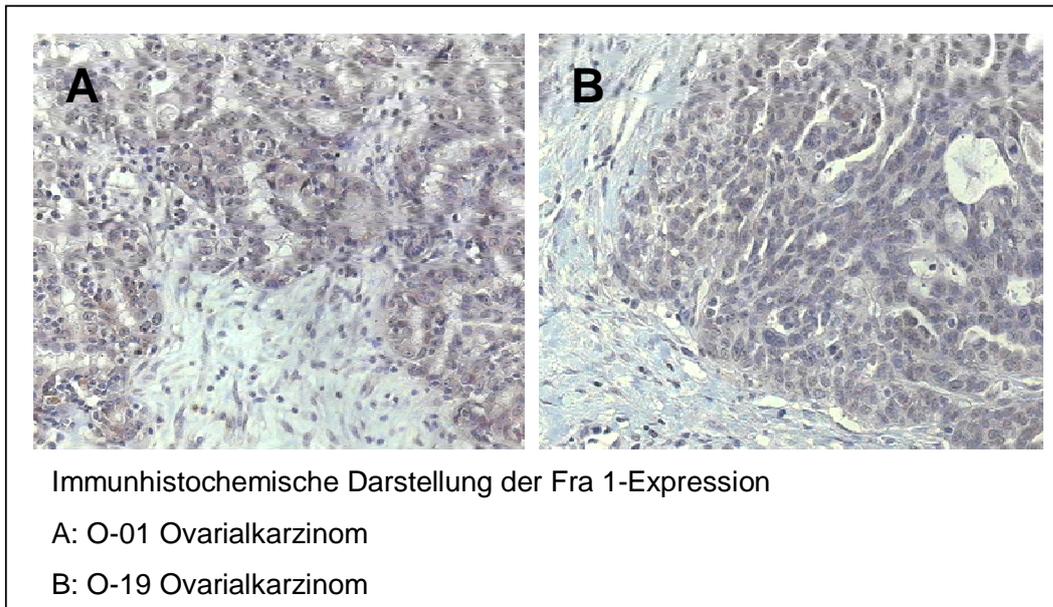


Abbildung 8: Fra 1-Expression in der Immunhistochemie

Durch die ebenfalls schwache Färbung in der Immunhistochemie ließen sich die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse nicht bestätigen. Nur im Falle der Metastasen konnte die Expression bestätigt werden.

3.1.9. Fra 2

3.1.9.1. Expression von Fra 2 im Western-Blot

Eine Expression des AP-1 Faktors Fra 2 konnte in der Western-Blot-Analyse in allen Tumoren, Metastasen und Normalgeweben nachgewiesen werden. Bei einem Molekulargewicht um 45 kDa stellten sich die drei Banden (38-, 45-, 47 kDa) von Fra 2 dar. Für die Auswertung wurden zunächst alle drei Banden gemeinsam betrachtet.

Relativ zur Positivkontrolle reichte die Expressionsstärke der Karzinome von 5,0-345,2%. Die Mehrzahl der untersuchten Fälle (65%) zeigte eine Expression zwischen 40-120%, nur wenige eine höhere (Tab. 28).

Tabelle 28: Relative Expression von Fra 2 in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

	Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231	MDA-MB 231
Expressions- stärke (%)	5,0-345,2%	33,4- 219,8%	10,0- 141,2%	14,3-43,4%	0,9-332,7%
Mittelwert	93,2%	78,5%	67,4%	26,9%	114,7%
Median	84,0%	71,5%	59,2%	21,9%	62,7%

Unter den Mittelwerten der verschiedenen Gewebetypen hatten gutartige Tumore die geringste Fra 2-Expression. Karzinome wiesen gegenüber Metastasen eine stärkere mittlere Fra 2-Expression auf. Die Expression der Borderline-Tumoren war mit einem Mittelwert von 67,4% niedriger.

Die Normalgewebe zeigten die höchste mittlere Fra 2-Expression, ähnlich den meisten anderen Fos- und Jun-Proteinen (Tab. 28).

3.1.9.2. Expression von Fra 2 in der Immunhistochemie

Fra 2 zeigte in der Immunhistochemie bei den Karzinomen eine schwache bis moderate Kernfärbung, an den Übergängen der Tumorzellen zum normalen Gewebe war die Färbung stärker. Fibroblasten zeigten keine Kernfärbung. Endothelien und glatte Muskelzellen zeigten eine schwache Färbung (Abb. 9).

Die Metastasen färbten sich ähnlich der Karzinome an, allerdings insgesamt etwas schwächer. Ebenfalls konnte hier eine stärkere Färbung an den Rändern der Tumorzellnester beobachtet werden. Die Fibroblasten und Endothelien zeigten eine schwache Färbung, die glatte Muskulatur eine mäßig starke (Abb. 9).

Die Normalgewebe wiesen eine mäßige Kernfärbung des Oberflächenepithels und eine schwache Färbung der Rinde auf. Die Stromazellen zeigten eine schwach positive Färbung.

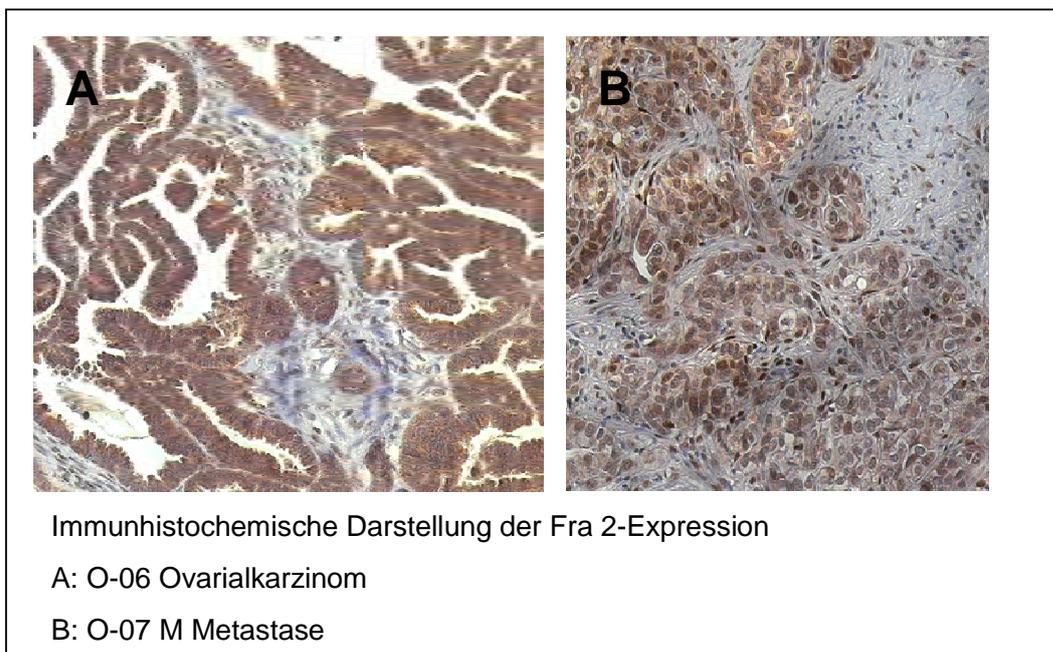


Abbildung 9: Fra 2-Expression in der Immunhistochemie

Die Expression der Western-Blot-Analyse konnte durch die Immunhistochemie nicht bestätigt werden. In keiner der drei Gewebetypen stimmte die Schwäche bzw. Stärke der Expression der Western-Blot-Analyse mit der Färbung der Immunhistochemie überein.

3.1.10. Fra 2 – phosphorylierte Form

3.1.10.1. Expression von pFra 2 im Western-Blot

Zur detaillierteren Auswertung von Fra 2 wurde eine weitere Auswertung der Banden bei 45 und 47 kDa vorgenommen, diese entsprechen der phosphorylierten Form von Fra 2.

Die Karzinome zeigten eine große Breite in der Expressionsstärke von 5,4-370,9%. Dabei lagen die meisten Werte (77%) zwischen 0-120% und nur wenige darüber (Tab. 29).

Tabelle 29: Relative Expression von Fra 2 phosphoryliert in Karzinomen, Metastasen, Borderline-Tumoren, gutartigen Tumoren und Normalgeweben

	Karzinome n=31	Metastasen n=13	Borderline- Tumore n=4	Gutartige Tumore n=8	Normal- gewebe n=4
Positivkontrolle (100%)	MDA	MDA	MDA	MDA	MDA
Expressions- stärke (%)	5,4-370,9%	8,1-201,5%	13,3- 162,9%	6,0-37,6%	9,2-345,8%
Mittelwert	84,9%	75,4%	74,9%	16,4%	117,3%
Median	76,4%	63,5%	61,8%	14,3%	57,2%

Betrachtet man die Mittelwerte der verschiedenen Gewebetypen so wird deutlich, dass die gutartigen Tumore eine sehr niedrige mittlere pFra 2-Expression aufwiesen. Für Karzinome, Metastasen und Borderline-Tumore wurden ähnliche Werte der pFra 2-Expression ermittelt, wobei die Karzinome eine geringfügig stärkere Expression mit einem Mittelwert von 84,9% aufwiesen. Die Normalgewebe zeigten die höchste mittlere pFra 2-Expression. Es fiel jedoch ein großer Unterschied zwischen Mittelwert (117,3%) und Median (57,2%) auf. Unter Berücksichtigung des Median schienen die Normalgewebe eine etwas niedrigere Expression im Vergleich zu den Karzinomen aufzuweisen (Tab. 29).

Somit gleichen die Ergebnisse der phosphorylierten Form denen der Auswertung von Fra 2 gesamt. Bei den gutartigen Tumoren zeigt sich die niedrige Expressionsstärke sogar noch ausgeprägter.

3.2. Korrelation der AP-1-Faktoren mit den klinisch-pathologischen Parametern

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse für die AP-1-Faktoren mit den klinisch-pathologischen Prognosefaktoren (Gewebetyp, Grading, Staging, Histologie und Alter) korreliert. Bei signifikanten Ergebnissen ($p \leq 0,05$) werden diese im Folgenden dargestellt. Aufgrund der insgesamt kleinen Zahl der untersuchten Fälle werden auch Tendenzen zur statistischen Signifikanz ($0,05 > p \leq 0,1$) mitbetrachtet.

Eine positive Korrelation zum Gewebetyp (invasive Karzinome, Metastasen, Borderline-Tumore, gutartige Tumore) ergab sich für die AP-1-Proteine Jun B, Jun D, pFra 2 und eine Tendenz für Fra 2. Die Expression der Proteine war in den Karzinomen, Metastasen und Borderline-Tumoren statistisch signifikant höher als in den gutartigen Tumoren.

Die Jun B-Expression lag bei 58% der Karzinome über dem Median (75% - aller Tumorarten zusammen), wohingegen alle gutartigen Tumore eine niedrigere Expression aufwiesen ($p = 0,032$) (Abb. 10).

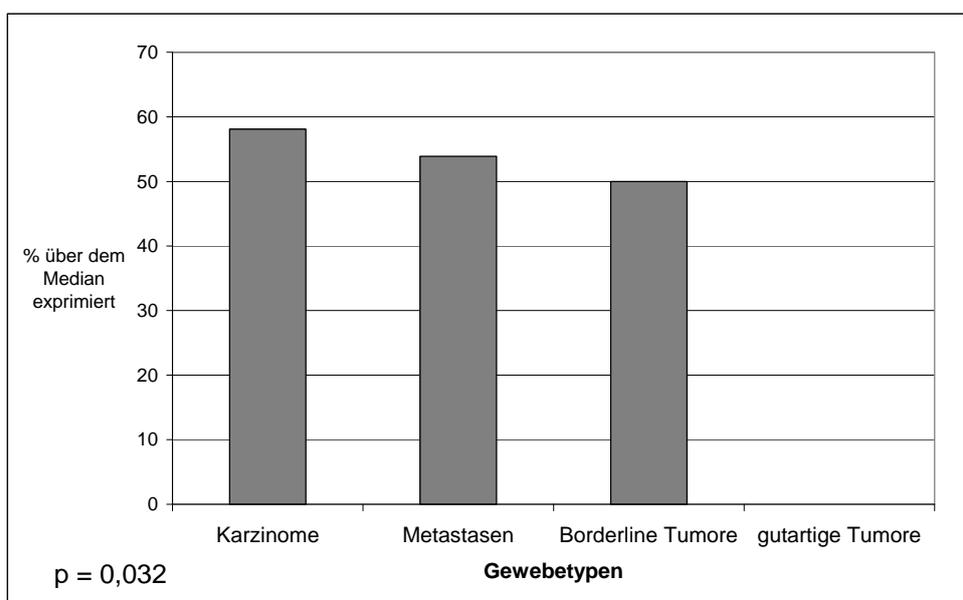


Abbildung 10: Korrelation von Jun B und den Gewebetypen

58% der Karzinome exprimierten Jun D mit über dem Median (10%), im Gegensatz zu den gutartigen Tumoren, die alle eine Jun D-Expression von unter 10% aufwiesen ($p = 0,015$) (Abb. 11).

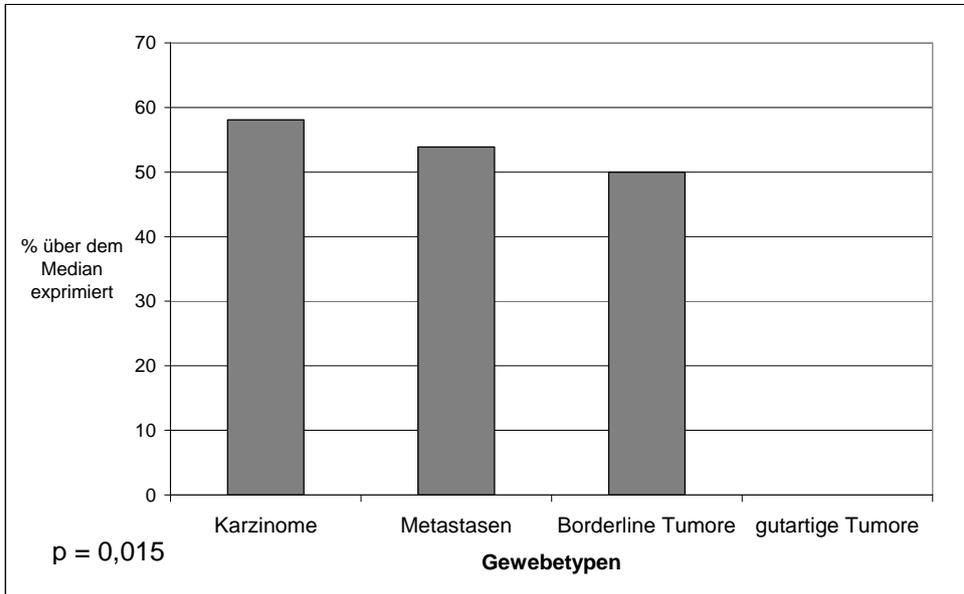


Abbildung 11: Korrelation von Jun D und den Gewebetypen

Eine starke Fra 2-Expression über dem Median ($> 70\%$) lag bei 52% der Karzinome vor, dagegen war die Expression in den gutartigen Tumoren immer unter 70% ($p=0,056$) (Abb. 12).

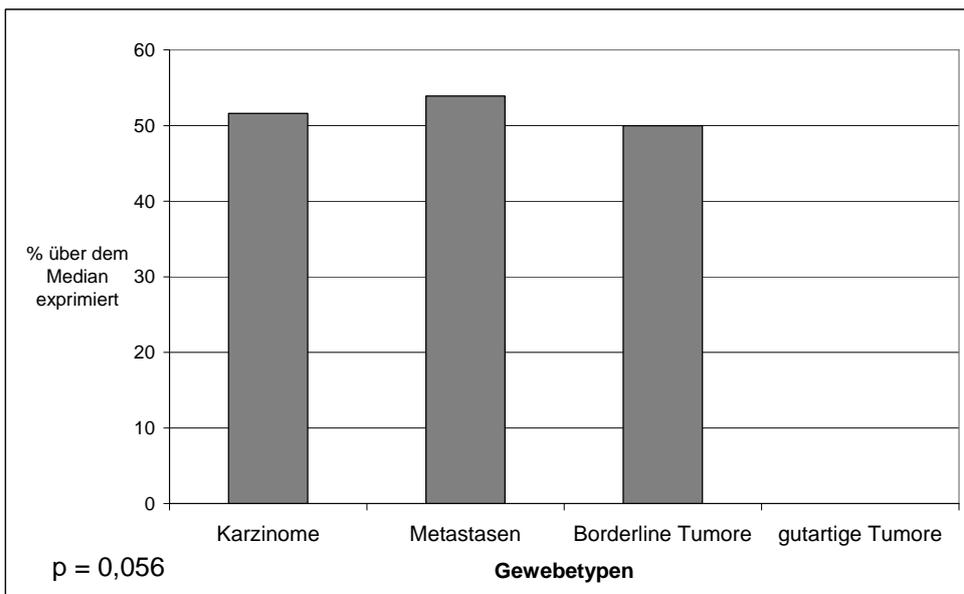


Abbildung 12: Korrelation von Fra 2 und den Gewebetypen

Die phosphorylierte Form von Fra 2 wies mit $p=0,039$ eine signifikante Korrelation mit dem Tumortyp auf. In den Karzinomen exprimierten 55% pFra 2 über dem Median (70%), wohingegen keiner der gutartigen Tumore eine starke Expression von über 70% zeigte (Abb. 13).

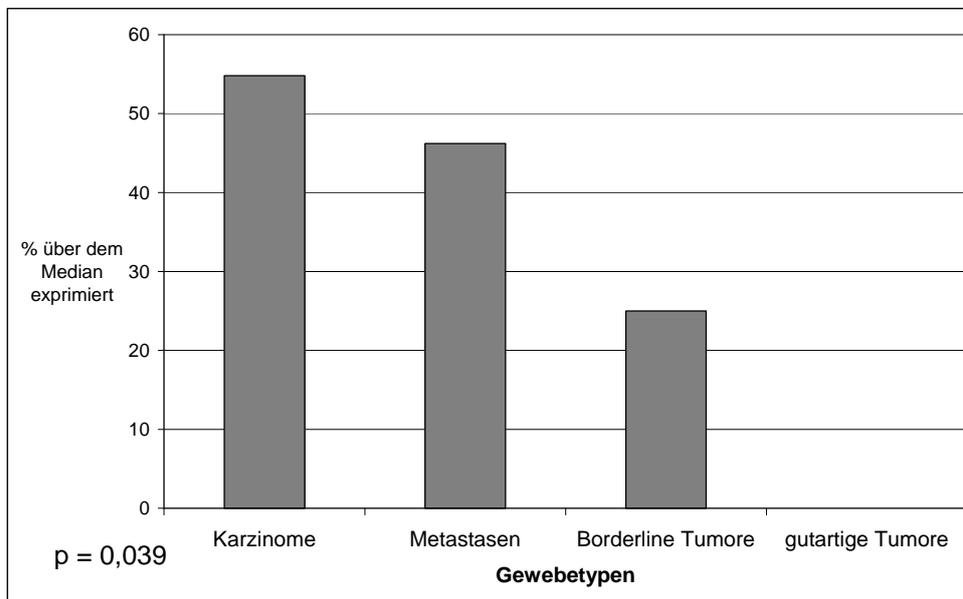


Abbildung 13: Korrelation von pFra 2 und den Gewebetypen

Der AP-1-Faktor c-Fos und das Grading wiesen eine tendenzielle Korrelation auf ($p = 0,106$). 63% der entdifferenzierten Karzinome (G 3) zeigten eine hohe c-Fos-Expression über dem Median (40%), wohingegen nur 33% der mäßig bis gut differenzierten Karzinome (G 1-2) eine hohe Expression aufwiesen (Abb. 14).

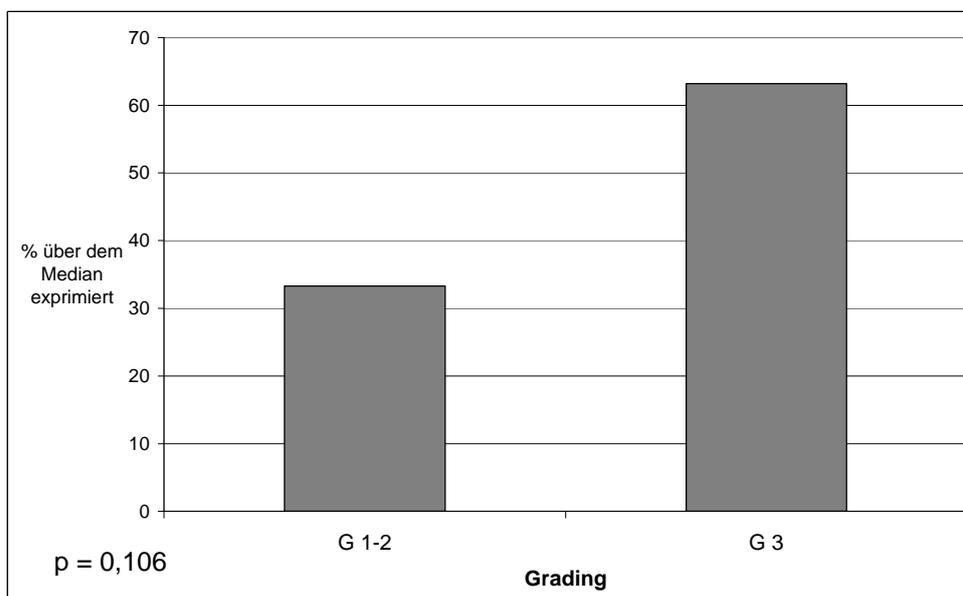


Abbildung 14: Korrelation von c-Fos und dem Grading

Eine weitere tendenzielle Korrelation wurde für c-Fos und den histologischen Typ ermittelt ($p=0,080$). In den serösen Karzinomen exprimierten 61% c-Fos über dem Median (40%), wohingegen nur 25% der nicht-serösen Karzinome eine hohe c-Fos-Expression aufwiesen (Abb. 15).

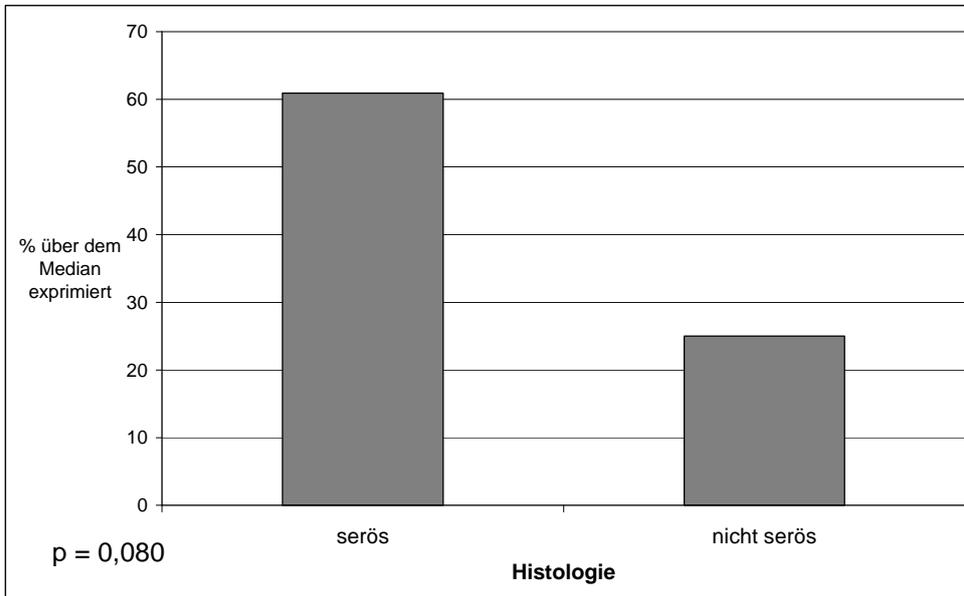


Abbildung 15: Korrelation von c-Fos und dem histologischen Typ

Die phosphorylierte Form von c-Fos korrelierte hingegen weder zu Grading und histologischem Typ, noch zu den anderen klinisch-pathologischen Parametern.

Das Alter der Patientinnen korrelierte mit dem AP-1-Protein Fra 1. Es zeigte sich eine tendenziell höhere Expression ($p=0,072$) bei Patientinnen über 50 Jahren im Vergleich zu den unter 50-jährigen mit einem Ovarialkarzinom (Abb. 16). So lag bei 67% der Karzinome der Patientinnen über 50 Jahren eine positive Fra 1-Expression vor, wohingegen nur 29% der Karzinome der unter 50-jährigen eine positive Fra 1-Expression aufwiesen.

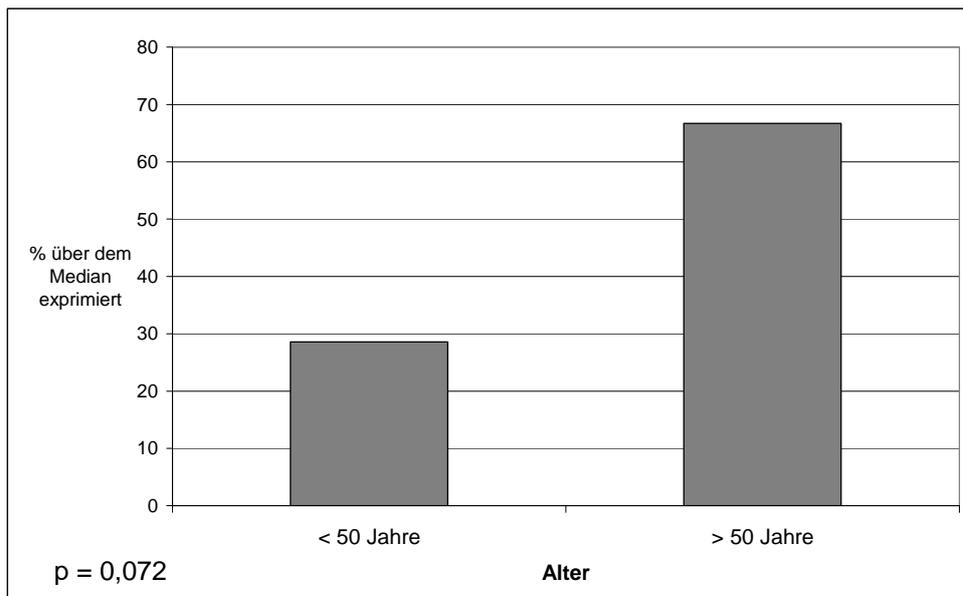


Abbildung 16: Korrelation von Fra 1 und dem Alter

Die AP-1 Faktoren pc-Jun und Fos B zeigten keinerlei signifikante Korrelationen zu den klinisch-pathologischen Parametern Gewebetyp, Grading, Staging, Histologie und Alter der Patientin.

3.3. Vergleich der Karzinome und Metastasen

Bei allen untersuchten Jun-Proteinen war die Expressionsstärke in den Karzinomen und Metastasen ähnlich (Abb. 17).

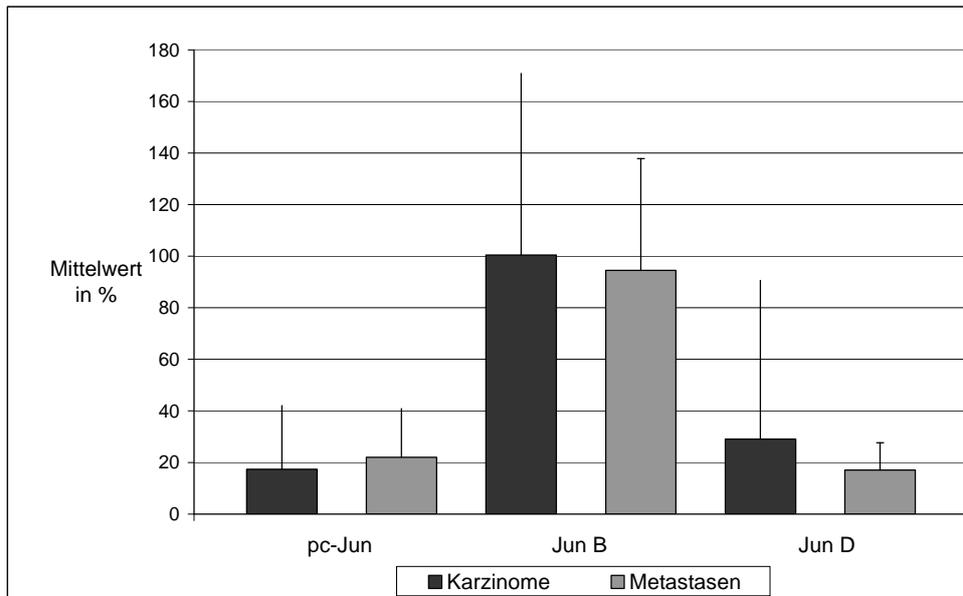


Abbildung 17: Mittelwerte der Jun-Proteine mit Standardabweichung für die Karzinome und Metastasen

Ein etwas größerer Unterschied war bei Jun D zu erkennen. Dort war die Expression in den Karzinomen um den Faktor 1,7 höher im Vergleich zu den Metastasen.

Bei der Auswertung von c-Fos, Fos B und Fra 2 zeigte sich, dass die Expressionsstärke in den Karzinomen über der der Metastasen lag (Abb. 18).

C-Fos wurde in den Karzinomen im Vergleich zu den Metastasen um einen Faktor von 1,8 stärker exprimiert. Auch die phosphorylierte Form wurde in den Karzinomen (Mittelwert = 148,8%) stärker exprimiert als in den Metastasen (Mittelwert = 86,5%) (Faktor 1,7).

Die Untersuchung von Fos B ergab den deutlichsten Unterschied mit einer stärkeren Expression in den Karzinomen (Faktor 2,1).

Die Unterschiede in der Expression von Fra 2 waren nur minimal. Dies zeigte sich auch bei der phosphorylierten Form von Fra 2. Hier war die Expression in den Karzinomen (Mittelwert = 84,9%) und in den Metastasen (Mittelwert = 75,4%) auf ähnlichem Niveau.

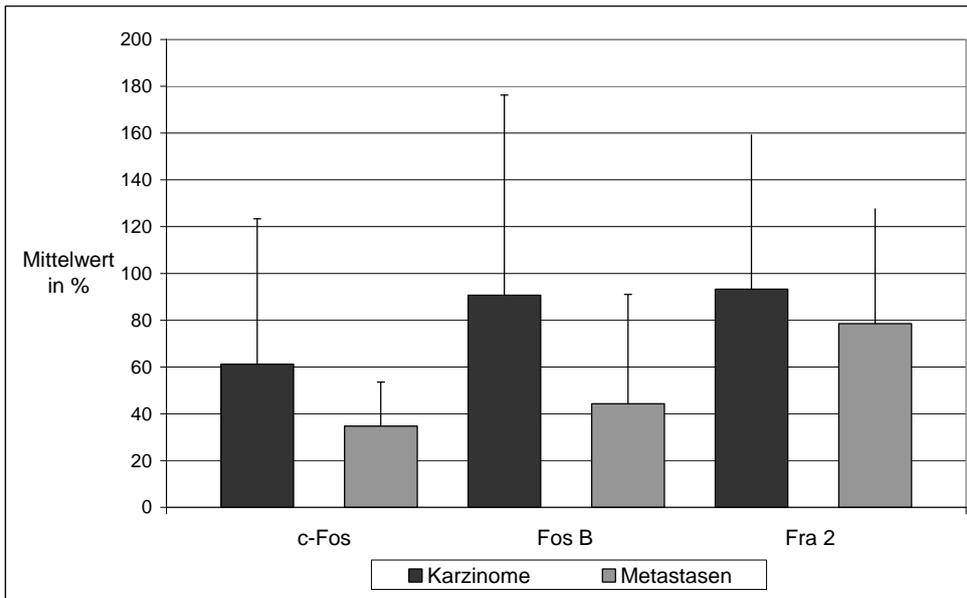


Abbildung 18: Mittelwerte der Fos-Proteine mit Standardabweichung für die Karzinome und Metastasen

Die Expression von Fra 1 war in den Karzinomen und Metastasen gleich stark (Abb. 19). Aufgrund der semiquantitativen Auswertung muss Fra 1 allerdings gesondert dargestellt werden.

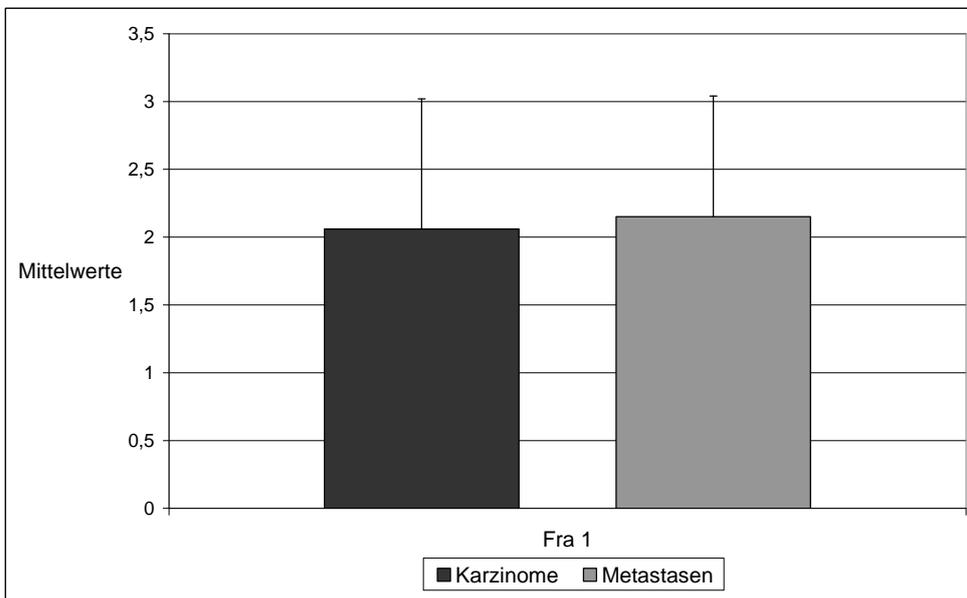


Abbildung 19: Mittelwerte von Fra 1 mit Standardabweichung für die Karzinome und Metastasen

3.3.1. Vergleich der korrespondierenden Karzinome und Metastasen

Bei der Untersuchung von 9 Paaren zusammengehöriger Karzinome und Metastasen im Hinblick auf die Jun-Proteine zeigten sich im Mittel nur minimale Unterschiede in der Expressionsstärke (Tab. 30).

Tabelle 30: Jun-Expression der korrespondierenden Karzinome und Metastasen

	Ca > Met.	Met. > Ca	Ca = Met.
pc-Jun	4	3	2
Jun B	4	2	3
Jun D	4	2	3

Die c-Fos-, pc-Fos- und Fos B-Expression war in den Karzinomen im Mittel etwas stärker als in den dazugehörenden Metastasen. Bei Fra 1 war die Expression erneut gleich stark. Fra 2 zeigte eine stärkere Expression in den Karzinomen, allerdings galt dies nicht für die phosphorylierte Form von Fra 2 (Tab. 31).

Tabelle 31: Fos-Expression der korrespondierenden Karzinome und Metastasen

	Ca > Met.	Met. > Ca	Ca = Met.
c-Fos	5	3	1
pc-Fos	5	3	1
Fos B	5	4	0
Fra 1	2	1	6
Fra 2	5	3	1
pFra 2	4	4	1

3.4. Vergleich der Karzinome mit den Borderline- und gutartigen Tumoren

Auch der Vergleich der Karzinome mit den anderen Tumorentitäten ergab bei der Betrachtung der Jun-Proteine ähnliche Ergebnisse (Abb. 20).

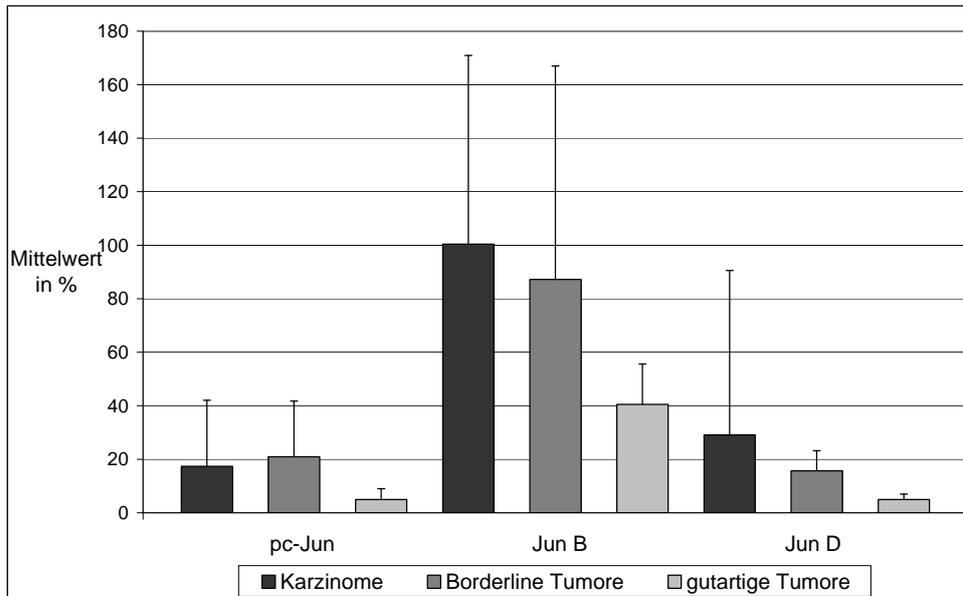


Abbildung 20: Mittelwerte der Jun-Proteine mit Standardabweichung nach Tumortyp

So wiesen die Karzinome bei Jun B und Jun D die höchste Expression auf, gefolgt von den Borderline-Tumoren und den gutartigen Tumoren. Die gutartigen Tumore exprimierten Jun B um einen Faktor von 2,5 weniger als die Karzinome, bei Jun D war die Expression sogar um einen Faktor von 5,9 geringer. Die Unterschiede zwischen den Karzinomen und Borderline-Tumoren waren wesentlich geringer.

Die Expression von pc-Jun in den gutartigen Tumoren war niedriger im Vergleich mit den Karzinomen (Faktor 3,5). Jedoch lag die Expression in den Borderline-Tumoren geringfügig über der der Karzinome.

Im Gegensatz zu den Jun-Proteinen ergab der Vergleich der verschiedenen Tumorentitäten bei den Fos-Proteinen unterschiedlichere Ergebnisse. Im Wesentlichen zeigten allerdings auch die gutartigen Tumore eine niedrigere Expression im Vergleich mit den Karzinomen (Abb. 21).

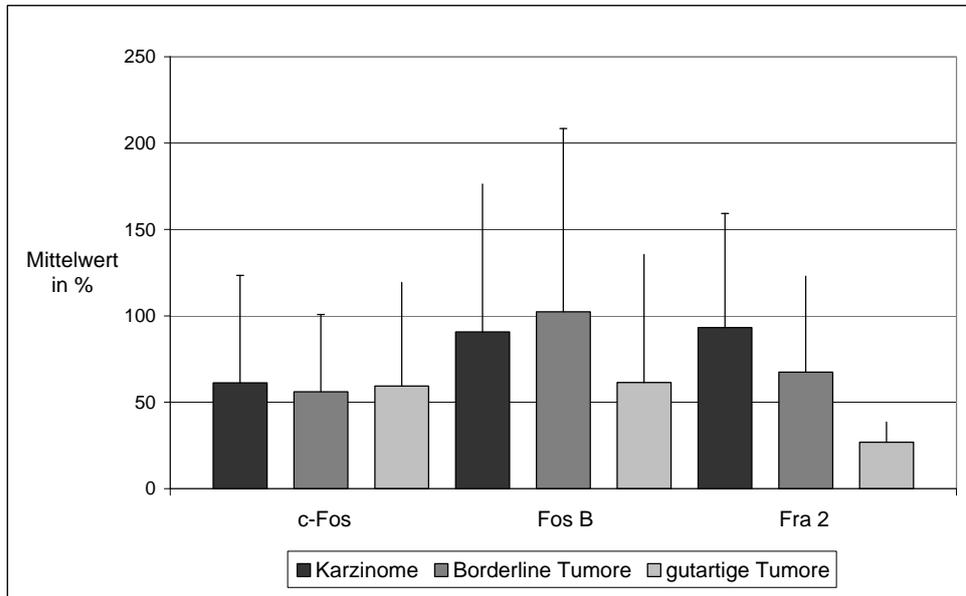


Abbildung 21: Mittelwerte der Fos-Protein-Expression mit Standardabweichung nach Tumortyp

Die Expressionsstärke von Fos B und Fra 1 war in allen drei Tumorentitäten ähnlich (Abb. 21 & 22). Die gutartigen Tumore exprimierten Fos B geringfügig niedriger (Faktor 1,5) als die Karzinome.

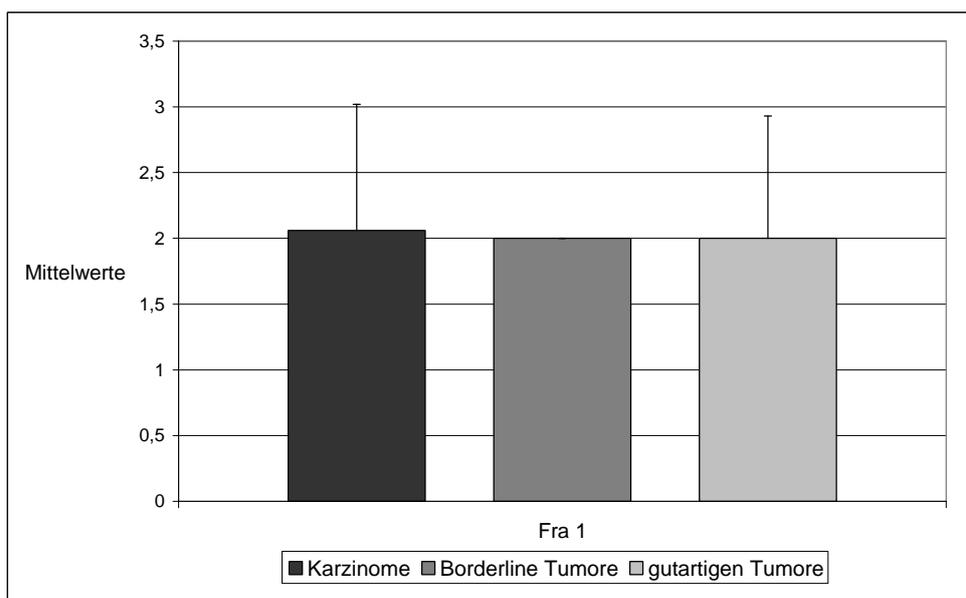


Abbildung 22: Mittelwerte der Fra 1-Expression mit Standardabweichung nach Tumortyp

Die Expression von c-Fos war in allen drei Tumorentitäten ähnlich. Im Gegensatz dazu wurde die phosphorylierte Form von c-Fos in den Karzinomen deutlich stärker exprimiert (Faktor 6,3) als in den gutartigen Tumoren. Die Borderline-Tumore zeigten eine etwas geringere pc-Fos Expression als die Karzinome (Abb 23).

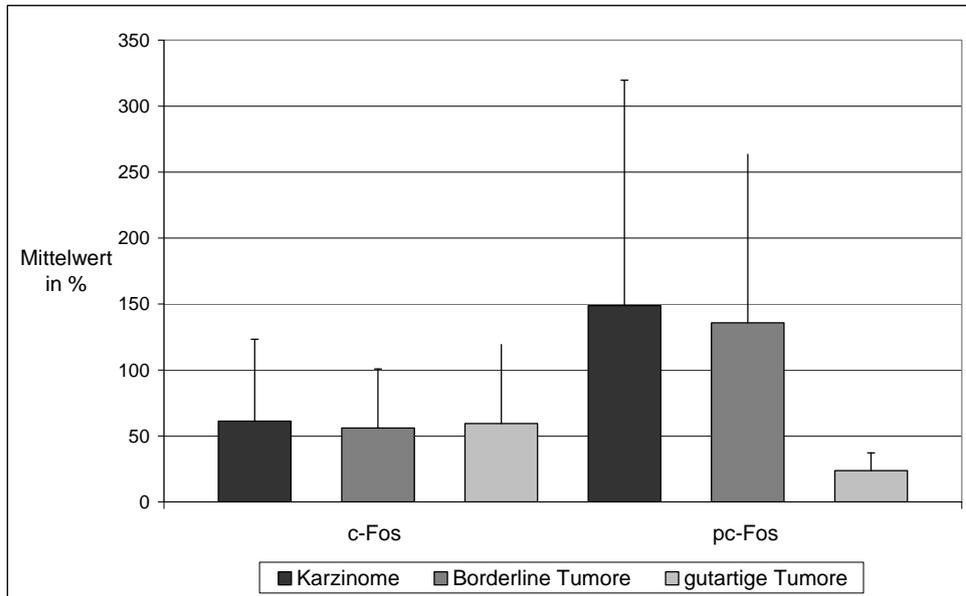


Abbildung 23: Mittelwerte der c-Fos- und pc-Fos-Expression mit Standardabweichung nach Tumortyp

Auch Fra 2 zeigte eine um den Faktor 3,5 niedrigere Expression in den gutartigen Tumoren im Vergleich zu den Karzinomen. Dies wurde bei der Auswertung der phosphorylierten Form noch deutlicher, dort war pFra 2 in den gutartigen Tumoren um den Faktor 5,2 niedriger exprimiert als in den Karzinomen. In den Borderline-Tumoren war die Expression etwas geringer als in den Karzinomen, dies galt auch für die phosphorylierte Form von Fra 2 (Abb. 24).

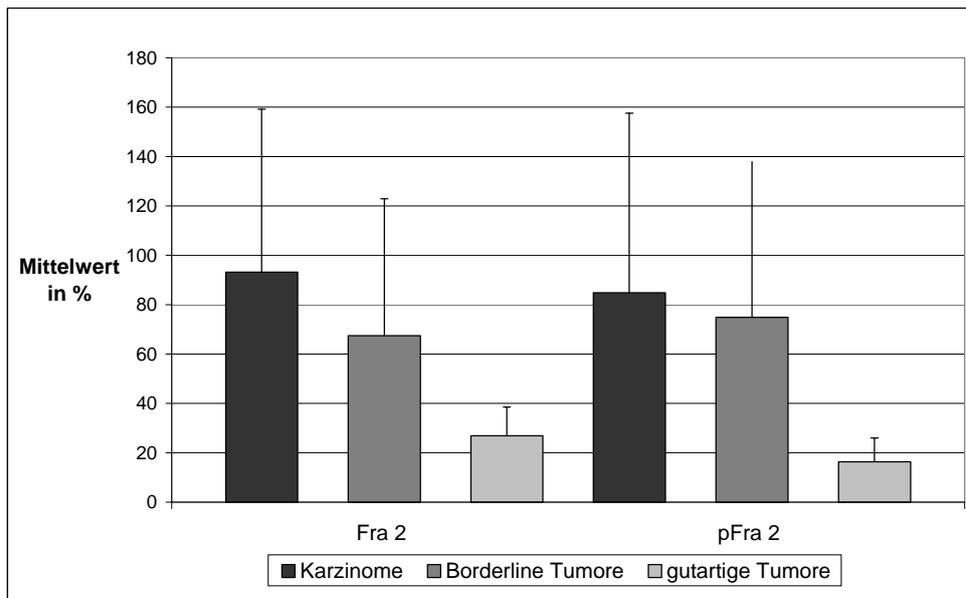


Abbildung 24: Mittelwerte der Fra 2- und pFra 2-Expression mit Standardabweichung nach Tumortyp

3.5. Vergleich der Karzinome mit den Normalgeweben

Die Expressionsstärke in den Normalgeweben war in allen untersuchten Jun-Proteinen höher als in den Karzinomen (Abb. 25).

Pc-Jun und Jun D zeigten eine minimal höhere Expression in den Normalgeweben. Dahingegen war der Unterschied bei Jun B deutlicher, hier lag eine um den Faktor 2,5 stärkere Expression in den Normalgeweben vor.

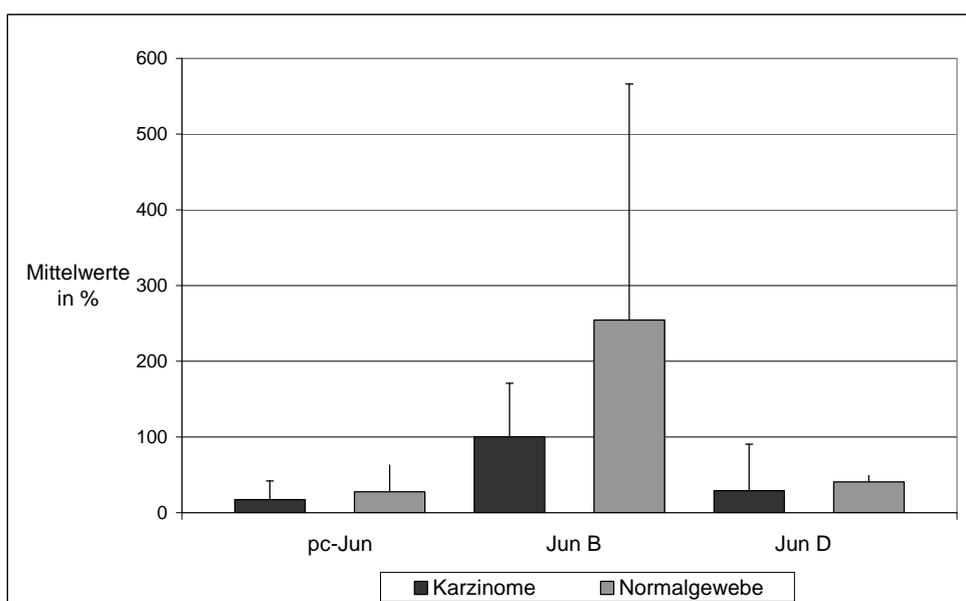


Abbildung 25: Mittelwerte der Jun-Proteine mit Standardabweichung für die Karzinome und Normalgewebe

Die Mehrzahl der untersuchten Fos-Proteine war in den Normalgeweben stärker exprimiert als in den Karzinomen (Abb. 26).

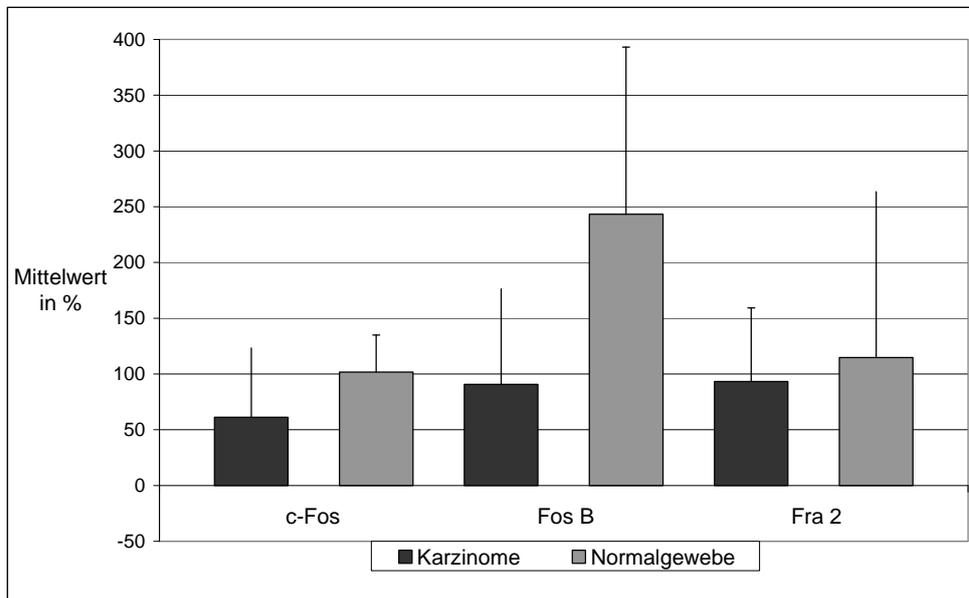


Abbildung 26: Mittelwerte der mit Standardabweichung für die Karzinome und Normalgewebe

C-Fos wurde in den Normalgeweben um den Faktor 1,7 stärker exprimiert als in den Karzinomen. Die phosphorylierte Form hingegen zeigte eine ausgeglichene Expression in beiden Gewebearten.

Die Untersuchung auf Fos B zeigte den deutlichsten Unterschied in der Expression mit einer um den Faktor 2,7 stärkeren Ausprägung in den Normalgeweben.

Fra 2 wie auch pFra 2 wurde in den Normalgeweben verglichen mit den Karzinomen minimal stärker exprimiert.

Die Ausnahme bildete Fra 1, dort war die Expression der Normalgewebe geringfügig niedriger im Vergleich zu den Karzinomen (Abb. 27).

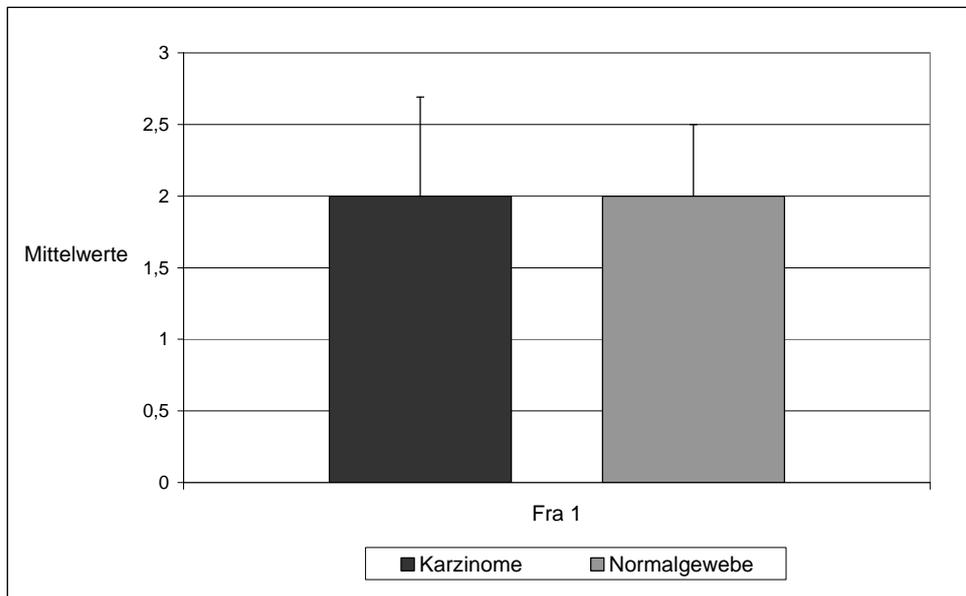


Abbildung 27: Mittelwerte der Fra 1-Expression mit Standardabweichung für die Karzinome und Normalgewebe

4. Diskussion

Diese Arbeit ist die erste Analyse aller sieben AP-1-Faktoren in Bezug auf ihr Vorkommen in verschiedenen epithelialen Ovarialtumoren.

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wurden in 60 untersuchten Gewebeproben z.T. erhebliche Unterschiede in der Expression der AP-1-Proteine nachgewiesen. Zur Auswertung der Expressionsmuster wurden klinische und pathologische Parameter erhoben, mit denen die AP-1-Ergebnisse korreliert wurden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen auf eine mögliche Rolle der AP-1-Faktoren in der Proliferation und Invasion von Ovarialtumoren hin. Allerdings sind weiterführende Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven notwendig.

4.1. Möglichkeiten und Grenzen der Methoden

Die Methode Western-Blot ist gut geeignet zum Nachweis von Proteinen in Tumoren mit einem hohen Anteil an Tumorzellen. Durch diese Methode lässt sich eine Aussage darüber treffen, wieviel Protein in den Zellen exprimiert wird. Daher wurde bei der Auswahl der Gewebestücke auf einen Tumorgehalt von mehr als 70 % geachtet. Aufgrund des gleichmäßig hohen Tumorgehaltes der Gewebestücke lassen sich auch die Tumore untereinander (Karzinome und Karzinome) als auch die verschiedenen Tumorentitäten (Karzinome, Metastasen, Borderline-Tumore, benigne Tumore) vergleichen.

Allerdings gibt es auch in Tumoren eine Heterogenität zwischen den Zellen, so dass nicht alle Zellen alle Proteine in gleichem Maße exprimieren. Dies erklärt die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse und der der Immunhistochemie. Die Methode der Immunhistochemie ist besonders geeignet zur Beurteilung, wo im Tumor das entsprechende Protein exprimiert wird, im Zellkern, im Zytoplasma oder auch in den Stromazellen des Tumors.

Schwieriger ist es bei den Normalgeweben der Ovarien. Im Ovar findet sich immer nur eine Schicht des Oberflächenepithels (von wo ein epithelialer Tumor seinen Ausgang nimmt). Demnach kann in Normalgeweben kein den Tumoren entsprechender Gehalt an Oberflächenepithel gegeben sein. Demnach wird vermutlich ein großer Teil der untersuchten Proteine in den Stromazellen der Rinde exprimiert. Daher ist der Vergleich mit den Karzinomen schwierig. Somit ist der hohe Gehalt an den untersuchten Proteinen für die Jun-Proteine, c-Fos und FosB in den Normalgeweben wahrscheinlich nicht allein auf das Oberflächenepithel zurückzuführen.

In der Immunhistochemie kann man dies besser beurteilen, allerdings ist es auch hier schwierig ein komplettes Oberflächenepithel zu erhalten, da es bei der Aufbereitung der Gewebeproben oft beschädigt wird.

4.2. Die Jun-Proteine

Für den AP-1-Faktor c-Jun sind transformierende Eigenschaften besonders nach Überexpression bereits aus vielen Studien bekannt (Angel et al. 1991, Karin et al. 1997, Schütte et al. 1989b). Für Jun B und Jun D hingegen konnte bisher kein onkogenes Potential nachgewiesen werden. Es wurde im Gegensatz beobachtet, dass Jun B und Jun D eher einen hemmenden Einfluß auf die Transformation besitzen (Castelazzi et al. 1991, Pfarr et al. 1994, Schütte et al. 1989a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Antikörper pc-Jun anstatt c-Jun gearbeitet. Somit können die Ergebnisse natürlich durch posttranslationale Phosphorylierung von denen abweichen, die man eventuell mit einem c-Jun Antikörper erzielt hätte.

In dieser Studie zeigte **pc-Jun** eine niedrige bis mittlere Expression in den Karzinomen und Borderline-Tumoren. Jun B und Jun D zeigten dem gegenüber eine etwas stärkere Bandenfärbung im Western-Blot. In einer Untersuchung von Ovarialtumoren auf Jun-mRNA mittels Northern-Blot wiesen auch Neyns et al. eine schwächere c-Jun-Expression verglichen mit Jun B und D nach (Neyns et al. 1996). Untersuchungen an Mamma- und Endometriumkarzinomen zeigten ebenfalls eine schwächere Färbung der c-Jun-Banden im Vergleich zu Jun B und Jun D (Bamberger et al. 1999 und 2001).

Für die normale Entwicklung und Proliferation von Zellen ist c-Jun essentiell (Karin et al. 1997). Das ovarielle Epithel spielt die entscheidende Rolle in den reparativen Vorgängen nach der Ovulation, somit könnte sich ein hoher Basislevel an c-Jun in den Epithelzellen der Normalgewebe erklären, welcher im Rahmen dieser Studie festgestellt wurde. C-Jun ist in der Lage die eigene Transkription durch positive Autoregulation zu verstärken (Sassone-Corsi et al. 1988, Schönthal et al. 1989). Eine ungehemmte c-Jun-Expression kann zu neoplastischer Transformation führen (Schütte et al. 1989b). Dies konnten wir allerdings hier nicht beobachten.

Eine niedrige c-Jun-Expression in Karzinomzellen könnte auf eine autonome Vermittlung von Wachstumsignalen zurückgeführt werden. In diesem Fall wäre c-Jun nicht mehr notwendig für die Proliferation der Tumore.

Jun B zeigte die stärkste Expression, gemessen an der Bandstärke der Jun-Proteine im Western-Blot. Die Studie von Neyns et al. zeigte für die epithelialen Ovarialtumoren eine starke Bandenfärbung von Jun B vergleichbar mit der von Jun D, auch war die Färbung von Jun B deutlich stärker als die von c-Jun, was analog zu unseren Ergebnissen ist (Neyns et al. 1996). Auch in Endometriumkarzinomen zeigte sich eine hohe Expression von Jun B (Bamberger et al. 2001). In Mammakarzinomen zeigte Jun B eine mittlere Expression (Bamberger et al. 1999).

Jun D zeigte eine mittlere Expressionsstärke innerhalb der Karzinome. Das Expressionsniveau von Jun D-mRNA bei der Untersuchung von Neyns et al. war vergleichbar mit der von Jun B (Neyns et al. 1996). Die Studie an Mammakarzinomen von Bamberger et al. zeigte eine starke Jun D-Expression (Bamberger et al. 1999). In Endometriumkarzinomen zeigte Jun D die stärkste Bandenfärbung der Jun-Proteine (Bamberger et al. 2001).

Somit scheint die Expression von Jun B in den Ovarialkarzinomen ähnlich der in Endometriumkarzinomen und stärker als die in Mammakarzinomen zu sein. Die Expression von Jun D dagegen ist in den Ovarialkarzinomen geringer als in Mamma- und Endometriumkarzinomen.

Jun B und Jun D wirken in normalen Zellen eher hemmend auf die Zellproliferation (Shaulian et al. 2001). Als Heterodimere mit c-Jun sind sie in der Lage die AP-1-Aktivität zu hemmen (Schütte et al. 1989a, Hirai et al. 1989, Chiu et al. 1989, Angel et al. 1991). Eine verringerte Transkription von Jun B und Jun D könnte zu einer ungehemmten transformierenden Wirkung von c-Jun führen und somit die Karzinogenese fördern.

Die Normalgewebe zeigten bei allen drei Jun-Proteinen die höchste Jun-Expression im Western-Blot. Es ist bekannt, dass Jun B und Jun D in normalen Mausovarien exprimiert werden und auch eine Koexpression von c-Jun bewirken (Hirai et al. 1989). Neyns et al. untersuchten auch Normalgewebe und zeigten ebenfalls moderate bis hohe Level an c-Jun-, Jun B- und Jun D-mRNA (Neyns et al. 1996).

Eine Erklärung für die hohen Gehalte an Jun-Proteinen in den Normalgeweben wäre die zusätzliche Expression von AP-1 in den Stromazellen der Ovarien. Da Normalgewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe mehr Stromazellen als Epithelzellen enthält, kommt es somit zu einer gesteigerten Jun-Expression.

Mittels Immunhistochemie kann die Beurteilung der Lokalisation der Proteine im Gewebe erfolgen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunhistochemischen Untersuchungen an den Normalgeweben bestätigten eine Anfärbung der Stromazellen neben dem Oberflächenepithel.

Bei allen drei Jun-Proteinen auffallend war eine deutlich niedrigere Expression in den gutartigen Tumoren. In der Korrelation zwischen den Gewebetypen zeigte sich dies für Jun B ($p = 0,032$) und Jun D ($p = 0,015$) im Besonderen. Innerhalb der Tumore zeigte sich eine Staffelung, die die stärkste Expression in den Karzinomen aufwies, gefolgt von den Borderline-Tumoren und den gutartigen Tumoren. Dies könnte einen Einfluss der Jun-Proteine auf die Karzinogenese zeigen, insbesondere auf die Invasivität von Tumoren. Gutartige Tumore, die kein invasives Wachstum aufweisen, besitzen weniger Jun-Proteine. Auch die Immunhistochemie der Karzinome weist auf diesen Zusammenhang hin. Besonders an den Rändern der Tumorzellnester, also der Invasionsfront des Tumors, war eine starke Kernfärbung durch pc-Jun zu beobachten.

Aus der Literatur ist jedoch kein Einfluss speziell der Jun-Proteine auf die Invasivität von Karzinomen bekannt. In Epithelzellen der Mamma ging eine c-Jun-Überexpression nicht mit invasivem Wachstum sondern nur mit einem Verlust der epithelialen Polarität einher (Fialka et al. 1996). Allerdings wies eine andere Studie eine signifikant stärkere Expression von c-Jun und Fra 1 in stark invasiven Mammakarzinomzelllinien auf (Zajchowski et al. 2001).

Der Einfluß auf die Proliferation scheint dagegen geringer, da auch gutartige Tumore eine hohe Proliferationsrate aufweisen und eine beträchtliche Größe annehmen können.

Für alle drei Jun-Proteine zeigten sich keine auffälligen Unterschiede in der Expression zwischen den Karzinomen und Metastasen. Dies bestätigen Untersuchungen an den Mäusemammakarzinomzelllinien CSML0 und CSML100. Die Jun-Expression in der schwach invasiven und nicht metastasierenden Zelllinie CSML0 und der stark metastasierenden Zelllinie CSML100 unterschied sich nicht (Milde-Langosch 2005).

4.3. Die Fos-Proteine

Ebenso wie c-Jun ist auch c-Fos seit langem bekannt für sein Potential zur Transformation. So verursachte eine c-Fos-Überexpression in Hühnerembryofibroblasten (Suzuki et al. 1991), als auch in Rattenfibroblasten (Angel et al. 1991) eine maligne neoplastische Transformation. Im Knochengewebe von Mäusen führte die Überexpression von c-Fos zur Entstehung von Osteosarkomen (Angel et al. 1991, Karin et al. 1997). In serösen Ovarialkarzinomen wiesen Tsuda et al. mittels CGH (cDNA array comparative genomic hybridization)-Analyse eine c-Fos-Amplifikation und Überexpression nach (Tsuda et al. 2004).

In dieser Studie zeigte **c-Fos** große Unterschiede in der Expression in den Karzinomen, somit ließ sich eine generelle Überexpression in den Karzinomen nicht bestätigen. Die Studie von Bamberger et al. an Mammakarzinomen ergab ebenfalls eine große Bandbreite der c-Fos-Expression (Bamberger et al. 1999).

Zusätzlich fiel auf, dass auch die Borderline-Tumore und gutartigen Tumore eine ähnliche Expression zeigten wie die Karzinome, was im Gegensatz zu den Jun-Proteinen steht. Dies könnte eine stärkere Beteiligung von c-Fos an der Proliferation von Ovarialtumoren bedeuten, während die Invasivität nicht beeinflusst scheint.

Dahingegen belegte eine Untersuchung von Reichmann et al. für Epithelzellen der Mamma, dass eine ektope Expression von c-Fos einen Verlust der Polarität des Epithels, epitheloide-fibroblastoide Zellkonversion und invasives Wachstum in Kollagengel bewirkt (Reichmann et al. 1992).

Im Gegensatz zu c-Fos fiel bei der Auswertung der phosphorylierten Form **pc-Fos** auf, dass die Karzinome eine hohe Expression aufwiesen, und es nur wenige Karzinome mit niedriger pc-Fos-Expression gab. Zusätzlich zeigten die gutartigen Tumore eine sehr niedrige Expression im Gegensatz zu Gesamt-c-Fos. Daraus kann man schließen, dass der Grad der Phosphorylierung Einfluß auf die Regulation und Funktion von AP-1 besitzen könnte. Dies ist auch aus einigen Studien bekannt. Dort veränderte die posttranslationale Modifikation die Proteinstabilität, DNA-Bindungs-Aktivität und das Transaktivationspotential der Transkriptionsfaktoren (Gruda et al. 1994, Hurd et al. 2002, Rosenberger et al. 1999).

C-Fos zeigte eine tendenziell positive Korrelation zum Grading (G 3) ($p = 0,106$) und auch zum histologischen Typ des serösen Karzinoms ($p=0,080$). Ein prognostisch ungünstigerer Tumortyp zeigt demnach in dieser Arbeit eine hohe c-Fos-Expression. Bei der geringen Zahl der untersuchten Tumore macht dies zur genaueren Klärung jedoch weiterführende Untersuchungen erforderlich. Die Studie von Bamberger et al. an Endometriumkarzinomen zeigte signifikante Korrelationen zwischen einer c-Fos-Überexpression und einem niedrigen Grading, sowie einem negativen Hormonrezeptorstatus (Bamberger et al. 2001). Diese Parameter entsprechen ebenfalls einem prognostisch ungünstigen Typ des Endometriumkarzinoms und indizieren eine Rolle von c-Fos in der Tumorprogression und Entdifferenzierung.

Eine Studie von Meinhold-Heerlein et al. zur Genexpression in serösen Ovarialtumoren mit unterschiedlichem Grading und malignem Potential zeigte, dass Borderline-Tumore ein ähnliches Expressionsmuster wie gut differenzierte Karzinome (G1) aufweisen. Ebenso wiesen mäßig und schlecht differenzierte Karzinome (G2 und G3) ein ähnliches Muster auf.

In letzteren zeigte sich eine Überexpression von Genen des Zellzyklus (z. B. Cyclin B) und der Zellproliferation (z. B. ki67). Die c-Fos-Genexpression war in dieser Studie in den prognostisch günstigeren Borderline-Tumoren und G1-Karzinomen höher als in den G2- und G3-Karzinomen (Meinhold-Heerlein et al. 2005).

In der vorgelegten Untersuchung zeigte **Fos B** im Wesentlichen eine hohe Expression in den Karzinomen und Borderline-Tumoren. Bamberger et al. wiesen hingegen für Mamma- und Endometriumkarzinome eine heterogene Verteilung mit sowohl niedriger als auch hoher Expression in den Tumoren nach (Bamberger et al. 1999 und 2001).

Die gutartigen Tumore fielen dahingegen durch eine niedrige Fos B-Expression auf, wie auch schon bei den Jun-Proteinen. Auch die Expression in den Metastasen fiel geringer aus im Vergleich mit den Karzinomen.

Eine mögliche Rolle von Fos B in der Proliferation von Ovarialtumoren scheint nach diesen Ergebnissen eher unwahrscheinlich, da auch gutartige Tumore einen hohen Proliferationsgrad besitzen. Durch seine starke Ähnlichkeit zu c-Fos sind transformierende Eigenschaften für Fos B zu erwarten. So konnte eine onkogene Aktivität von Fos B an Fibroblasten in vitro gezeigt werden (Schuermann et al. 1991), allerdings nicht bei in vivo Versuchen mit transgenen Mäusen (Grigoriadis et al. 1993). Ebenso beschrieben Gruda et al. transformierende Eigenschaften hoher Fos B-Expressionen in Fibroblasten, gleichzeitig aber auch die negative Autoregulation durch sein eigenes Produkt und die gegenseitige Regulierung mit c-Fos (Gruda et al. 1996). Im Gegensatz dazu werden Fos B-knock-out-Mäuse mit unauffälligem Phänotyp geboren und pflanzen sich normal fort, sind allerdings um 10% kleiner als Fos B-positive Mäuse (Gruda et al. 1994). Dies spricht eher gegen eine transformierende Wirkung von Fos B.

In der Immunhistochemie färbten sich die Zellkerne an den Invasionsfronten der Tumorzellnester stärker an als die im Zentrum. Folglich wäre eine Beteiligung von Fos B an der Entwicklung eines invasiven Tumors denkbar. Aus der Literatur ist nach c-Fos-Überexpression eine Veränderung von Epithelzellen hin zu invasivem Wachstum bekannt (Reichmann et al. 1992), dies wurde bisher aber noch nicht für Fos B nachgewiesen. Allerdings ist durch die enge Verwandtschaft von c-Fos und Fos B durchaus eine ähnliche Wirkung von Fos B vorstellbar. Weiterführende Untersuchungen darüber sind notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit korrelierte Fos B mit keinem der klinisch-pathologischen Parameter. In den Studien mit Mamma- und Endometriumkarzinomen zeigte Fos B starke Korrelationen zu den Hormonrezeptoren, die auf eine hohe Expression in rezeptorpositiven Tumoren mit guter Prognose hinwiesen (Bamberger et al. 1999 und 2001).

AP-1-Komplexe, die Fra 1 und Fra 2 enthalten, besitzen ein niedriges Transaktivationspotential (Suzuki et al. 1991) und scheinen als negative Regulatoren zu wirken, die die Dauer der AP-1-Aktivität begrenzen (Wisdom et al. 1993).

Dennoch wurde eine transformierende Aktivität von Fra 1 und Fra 2 nachgewiesen, diese ist jedoch im Vergleich zu c-Fos und Fos B schwach (Jochum et al. 2001), bedingt durch das Fehlen der c-terminalen Transaktivierungsdomäne bei Fra 1 und Fra 2 (Wisdom et al. 1993).

Die **Fra 1** Expression in den Karzinomen war heterogen verteilt, es gab sowohl Tumore mit mäßiger Expression, als auch welche, bei denen kein Fra 1 nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zur Kontrolle war die Fra 1-Expression in den Tumoren immer schwächer. In Mammakarzinomen hingegen zeigte sich ein durchweg negatives bis schwaches Expressionsmuster für Fra 1 (Bamberger et al. 1999). Die gleiche Beobachtung ergab die Untersuchung von Endometriumkarzinomen (Bamberger et al. 2001).

Aus der Literatur ist Fra 1 dafür bekannt, an der Regulation der Invasion von Tumoren beteiligt zu sein. In Mäuseadenokarzinomzellen korrelierte eine Fra 1-Überexpression mit mesenchymalen Veränderungen der Zellen, ihrer Motilität, Invasionsfähigkeit und der Transkription tumorprogressionsassoziiertes Gene (Kustikova et al. 1998). Auch haben Mammaadenokarzinom-Zelllinien, die Fra 1 überexprimieren eine verstärkte Motilität und Invasivität in vitro gezeigt (Kustikova et al. 1998, Milde-Langosch et al. 2004). Eine Studie von Hapke et al. deutet darauf hin, dass Fra 1 möglicherweise an Veränderungen der Motilität, Haftung und Proliferation auch von menschlichen Ovarialkarzinomzellen beteiligt ist (Hapke et al. 2003). Tchernista et al. wiesen ebenfalls einen Einfluss von Fra 1 auf das Zellwachstum und Überleben nach. So senkte die Herunterregulierung von Fra 1 mittels RNA-Interferenz in zuvor K-ras-transformierten ovariellen Rattenepithelzellen (ROSE), die Fra 1 überexprimierten, deren Proliferationsrate um 50% (Tchernista et al. 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine eindeutigen Schlüsse im Hinblick auf eine Rolle von Fra 1 in der Proliferation und Invasivität von Ovarialkarzinomen gezogen werden.

Als einziger der untersuchten AP-1-Faktoren war die Fra 1-Bandenstärke in den Normalgeweben schwächer als in den Karzinomen, ebenso auch bei den gutartigen und Borderline-Tumoren. Ähnliches konnten auch Bamberger et al. in Endometriumkarzinomen beobachten (Bamberger et al. 2001).

Eine hohe Fra 1-Expression korrelierte mit einem Alter der Patientinnen über 50 Jahren ($p=0,072$). Dies könnte mit der veränderten Hormonlage zusammen hängen und könnte auf einen prognostisch ungünstigen Tumor hinweisen. Bamberger et al. konnten gleichfalls beim Mammakarzinom beobachten, dass eine hohe Fra 1 Expression auf einen prognostisch ungünstigeren Tumortyp hinwies (Bamberger et al. 1999).

Über das onkogenes Potential von Fra 2 ist wenig bekannt. So führte in Hühnerembryofibroblasten eine Überexpression von Fra 2 zu zellulärer Transformation, ähnlich c-Fos (Nishina et al. 1990). Andererseits konnte bei Überexpression von Fra 1 und 2 in 208F-Fibroblasten kein transformierendes Potential nachgewiesen werden (Wisdom et al. 1993).

Fra 2 ist in den Ovarialkarzinomen tendenziell höher exprimiert ($p=0,056$) als in gutartigen Tumoren, wie schon die AP-1-Faktoren Jun B und Jun D. Bei Betrachtung von **pFra 2** verstärkte sich die positive Korrelation noch ($p=0,039$). Somit könnte auch Fra 2, insbesondere in seiner phosphorylierten Form, an der Invasivität von Tumoren beteiligt sein. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in der Immunhistochemie, dort waren die Zellkerne an der Invasionsfront der Tumore stark gefärbt.

In der Studie von Bamberger et al. an Endometriumtumoren zeigte sich ebenfalls eine stärkere Fra 2-Expression in den Karzinomen als in untersuchten Normalgeweben (Bamberger et al. 2001). Auch die Untersuchung an Mammakarzinomen wies eine mittlere bis starke Fra 2-Expression nach (Bamberger et al. 1999).

Die Studie von Milde-Langosch et al. zum Einfluss von Fra 2 auf Invasivität und Motilität in Mammakarzinomen wies eine starke Expression von Fra 2 in Zelllinien und Tumorgeweben nach. Es zeigte sich eine Verbindung zwischen Überexpression von Fra 2 und einem aggressiven Phänotyp der Tumore, da das invasive Potential verstärkt wurde (Milde-Langosch et al. 2007).

Auffallend war bei den Fos-Proteinen, dass die Expression in den Karzinomen stärker war als in den Metastasen, einzige Ausnahme bildete Fra 1, dort war die Expression gleich.

Eine Untersuchung an den Mäusemammarkarzinomzelllinien CSML0 und CSML100 zeigte große Unterschiede in der Expression der Fos-Proteine. In der schwach invasiven und nicht metastasierenden Zelllinie CSML0 wurde eine starke c-Fos-Expression detektiert. In der stark metastasierenden Zelllinie CSML100 fiel eine starke Fra 1- und 2-Expression auf, wohingegen c-Fos und Fos B nicht nachgewiesen werden konnten (Milde-Langosch 2005). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Da dies die erste Studie ist, in der bei Ovarialkarzinomen Karzinome und Metastasen untersucht wurden, bedarf es weiterer Untersuchungen zur genauen Interpretation der Ergebnisse.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Überexpression der Jun-Proteine und von Fra 2 möglicherweise die Invasivität der Ovarialkarzinome fördert. C-Fos, Fos B und Fra 1 hingegen scheinen eher einen Einfluß auf die Proliferation der Tumorzellen zu besitzen. Den Unterschieden zu den Untersuchungen an Mammarkarzinomen liegt wahrscheinlich die verschiedene Tumorbilogie zu grunde. Abschließend betrachtet scheint die Invasivität und Proliferation von Ovarialtumoren neben AP1-Faktoren auch über andere Mechanismen gesteuert zu werden, die im Rahmen weiterer Studien untersucht werden sollten.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse 31 Ovarialkarzinome, 13 Metastasen, 4 Borderline-Tumore und 8 gutartige Tumore, sowie 4 Normalgewebe auf die Expression der AP-1-Transkriptionsfaktoren (p-Jun, Jun B, Jun D, c-Fos, Fos B, Fra 1 und Fra 2) hin untersucht. Die Auswertung der Western-Blots erfolgte für die Jun-Proteine, c-Fos, Fos B und Fra 2 densitometrisch. Fra 1 wurde semiquantitativ ausgewertet. Zusätzlich erfolgte bei ausgesuchten Tumoren und Normalgeweben ein immunhistochemischer Nachweis der oben genannten Proteine. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit klinisch-pathologischen Parametern (Gewebetyp, FIGO-Stadium, Histologie, Grading, Alter der Patientin) korreliert.

Die Faktoren Jun B, Jun D und Fra 2 (sowie pFra 2) zeigten eine signifikant höhere Expression in den Karzinomen und Borderline-Tumoren im Vergleich zu den gutartigen Tumoren, dies könnte eine Beteiligung an der Invasivität der Ovarialkarzinome vermuten lassen. Die Expression von c-Fos, Fos B und Fra 1 hingegen war in den verschiedenen Tumortypen sehr ähnlich. Generell gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Borderline-Tumoren und Karzinomen. Auffallend war ein niedrigeres Expressionsniveau von c-Fos und Fos B in den Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren, dies spricht eher gegen eine Beteiligung der beiden Faktoren an der Progression von Ovarialkarzinomen.

C-Fos korrelierte positiv mit einem niedrigen Grading und einem serösen histologischen Typ. Demzufolge könnten hohe c-Fos-Expressionen dennoch auf eine proliferationsfördernde Wirkung und einen prognostisch ungünstigen Tumortyp hinweisen. pC-Fos war besonders in den Karzinomen stark exprimiert und niedrig in den gutartigen Tumoren, somit ist eine Modulierung der AP-1-Regulation durch Phosphorylierung anzunehmen.

Die Fra 1-Expression war insgesamt sehr niedrig. Fra 1 war positiv mit einem höheren Alter der Patientinnen korreliert. Dies könnte ebenfalls auf einen prognostisch ungünstigeren Tumortyp mit hoher Fra1-Expression hinweisen.

Abschließend betrachtet scheint die Invasivität und Proliferation von Ovarialtumoren neben AP1-Faktoren auch über andere Mechanismen gesteuert zu werden, die im Rahmen weiterer Studien untersucht werden sollten.

6. Literaturverzeichnis

Angel P., Karin M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1072, 129-157

AWMF-Leitlinien (2002) Maligne Ovarialtumore, 3. Auflage, <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/11/032-035.htm>

Bakin A. V., Curran T. (1999) Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science*, 283 (5400) , 387-390

Bakiri L., Lallemand D., Bossy-Wetzel. E., Yaniv M. (2000) Cell cycle-dependent variations in c-Jun and Jun B phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.*, 19 (9), 2056-2068

Bamberger A.-M., Methner C., Lisboa B. W., Städtler C., Schulte H. M., Löning T., Milde-Langosch K. (1999) Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: Association of Fos B expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int. J. Cancer*, 84, 533-538

Bamberger A.-M., Milde-Langosch K, Rössing E., Goemann C., Löning T. (2001) Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 127, 545-550

Bell D. A. (2005) Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod. Pathol.*, Suppl. 2, 19-32

Bender H. G. (2003) Spezielle gynäkologische Onkologie II (Band 12), 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, 5-85

Blümke S. (1995) Pathologie, W. de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 736-745

Böcker W., Denk, Heitz (2001) Pathologie, 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 842-851

Bristow R. E., Karlan B. Y. (1996) Ovulation induction, infertility and ovarian cancer risk. *Fertil. Steril.*, 66 (4), 499-507

Buys S. S., Partridge E., Greene M. H., Prorok P. C., Reding D., Riley T. L., Hartge P., Fagerstrom R. M., Ragard L. R., Chia D., Izmirlian G., Fouad M., Johnson C. C., Gohagan J. K., PLCO Project Team (2005) Ovarian cancer screening in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening trial: findings from the initial screen of a randomized trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 193 (5), 1630-1639

Castellazzi M., Spyrou G., La Vista N., Dangy J. P., Piu F., Yaniv M., Brun G. (1991) Overexpression of c-Jun, Jun B, or Jun D affects cell growth differently. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (20), 8890-8894

Chaloux E., Lopez-Rovira T., Rosa J. L., Bartrons R., Ventura F. (1998) Jun B is involved in the inhibition of myogenic differentiation by bone morphogenetic protein-2. *J. Biol. Chem.*, 273 (1), 537 - 543

Chan J. K., Kapp D. S., Shin J. Y., Husain A., Teng N. N., Berek J. S., Osann K., Leiserowitz G. S., Cress R. D., O'Malley C. (2007) Influence of the gynaecologic oncologist on the survival of ovarian cancer patients. *Obstet. Gynecol.*, 109 (6), 1342-1350

Chiu R., Angel P., Karin M. (1989) Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell*, 59 (6), 979 – 986

Cohen D. R., Curran T. (1988) Fra-1: a Serum-Inducible, Cellular Immediate-Early Gene That Encodes a Fos-Related Antigen. *Mol. Cell. Biol.*, 8 (5), 2063-2069

Colgan T. J., Murphy J., Cole D. E., Narod S., Rosen B. (2001) Occult carcinoma in prophylactic oophorectomy specimens: prevalence and association with BRCA germline mutation status. *Am. J. Surg. Pathol.*, 25 (10), 1283-1289

Crum C. P., Medeiros F., Kindelberger D., Lee Y. (2006) Lessons from BRCA: the distal fallopian tube is a source of surface ovarian cancer. *ASIP Companion Meeting*

Crum C. P., Drapkin R., Miron A., Ince T. A., Muto M. Kindelberger D. W., Lee Y. (2007) The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 19 (1), 3-9

Curran T., MacConnell W. P., van Straaten F., Verma I. M. (1983) Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.*, 3 (5), 914-921

Curran T., Franza B. R. (1988) Fos and jun: The AP-1 connection. *Cell.*, Vol. 55, 395-397

Dehari R., Kurman R. J., Logani S., Shih I. M. (2007) The Development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumours and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 31 (7), 1007-1012

du Bois A., Pfisterer J. (2004) Primärtherapie des Ovarialkarzinoms. *Zentralbl. Gynäkol.*, 126 (5), 312-314

Earle C. C., Schrag D., Neville B. A., Yabroff K. R., Topor M., Fahey A., Trimble E. L., Bodurka D. C., Bristow R. E., Carney M., Warren J. L. (2006) Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, 98 (3), 172-180

Eferl R., Wagner E. F. (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3 (11), 859-868

Enomoto T., Kuragaki C., Yamasaki M., Sugita N., Otsuki Y., Ikegami H., Matsuzaki N., Yamada T., Wakimoto A., Murata Y. (2003) Is clear cell carcinoma and mucinous carcinoma of the ovary sensitive to combination chemotherapy with paclitaxel and carboplatin? 39th ASCO Annual Meeting, Abst. No. 1797

Fathalla M. F. (1971) Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*, 2 (7716), 163

Fialka I., Schwarz H., Reichmann E., Oft M., Busslinger M., Beug H. (1996) The estrogen-dependent c-Jun ER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J. Cell. Biol.*, 132 (6), 1115-1132

Field S. J., Johnson R. S., Mortensen R. M., Papaioannou V. E., Spiegelman B. M., Greenberg M. E. (1992) Growth and differentiation of embryonic stem cells that lack an intact c-Fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (19), 9306-9310

Finch A., Shaw P., Rosen B., Murphy J., Narod S. A., Colgan T. J. (2005) Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol. Oncol.*, 100 (1), 58-64

Ford D., Easton D. F., Peto J. (1995) Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am. J. Hum. Genet.*, 57 (6), 1457-1462

Frank T. S., Manley S. A., Olopade O. I., Cummings S., Garber J. E., Bernhardt B., Antman K., Russo D., Wood M. E., Mullineau L., Isaacs C., Peshkin B., Buys S., Venne V., Rowley P. T., Loader S., Offit K., Robson M., Hampel H., Brenner D., Winer E. P., Clark S., Weber B., Strong L. C., Thomas A., et al. (1998) Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J. Clin. Oncol.*, 16 (7), 2417-2425

Greiser C. M., Greiser E. M., Dören M. (2007) Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, 27, 1-11

Grigoriadis A. E., Schellander K., Wang Z. Q., Wagner E. F. (1993) Osteoblasts are target cells for transformation in c-Fos transgenic mice. *J. Cell. Biol.*, 122 (3), 685-701

Gross T. P., Schlesselman J. J. (1994) The estimated effect of oral contraceptive use on the cumulative risk of epithelial ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.*, 83 (3), 419-424

Gruda M. C., Kovary K., Metz R., Bravo R. (1994) Regulation of fra-1 and fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene*, 9 (9), 2537-2547

Gruda M. C., van Amsterdam J., Rizzo C. A., Durham S. K., Lira S., Bravo R. (1996) Expression of Fos B during mouse development: normal development of Fos B knockout mice. *Oncogene*, 12 (10), 2177-2185

Hankinson S. E., Colditz G.A., Hunter D. J., Willett W. C., Stampfer M. J., Rosner B., Hennekens C. H., Speizer F. E. (1995) A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 76 (2), 284-290

Hapke S., Kessler H., Lubber B., Bengel A., Hutzler P., Höfler H., Schmitt M., Reuning U. (2003) Ovarian Cancer Cell Proliferation and Motility Is Induced by Engagement of Integrin $\alpha\beta 3$ /Vitronectin Interaction. *Biol. Chem.*, 384, 1073-1083

Hartge P., Whittemore A. S., Itnyre J., McGowan L., Cramer D. (1994) Rates and risks of ovarian cancer in subgroups of white women in the United States. The Collaborative Ovarian Cancer Group. *Obstet. Gynecol.*, 84 (5), 760-764

Hess V., A'Hern R. P., Gore M. E. (2003) Relative platinum-resistance of mucinous carcinoma of the ovary. 39th ASCO Annual Meeting, Abst. No. 1796

Hill C. S., Treisman R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80 (2), 199-211

Hirai S. I., Ryseck R. P., Mechta F., Bravo R., Yaniv M. (1989) Characterization of Jun D: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.*, 8 (5), 1433-1439

Holschneider C. H., Berek J. S. (2000) Ovarian cancer: epidemiology, biology and prognostic factors. *Semin. Surg. Oncol.*, 19 (1), 3-10

Hoskins W. J., McGuire W. P., Brady M. F., Homesley H. D., Creasman W. T., Berman M., Ball H., Berek J. S. (1994) The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 170 (4), 974-979

Hurd T. W., Culbert A. A., Webster K. J., Tavaré J. M. (2002) Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra 1 transcription and phosphorylation. *Biochem. J.*, 368 (2), 573-580

Jochum W., Passequé E., Wagner E. F. (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, 20, 2401-2412

Johnson R. S., Van Lingen B., Papaioannou V. E., Spiegelman B. M. (1993) A null mutation at the c-Jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev*, 7 (7B), 1309-1317

Jordan S. J., Green A. C., Whiteman D. C., Webb P. M. (2007) Risk factors for benign serous and mucinous epithelial ovarian tumours. *Obstet. Gynecol.*, 109 (3), 647-654

Junqueira L.C., Carneiro J. (1996) *Histologie*; 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 579-594

Kallunki T., Deng T., Hibi M., Karin M. (1996) C-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*, 87 (5), 929-939

Karin M. (1995 a) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 270 (28), 16483-16486

Karin M., Hunter T. (1995 b). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.*, 5 (7), 747-757

Karin M., Liu Z., Zandi E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9 (2), 240-246

Karin M. (1998) Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann. NY Acad. Sci.*, 851, 139-146

Kerppola T. K., Curran T. (1996) Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun. *Oncogene*, 9 (3), 675-684

Kovary K., Rizzo C. A., Ryseck R. P., Noguchi T., Raynoschek C., Pelosin J. M., Bravo R. (1991) Constitutive expression of Fos B and its short form, Fos B/SF, induces malignant cell transformation in rat-1A cells. *New Biol.*, 3 (9), 870-879

Kustikova O., Kramerov D., Grigorian M., Berezin V., Bock E., Lukanidin E., Tulchinsky E. (1998) Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, 18 (12), 7095-7105

Lallemant D., Spyrou G., Yaniv M., Pfarr C. M. (1997) Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts., *Oncogene*, 14, 819-830

Maki Y., Bos T. J., Davis C., Starbuck M., Vogt P. K. (1987) Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (9), 2848-2852

Mayr D., Diebold J. (2000) Grading of ovarian carcinomas. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 19 (4), 348-353

Mechta-Grigoriou F., Gerald D., Yaniv M. (2001) The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene*, 20, 2378-2389

Meinhold-Heerlein I., Bauerschlag D., Hilpert F., Dimitrov P., Sapinoso L. M., Orłowska-Volk M., Bauknecht T., Park T.-W., Jonat W., Jacobsen A., Sehouli J., Luttgies J., Krajewski M., Krajewski S., Reed J. C., Arnold N., Hampton G. M. (2005) Molecular and prognostic distinction between serous ovarian carcinomas of varying grade and malignant potential. *Oncogene*, 24, 1053-1065

Miao G. G., Curran T. (1994) Cell transformation by c-Fos requires an extended period of expression and is independent of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.*, 14 (6), 4295-4310

Milde-Langosch K., Röder H., Andritzky B., Aslan B., Hemminger G., Brinkmann A., Bamberger C. M., Löning T., Bamberger A.-M. (2004) The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*, 86, 139-152

Milde-Langosch K. (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur. J. Cancer*, 41, 2449-2461

Milde-Langosch K., Janke S., Wagner I., Schröder C., Streichert T., Bamberger A.-M., Jänicke F., Löning T. (2008) Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility. *Breast Cancer Res. and Treat.*, 107 (3), 337-347

Müller R., Bravo R., Burckhardt J., Curran T. (1984) Induction of c-Fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*, 312, 716-720

Munkarah A., Chatterjee M., Tainsky M. A. (2007) Update on ovarian cancer screening. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 19 (1), 22-26

van Nagell J. R., DePriest P. D., Reedy M. B., Gallion H. H., Ueland F. R., Pavlik E. J., Kryscio R. J. (2000) The efficacy of transvaginal sonographic screening in asymptomatic women at risk for ovarian cancer. *Gynecol Oncol.*, 77 (3), 350-356

Negri E., Franceschi S., Tzonou A., Booth M., La Vecchia C., Parazzini F., Beral V., Boyle P., Trichopoulos D. (1991) Pooled analysis of 3 European case-control studies: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 49 (1), 50-56

Neyns B., Katesuwanasing D., Vermeij J., Bourgain C., Vandamme B., Amfo K., Lissens W., De Sutter P., Hooghe-Peters E., De Grève J. (1996) Expression of the jun family of genes in human ovarian cancer and normal ovarian surface epithelium. *Oncogene*, 12, 1247-1257

Nguyen T., Pickett, C. B. (1992) Regulation of rat glutathione S-transferase Ya subunit gene expression. DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element. *J. Biol. Chem.* 267 (19), 13535-13539

Nishina H., Sato H., Suzuki T., Sato M., Iba H. (1990) Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (9), 3619-3623

Omura G. A., Brady M. F., Homesley H. D., Yordan E., Major F. J., Buchsbaum H. J., Park R. C. (1991) Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J. Clin. Oncol.*, 9 (7), 1138-1150

Ozanne B. W., McGarry L. C., Spence H. J., Johnston I., Winnie J., Meagher L., Stapleton G. (2000) Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme. *Eur. J. Cancer*, 36 (13), 1640-1648

Ozanne B. W., Spence H. J., McGarry L. C., Hennigan R. F. (2007) Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene*, 26, 1-10

Parkin D. M., Bray F., Ferlay J, Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 55 (2), 74-108

Pfarr C. M., Mehta F., Spyrou G., Lallemand D., Carillo S., Yaniv M. (1994) Mouse Jun D negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell.*, 76 (4), 747-760

Piechaczyk M., Blanchard I-M. (1994) C-Fos protooncogene regulation and function. *Crit. Rev. Oncol. Nematol.*, 17 (2), 93-131

Powell C. B., Kenley E., Chen L. M., Crawford B., McLennan J. Zaloudek C., Komaromy M., Beattie M., Ziegler J. (2005) Risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA mutation carriers: role of serial sectioning in the detection of occult malignancy. *J. Clin. Oncol.*, 23 (1), 127-132

Purdie D., Green A., Bain C., Siskind V., Ward B., Hacker N., Quinn M., Wright G., Russell P., Susil B. (1995) Reproductive and other factors and risk of epithelial ovarian cancer: an Australian case-control study. *Survey of Women's Health Study Group. Int. J. Cancer*, 62 (6), 678-684

Ransone L. J., Visvader J., Lamph W. W., Sassone-Corsi P., Verma I. M. (1989) Fos and jun interaction: the role of the leucine zipper. *Int. J. Cancer, Suppl.* 4, 10-21

Reichmann E., Schwarz H., Deiner E. M., Leitner I., Eilers M., Berger J., Busslinger M., Beug H. (1992) Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell.*, 71 (7), 1103-1116

Risch H. A., Marrett L. D., Howe G. R. (1994) Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer. *Am. J. Epidemiol.* 140 (7), 585-597

Roffler-Tarlov S., Jeremy J., Brown G., Tarlov E., Stolarov J., Chapman D. L., Alexiou M., Papaioannou V.E. (1996) Programmed cell death in the absence of c-Fos and c-Jun. *Development*, 122 (1), 1-9

Rosenberger S. F., Finch J. S., Gupta A., Bowden G. T. (1999) Extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of Jun D and Fos B is required for ocadaic acid-induced activator protein 1 activation. *J. Biol. Chem.*, 274 (2), 1124-1130

Rubin E., Farber, J.L. (1999) *Pathology*; 3. Auflage, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1001-1010

Ryseck R. P., Bravo R. (1991) C-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene*, 6 (4), 533-542

Sakurai S., Shimizu Y. , Utsugi K., Umezawa S., Kato T., Fukasawa I., Inaba N., Hasumi K. (2002) Validity of complete paraaortic and pelvic lymphadenectomy in apparent stage I (pT1) ovarian carcinoma. 38th ASCO Annual Meeting, Abstract No: 801

Sassone-Corsi P., Ransone L. J., Lamph W. W., Verma I.M. (1988) Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature*, 336 (6200), 692-695

Sato Y., Shimamoto T., Amada S., Asada Y. Hayashi T. (2003) Prognostic Value of histologic grading of ovarian carcinomas. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 22 (1), 52-56

Schiebler T.H., Schmidt W. (2003) *Anatomie*; 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 660

Schmidt R.F. (1999) *Physiologie kompakt*; 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 169-170

Schmidt-Matthiesen H., Bastert, G., Wallwiener, D. (2002) *Gynäkologische Onkologie*; 7. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart, 73-95

Schönthal A., Büscher M., Angel P., Rahmsdorf H. J., Ponta H., Hattori K., Chiu R., Karin M., Herrlich P. (1989) The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene*, 4 (5), 629-636

Schreiber M., Wang Z., Jochum W., Fetka I., Elliott C., Wagner E. F. (2000) Placental vascularisation requires the AP-1 component Fra 1. *Development*, 127 (22), 4937-4948

Schuermann M., Neuberger M., Hunter J. B., Jenuwein T., Ryseck R. P., Bravo R., Müller R. (1989) The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell.*, 56 (3), 507-516

Schuermann M., Jooss K., Müller R. (1991) Fos B is a transforming gene encoding a transcriptional activator. *Oncogene*, 6 (4), 567-576

Schütte J., Viallet J., Nau M., Segal S., Fedorko J., Minna J. (1989a) Jun-B inhibits and c-Fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-Jun. *Cell*, 59 (6), 987-997

Schütte J., Minna J. D. and Birrer M. J. (1989b) Deregulated expression of human c-Jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated c-Ha-ras gene and transforms rat-1a cells as a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (7), 2257-2261

Sehoul J., Mustea A., Könsgen D., Lichtenegger W. (2004) Etablierte und experimentelle Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms. *Zentralbl. Gynäkol.*, 126 (5), 315-322

Shaulian E., Schreiber M., Piu F., Beeche M., Wagner E. F., Karin M. (2000) The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell.*, 103 (6), 897-907

Shaulian E., Karin M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20, 2390-2400

Shih I. M., Kurman R. J. (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am. J. Pathol.*, 164 (5), 1511-1518

Shimizu Y., Kamoi S., Amada S., Hasumi K., Akiyama F., Silverberg S. G. (1998) Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features - problems involved in the architectural grading system. *Gynecol. Oncol.*, 70 (1), 2-12

Silverberg S. G. (1989) Prognostic significance of pathologic features of ovarian carcinoma. *Curr. Top. Pathol.*, 78, 85-109

Silverberg S. G. (2000) Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 19 (1), 7-15

Smeal T., Binetruy B., Mercola D. A., Birrer M., Karin M. (1991) Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, 354 (6353), 494-496

Stadel B. V. (1975) Letter: The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 123 (7), 772-774

Stauber M., Weyerstahl, T. (2005) *Gynäkologie und Geburtshilfe*; 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 279-296

Suzuki T., Okuno H., Yoshido T., Endo T., Nishina H., Iba H. (1991) Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Res.*, 19 (20), 5537-5542

Tchernitsa O. I., Sers C., Zuber J., Hinzmann B., Grips M., Schramme A., Lund P., Schwendel A., Rosenthal A., Schäfer R. (2004) Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells. *Oncogene*, 23, 4536-4555

Tsuda H., Birrer M. J., Ito Y. M., Ohashi Y., Lin M., Lee C., Wong W. H., Rao P. H., Lau C. C., Berkowitz R. S., Wong K.-K., Mok S. C. (2004) Identification of DNA copy number changes in microdissected serous ovarian cancer tissue using a cDNA microarray platform. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 155, 97-107

Vernooij F., Heintz P., Witteveen E., van der Graaf Y. (2007) The outcomes of ovarian cancer treatment are better when provided by gynaecologic oncologists and in specialized hospitals: a systematic review. *Gynecol. Oncol.*, 105 (3), 801-812

Whittemore A. S., Harris R., Itnyre J., Halpern J. (1992) Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. I. Methods. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am. J. Epidemiol.*, 136 (10), 1175-1183

Whittemore A. S., Gong G., Itnyre J. (1997) Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast cancer and ovarian cancer: results from three U.S. population-based case-control studies of ovarian cancer. *Am. J. Hum. Genet.*, 60 (3), 496-504

Williams T. I., Toups K. L., Saggese D. A., Kalli K. R., Cliby W. A., Muddiman D. C. (2007) Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite and protein biomarkers. *J. Proteome Res.*, 21

Wisdom R., Verma I. M. (1993) Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 7429-7438

WHO: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, IARC Press, 2003, Lyon, 114-145

Yoshioka K., Deng T., Cavigelli M., Karin M. (1995) Antitumor promotion by phenolic antioxidants: Inhibition of AP-1 activity through induction of Fra expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4972-4976

Zajchkowski D. A., Bartholdi M. F., Gong Y., Webster L., Liu H. L., Munishkin A., Beauheim C., Harvey S., Ethier S. P., Johnson P. H. (2001) Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behaviour of breast cancer cells. *Cancer Res.*, 61 (13), 5168-5178

Zerial M., Toschi L., Ryseck R.-P., Schuermann M., Müller R., Bravo R. (1989) The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.*, 8 (3), 805-813

Zurawski V. R., Orjaseter H., Andersen A., Jellum E. (1988) Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, Nov 15 42 (5), 677-680

7. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen Personen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Thomas Löning für das Überlassen des Dissertationsthemas.

Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch für die Betreuung während der praktischen und theoretischen Arbeit sowie für unzählige hilfreiche Hinweise bei der Literatursuche und Zusammenstellung dieser Arbeit.

Gabriele Rieck und Bianca Kelp für die kompetente Anleitung und fachliche Unterstützung in allen Laborfragen.

Meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich mich in allen Lebenslagen immer verlassen kann.

Meinen Schwestern Susanne und Katrin Tirok und Klaus Schipmann für Tipps und Tricks im Umgang mit dem Computer und das Korrekturlesen.

Meinem Mann Daniel Kanowski für seine uneingeschränkte Liebe und Unterstützung in den letzten Jahren.

8. Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

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

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

.....

Christine Kanowski