

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Gynäkologie

Komm. Leiter der Klinik: Priv.-Doz. Dr. med. Sven Mahner

Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors c-Fos in Ovarialkarzinom-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

.

vorgelegt von:
Vera Lilli Haustein
aus Hamburg

Hamburg 2015

wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.11.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Dr. Karin Milde-Langosch

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.	Das humane Ovarialkarzinom	6
1.1.1.	Epidemiologie und Risikofaktoren	6
1.1.2.	Anatomie des Eierstocks	7
1.1.3.	Klinische und histopathologische Klassifizierung des Ovarialkarzinoms	9
1.1.4.	Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms	11
1.2.	Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie	15
1.2.1.	c-Fos	18
1.3.	Kennzeichen der Tumorprogression	21
1.3.1.	Zellproliferation	22
1.3.2.	Zellinvasion	25
1.3.3.	Zellmigration	27
1.3.4.	Selektin-Liganden	28
1.3.5.	Apoptose	29
1.3.6.	Veränderung der Genexpression	32
1.4.	Zielsetzung	33
2.	Material und Methoden	35
2.1.	Material	35
2.1.1.	Allgemeines	35
2.1.1.1.	Verwendete Geräte	35
2.1.1.2.	Verwendete Materialien	36
2.1.1.3.	Verwendete Reagenzien und Chemikalien	36
2.1.2.	Material Zellkultur	38
2.1.2.1.	Zelllinien	38
2.1.2.2.	Plasmide	38

2.1.3.	Antikörper.....	39
2.1.4.	Fertig-Kits.....	40
2.1.5.	Puffer und Lösungen.....	41
2.2.	Methoden.....	43
2.2.1.	Zellbiologische Methoden.....	43
2.2.1.1.	Allgemeine Zellkultur.....	43
2.2.1.2.	Passagieren der Zellen.....	43
2.2.1.3.	Kryokonservierung der Zellen.....	44
2.2.1.4.	Auftauen der Zellen.....	45
2.2.1.5.	Zellzahlbestimmung.....	46
2.2.1.6.	Stabile Transfektion, Selektion und Einzel-Zellklonierung der Zellen.....	46
2.2.1.7.	Proliferations-Assay: Cell Proliferation Kit I (MTT).....	50
2.2.1.8.	Invasions- und Migrations-Assay.....	51
2.2.1.9.	Wundheilungs-Assay.....	55
2.2.1.10.	Apoptose-Assay für die Anfärbung mit M30 auf Cytospins.....	57
2.2.1.11.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	60
2.2.2.	Proteinbiochemische Methoden.....	64
2.2.2.1.	Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen.....	64
2.2.2.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	65
2.2.2.3.	Western-Blot-Analyse.....	67
2.2.2.4.	Densitometrische Auswertung.....	74
2.2.2.5.	Quantitative Bestimmung von uPA durch ELISA-Analyse.....	75
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	75
2.2.3.1.	RNA-Isolation und photometrische Bestimmung von RNA-Konzentrationen.....	75
2.2.3.2.	cDNA Microarray.....	77
2.2.4.	Statistische Auswertung und Darstellung.....	79

3.	Ergebnisse	82
3.1.	Herstellung von stabilen SKOV3-Zelllinien.....	82
3.1.1.	Etablierung der beiden c-Fos überexprimierenden SKOV3-Zelllinien und der Kontrollzelllinie	82
3.2.	Funktionelle Analysen zur Rolle von c-Fos in der Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3.....	84
3.2.1.	C-Fos schwächt die Proliferation von SKOV3-Zellen unter Nahrungskarenz.....	84
3.2.2.	C-Fos verstärkt die Invasion in SKOV3-Zellen	85
3.2.3.	C-Fos hat einen widersprüchlichen Einfluss auf das Migrationsverhalten von SKOV3-Zellen	87
3.2.4.	C-Fos steigert die basale und zytotoxin-induzierte Apoptoserate in SKOV3-Zellen.....	90
3.2.5.	C-Fos senkt die Expression der Selektin-Liganden Sialyl-Lewis X und Sialyl-Lewis A auf der Zelloberfläche von SKOV3-Zellen.....	93
3.2.6.	Genexpressionsstudien.....	95
3.2.6.1.	PLAU/uPA ist bei verstärkter c-Fos-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene herab reguliert.....	104
3.2.6.2.	OPN ist bei verstärkter c-Fos-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene herab reguliert.....	104
4.	Diskussion	106
5.	Zusammenfassung	120
6.	Abkürzungsverzeichnis	122
7.	Literaturverzeichnis	127
8.	Danksagung	143
9.	Lebenslauf	145
10.	Eidesstattliche Erklärung	146

Einleitung

1.1. Das humane Ovarialkarzinom

1.1.1. *Epidemiologie und Risikofaktoren*

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Endometriumkarzinom das zweithäufigste Genitalkarzinom und die sechshäufigste Krebserkrankung der Frau (Robert-Koch-Institut, 2012). Bei 90 % der diagnostizierten Ovarialtumoren handelt es sich um ein Ovarialkarzinom (Schmalfeldt, 2007).

Unter den genitalen Krebserkrankungen ist das Ovarialkarzinom mit einem prozentualen Anteil von 5,6 % die häufigste Todesursache der Frau. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2008 bei 69 Jahren (Robert-Koch-Institut, 2012). Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 8.000 Frauen an einem Ovarialkarzinom, was einer Inzidenz von 18 unter 100.000 Frauen entspricht. Die Zahl der Frauen, die in Deutschland jährlich an einem Ovarialkarzinom versterben, ist mit knapp 6.000 Frauen ziemlich hoch. Dies entspricht einer Mortalität von 14 unter 100.000 Frauen (Schmalfeldt, 2007).

Zwar nimmt die Inzidenz des Eierstockkrebs seit den 1990er Jahren deutlich ab (Daten bis 2008), jedoch ist die Mortalität annähernd gleich geblieben (Robert-Koch-Institut, 2012). Engel et al. publizierten (2002), dass sich in den letzten 20 Jahren in allen vier FIGO-Stadien (FÉDÉRATION INTERNATIONALE DE GYNÉCOLOGIE ET D'OBSTÉTRIQUE) der Überlebenszeitraum der Patientinnen verlängert habe. Bei den FIGO-Stadien III und IV (siehe Kapitel 1.1.3) lässt sich dies vor allem durch verbesserte Therapien, hierbei vor allem durch die radikalere Tumorentfernung, erklären. In den FIGO-Stadien I und II scheinen genauere Staging-Möglichkeiten der Grund zu sein. Jedoch ist es bis jetzt nicht gelungen, die Heilungsrate in einem der FIGO-Stadien zu steigern. (siehe Kapitel 1.1.3).

Da das Ovarialkarzinom kaum Frühsymptome verursacht und bisher keine effektiven Screening-Maßnahmen entwickelt worden sind, werden die Ovarialkarzinome in 70 % der Fälle erst in weit fortgeschrittenen und somit prognostisch sehr ungünstigen Tumorstadien (FIGO III/IV) entdeckt (Rosen et al., 2005, Sehouli und Braicu, 2010a, Jänicke et al., 1992).

Auch wenn die Ursachen für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms noch nicht vollständig geklärt sind, so konnten doch einige Risikofaktoren identifiziert werden. Neben dem zunehmenden Lebensalter zählen eine hohe Anzahl an Ovulationszyklen, Unfruchtbarkeit (Infertilität), keine Schwangerschaften (Nulliparität), fehlende Stillzeit, medikamentöse Ovulationsauslösung, frühe erste Regelblutung (Menstruation) und spät einsetzende Menopause zu den Risikofaktoren.

Ungefähr 90 % der Ovarialkarzinome sind sporadischer Genese. Sie entstehen aus klonalen Neoplasien einer einzigen epithelialen Zelle, die zuvor mehrere genetische Veränderungen, sogenannte Mutationen, durchlaufen hat. Beispiele dafür sind die Aktivierung der PI3 Kinase, des Ras/MAP/Scr-Signalwegs oder des STAT3-Signalwegs, sowie die Expression von Angiogenesefaktoren (VEGF, bFGF, IL-8) und die Hochregulation von Muzinen (MUC1, CA-125) (Bast et al., 2007, Bast, 2003).

In ca. 5-10 % der Fälle sind Ovarialkarzinome genetisch bedingt. Bei solchen „hereditären Ovarialkarzinomen“ zeigt sich in der Familienanamnese ein gehäuftes Auftreten von Ovarial- und Mammakarzinomen, und die Wahrscheinlichkeit ein Ovarialkarzinom zu entwickeln ist um das 20-fache erhöht. Hierbei liegt in 80 % der Fälle eine Keimbahnmutation im BRCA-1-Gen vor, aber auch die Gene BRCA-2 oder TP53 können betroffen sein (Sehouli und Braicu, 2010b, Boecker et al., 2008). Patienten, die an einem sogenannten Lynch-II-Syndrom leiden, haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko, an einem Eierstock- oder auch Gebärmutterkrebs zu erkranken. Diese Patienten sind an einem hereditären nonpolypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) erkrankt und leiden an einer Mutation der Reparaturgene MSH2, MLH1, PMS1 und PMS2 (Holschneider und Berek, 2000, Watson und Lynch, 1993).

Aber auch protektive Faktoren, wie die langjährige Einnahme von Ovulationshemmern, die Anzahl an Schwangerschaften, eine Tubenligatur oder die Hysterektomie, konnten identifiziert werden (Schmalfeldt, 2007, Schmalfeldt und Pfisterer, 2007, Sehouli und Braicu, 2010a, Bast et al., 2007).

1.1.2. Anatomie des Eierstocks

Die bei der gesunden Frau paarig angelegten Eierstöcke (Ovarien) sind in der Phase der Geschlechtsreife mit durchschnittlich $4 \times 2 \times 1 \text{ cm}^3$ etwa so groß wie eine Walnuss und liegen seitlich an der lateralen Beckenwand in der sogenannten Fossa ovarica des kleinen Beckens. Über ein elastisches Band mit glatten Muskelzellen, das

fibromuskulöse Ligamentum ovarii proprium, ist das etwa 7-14 g schwere Ovar mit der medial liegenden Gebärmutter (Uterus) verbunden. Vom Hilum ovarii, dem kranialen Gefäßpol des Eierstocks, verlaufen Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven in der dorsalen Peritonealduplikatur des Lig. latum uteri und bilden gemeinsam mit ihrer Hülle das Lig. suspensorium ovarii.

Die Blutversorgung erfolgt aus direkten Abgängen der Aorta bzw. aus der A. renalis über die A. ovarica. Durch eine Anastomose mit dem Ramus ovaricus der A. uterina, findet auch durch sie eine Blutversorgung der Ovarien statt. Die Venen sammeln sich alle im Plexus ovaricus, um dann in die benachbarten Beckenvenen zu münden. Der Lymphabfluss führt über die lokalen Lymphgefäße hin zu den Nodi lymphatici lumbales. Nerval werden die Ovarien durch sympathische und parasympathische Nervenfasern aus dem Plexus mesentericus superior, dem Plexus renales und dem Plexus rectalis versorgt.

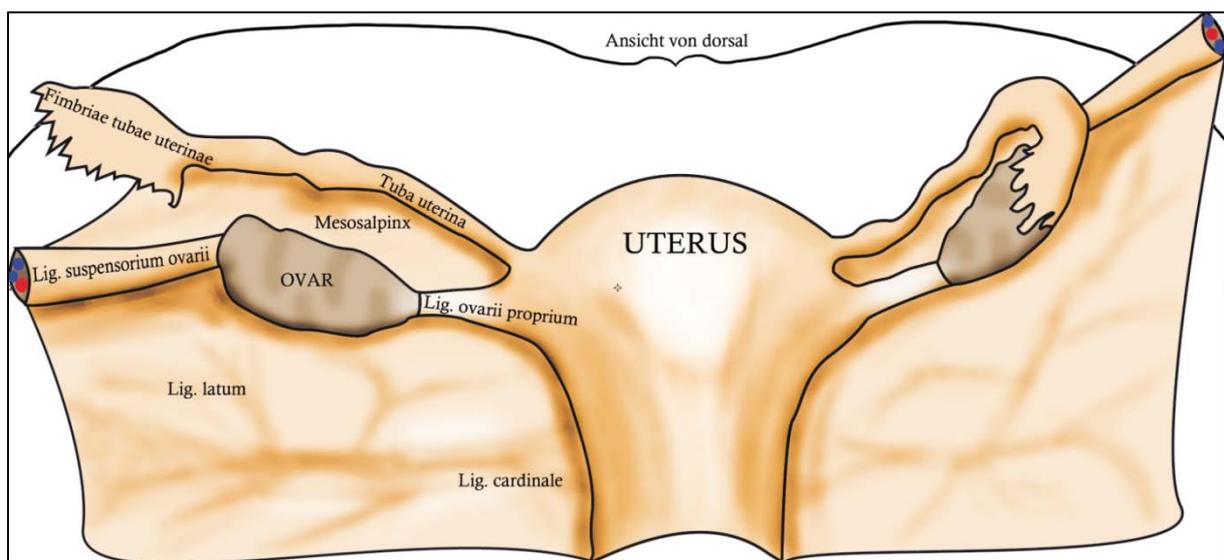


Abbildung 1: Anatomische Übersichtsskizze von Uterus und Ovarien

Histologisch besteht das Ovar aus verschiedenen Keimblättern und unterschiedlichen Zellarten. Dies erklärt auch die Vielzahl der verschiedenen im Ovar auftretenden Tumorentitäten.

Das Müller-Epithel (Oberflächenepithel, Peritonealepithel) bildet die Oberfläche des Ovars. Das Ovar gliedert sich in die zeldichte Rinde (Cortex ovarii) und das locker aufgebaute Mark (Medulla ovarii). In der Rinde befinden sich die verschiedenen Stadien der Ovarialfollikel: Primordialfollikel, Primärfollikel, Sekundärfollikel, Tertiärfollikel, Gelbkörper und atretische Follikel. Im Mark, das aus lockerem

Bindegewebe besteht, befinden sich viele Blutgefäße, Nerven und einige endokrin aktive interstitielle Zellen. Jedoch sind keine Follikel im Mark zu finden. (Pfisterer, 2007, Welsch und Deller, 2010, Boecker et al., 2008).

1.1.3. Klinische und histopathologische Klassifizierung des Ovarialkarzinoms

Ovarialtumoren gliedern sich nach der histologischen Klassifikation der WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION) in drei Hauptgruppen. Diese ergeben sich aus den drei histogenetisch unterschiedlichen Gewebekomponenten, dem Oberflächenepithel, dem Stroma mit den Keimstrangabkömmlingen und den Keimzellen:

- epitheliale Tumoren,
- Keimstrang-Stroma-Tumoren und
- Keimzelltumoren.

Jede dieser Gruppen beinhaltet sowohl benigne als auch maligne Raumforderungen. Die Ovarialtumoren sind zu 75 % benigne und zu 25 % maligne (Bühling et al., 2004). Das Ovarialkarzinom (Adenokarzinom des Ovars) gehört, neben benignen Tumoren (Zystenadenome, Zystenfibrome, Oberflächenpapillome) und Tumoren mit unsicherer Dignität (Borderline-Tumoren), in die Gruppe der epithelialen Tumoren. Sie bilden mit 50 bis 60 % die größte Gruppe der Ovarialtumoren. Das sich aus dem Müller-Oberflächenepithel ableitende Ovarialkarzinom kann nach folgenden histologischen Subtypen genauer definiert werden: serös, muzinös, endometrioid, klarzellig, urothelial (Brenner-Tumoren) und „nicht klassifizierbar“.

Unter den epithelialen Tumoren des Ovars stellen die Borderline-Tumoren (LMP-Tumoren, „low malignant potential“) eine Besonderheit dar. Die Borderline-Tumoren werden sowohl in ihrer Histomorphologie als auch in ihrem Verhalten als eine Zwischenstufe zwischen benignen und malignen Tumoren angesehen. Boecker et al. (2008) publizierten, dass sich die Borderline-Tumoren von benignen Tumoren durch eine verstärkte Epithelproliferation und zelluläre Atypien und von den Karzinomen durch das Fehlen der Stromainvasion unterscheiden. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei den Borderline-Tumoren bei 45 Jahren, also deutlich vor dem mittleren Erkrankungsalter des Ovarialkarzinoms (Schmalfeldt, 2007).

Die klinisch-histopathologische Einteilung des Tumorstadiums und der Tumorausbreitung kann sowohl nach den Richtlinien des TNM-Systems (Staging) der

UICC (UNION INTERNATIONALE CONTRE LE CANCER) als auch nach der FIGO-Klassifikation (Staging) erfolgen.

Die TNM-Klassifikation beurteilt die Ausbreitung des Primärtumors (T), den Status der regionalen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Wenn das Resektat postoperativ und histopathologisch beurteilt wurde, wird der TNM-Klassifikation ein p vorangestellt. Die Tabelle 1 stellt die Stadieneinteilung nach TNM- und FIGO-Klassifikation für Borderline-Tumoren und Ovarialkarzinome dar.

Tabelle 1: pTNM-Klassifikation und FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms nach (Boecker et al., 2008)

pTNM-Kategorien	FIGO-Stadien	Beschreibung
pTx		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0		kein Anhalt für Primärtumor
pT1	I	Tumor auf die Ovarien begrenzt
pT1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt ; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
pT1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt ; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche der beiden Ovarien; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
pT1c	IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur , Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
pT2	II	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
pT2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n) ; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
pT2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe ; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
pT2c	IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
pT3 und/oder pN1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien , mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
pT3a	IIIA	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
pT3b	IIIB	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens , größte Ausdehnung 2cm oder weniger
pT3c	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens , größte Ausdehnung mehr als 2cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
pN – regionäre Lymphknoten		
pNx		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0		keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1		regionäre Lymphknotenmetastasen
pM – Fernmetastasen		
pMx		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
pM0		keine Fernmetastasen
pM1	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

Die Bestimmung des Differenzierungsgrades des Tumors, das sogenannte Grading (UICC) ist eine rein histopathologische Einteilung. In den Differenzierungsgraden werden Tumoren mit gut differenziertem (G1), mäßig differenziertem (G2), schlecht differenziertem (G3) und nicht differenziertem bösartigen Gewebe (G4) unterschieden. Tumore, bei denen der Grad der Differenzierung nicht beurteilbar ist, werden als G9 bezeichnet.

Die Ausbreitung des Ovarialkarzinoms findet vor allem intraperitoneal, zum Beispiel entlang des Omentum majus, der Leber oder dem Zwerchfell, statt. Aber es metastasiert auch lymphogen unter anderem in die paraaortalen Lymphknoten oder hämatogen in die Lunge, die Leber, die Knochen und ins Gehirn (Bühling et al., 2004). (Schmalfeldt, 2007, Sehouli und Braicu, 2010a, Boecker et al., 2008)

1.1.4. Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom ist der häufigste Grund für den Tod einer Patientin durch einen Genitaltumor. Die Gründe für die schlechte Prognose sind vielseitig. Zunächst fehlen typische Frühsymptome. Weiterhin konnten bisher keine effektiven Biomarker oder effektive (und bezahlbare) diagnostische Möglichkeiten identifiziert werden, die eine Diagnose des Ovarialkarzinoms in einem frühen Stadium ermöglichen. Ebenso fehlen bis jetzt effektive, für die Klinik geeignete, prädiktive Marker. Darüber hinaus führt die unvollständige Kenntnis sowohl über die Tumorgenese des Ovarialkarzinoms, als auch über die Entwicklung von Resistenzen gegen die benutzte Chemotherapie häufig zu Rezidiven (Braicu et al., 2012).

Zurzeit werden zur Abschätzung der Prognose von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom vor allem klinische Daten erhoben. Zu den momentan als etabliert geltenden Prognosefaktoren gehören

- die Bestimmung der Tumorausbreitung (TNM- und FIGO-Klassifikation),
- die Größe des postoperativen Tumorrestes,
- das Alter der Patientin,
- der Allgemeinzustand der Patientin vor der Operation,
- der histologische Subtyp des Ovarialkarzinoms,
- der Differenzierungsgrad des Tumors und
- das Ansprechen auf die Chemotherapie.

Sehr aussagekräftig für die weitere Prognose einer Patientin ist die Tumorausbreitung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium FIGO I 82 % bis 92 %, im Stadium FIGO II 51 % bis 67 %, im Stadium FIGO III 17 % bis 39 % und im Stadium FIGO IV sogar nur noch durchschnittlich 12 % (Holschneider und Berek, 2000). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass makroskopische Tumorfreiheit das Gesamtüberleben der Patientinnen signifikant verbessert. Darüber hinaus ist der postoperative Tumorrest bei einem Ovarialkarzinom des fortgeschrittenen Stadiums einer der stärksten Prognosefaktoren. Dabei haben Patientinnen mit einem Tumorrest von ≤ 1 cm einen signifikanten Vorteil bezüglich des Überlebens gegenüber Patientinnen mit einem Tumorrest von > 1 cm. Allerdings bleibt der Überlebensvorteil im Vergleich mit einer vollständigen Tumorentfernung nur gering (du Bois et al., 2009a). In den Frühstadien (FIGO I und II) nimmt der Differenzierungsgrad des Tumors, neben einer starken Adhäsion und Großvolumen-Aszites, die wichtigste prognostische Rolle ein (Dembo AJ, 1990). Darüber hinaus deuten ein hohes Alter, ein schlechter präoperativer Allgemeinzustand, sowie ein positiver retroperitonealer Lymphknotenstatus auf eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit hin (du Bois et al., 2010, du Bois et al., 2009b).

Viele Studien konnten anhand der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen, dass die Krankheit in den frühen Tumorstadien sehr gut behandelbar ist (Holschneider und Berek, 2000). Bast et al. (2007) publizierten, dass im Stadium FIGO I mehr als 90 % der Patientinnen mit vollständiger operativer Tumorentfernung und sich anschließender Chemotherapie heilbar gewesen wären. Umso wichtiger ist die Entwicklung geeigneter Screeningmethoden. Leider ist dies weder für die Normalbevölkerung, noch für Hoch-Risiko-Gruppen gelungen. Weder jährliche körperliche Untersuchungen des Beckens, noch abdominelle oder transvaginale Ultraschalluntersuchungen konnten als geeignete Screeningmethoden in prospektiven Studien identifiziert werden (Bast, 2003, Holschneider und Berek, 2000). Die Suche nach einem, für ein Tumorscreening geeigneten, biologischen Tumormarker, ähnlich dem PSA-Wert zur Identifizierung eines möglicherweise an einem Prostatakarzinoms erkrankten Mannes, blieb bis jetzt ebenfalls erfolglos. Auch wenn es bis jetzt noch nicht gelungen ist, einen prognostisch relevanten und genauen Biomarker durch die Analyse von Proteinmustern aus dem Serum von Patientinnen zu finden (Cadron et al., 2009), so konnten jedoch einige tumorbiologische Marker identifiziert werden, die ab dem

Diagnosezeitpunkt zur Verlaufskontrolle genutzt werden können. Diese „Verlaufparameter“ lassen überdies einen eingeschränkten prädiktiven Aussagewert über den Krankheitsverlauf zu. Viele mögliche Kandidaten konnten ermittelt werden, wie die Tabelle 1.2 (nicht vollständig) zeigt (Bast, 2003).

Tabelle 2: Einige mögliche Serum-, Plasma- und Urinmarker für das Ovarialkarzinom, nach Bast (Bast, 2003)

Marker für das epitheliale Ovarialkarzinom aus Serum, Plasma und Urin		
Alpha-1-antitrypsin	Human milk fat globule protein	Mucinlike carcinoma antigen
Beta-chain-human chorionic gonadotropin	Human milk fat globule-2	NB/70K
CA-50	HE4	Ovarian serum antigen
CA-54-61	Interleukin-6	OVX1
CA-72-4 (TAG72)	Interleukin-8	Placental alkaline phosphatase
Cancer-associated serum antigen	Interleukin-10	Prostasin
Carcinoembryonic antigen	Interleukin-2receptor	P110 epidermal growth factor receptor
Cathepsin L	Immunosuppressive acidic protein	Sialyl TN
CA-15-3	Inhibin	Soluble Fas ligand
CA-19-9	Kallekrein-6 and 10	Tumor-associated trypsin inhibitor
CYFRA21-1	Lipid-associated sialic acid	Tetranectin
C-reaktive protein	Lysophosphatidic acid	Tissue peptide antigen
Ceruloplasmin	Macrophage colony-stimulating factor	Tumor-necrosis factor receptor
ErbB-2 (HER-2-neu)	Mesothelin	Urinary gonadotropin peptide
Galactosyltransferase	Matrix metalloproteinase 2	

Einige dieser Kandidaten (nicht alle in Tabelle 1.2 aufgeführt) werden im Folgenden näher besprochen:

Der Serummarker Cancer-Antigen 125 (CA-125), der für das Protein Muzin 16 steht, wurde von allen Kandidaten bis jetzt am intensivsten untersucht. Der prädiktive Aussagewert eines einzelnen CA-125-Wertes ist nicht sensitiv und spezifisch genug und erfüllt somit nicht die Kriterien eines zum Screening geeigneten Tumormarkers. Wird CA-125 jedoch über einen längeren Zeitraum gemessen, so kann eine Spezifität von 99,6 % erreicht werden. Allerdings bleibt die Sensitivität weiterhin für einen diagnostischen Tumormarker zu gering. Außerdem ist CA-125 nur in 80 % der Ovarialkarzinome des frühen Stadiums erhöht (Bast, 2003). Zur Verlaufskontrolle ist CA-125 durchaus geeignet. Bei der Beurteilung des Ansprechens auf die Therapie und der Krankheitsprogression wird er regelhaft eingesetzt (Mahner et al., 2010, Bast, 2003).

Ein recht neuer Tumormarker ist das Human epididymis protein 4 (HE4). HE4 wurde 1991 das erste Mal im menschlichen Nebenhoden beschrieben (Kirchhoff et al., 1991) und ist in epithelialen Ovarialkarzinomen erhöht (Schummer et al., 1999). Die Bestimmung von CA-125 und HE4 zur Tumoridentifizierung stellte sich in mehreren Studien als sehr vielversprechend heraus. Braicu und Kollegen stellten fest, dass die gleichzeitige Bestimmung von HE4 und CA-125 die einzelne Bestimmung von HE4 oder CA-125 als prädiktiver Marker übertrifft. Darüber hinaus stellten sie fest, dass der Risikoindex bestehend aus CA-125 und HE4 einen unabhängigen Prädiktor für das Operationsergebnis darstellt, was wiederum eine Auswirkung auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben haben kann (Braicu et al., 2012).

Serum-, Plasma-VEGF (Vasular endothelial growth factor) und TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1) sind an der Degregation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix, sowie an der Neovaskularisation beteiligt, die alle eine wichtige Rolle im Wachstum eines Ovarialkarzinoms spielen. Mahner et al. (2010) stellten fest, dass hohe VEGF- und TIMP-1-Werte im Serum nach der Chemotherapie mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert waren. Sie schlossen daraus, dass die Serumspiegel von TIMP-1 und VEGF sich während der fist-line-Therapie von Ovarialkarzinom-Patientinnen verändern und zur Prognose herangezogen werden können.

Dem p53 Tumorsuppressor-Protein, einem Protein, das Tumorzellwachstum unterdrücken und Genomstabilität gewährleisten kann, konnte ebenfalls eine prädiktive Aussagekraft nachgewiesen werden. Röhlke und Milde-Langosch (1997) konnten in einer Untersuchung an 104 Ovarialkarzinomen zum einen nachweisen, dass p53-Mutation vor der Metastasierung auftritt und klonal bestehen bleibt. Zum anderen stellten sie fest, dass eine moderate bis hohe p53-Überexpression in der Gruppe der T3/M1-Tumoren mit einem signifikant kürzeren rezidivfreien Intervall und einem kürzerem Überleben der Patientinnen assoziiert war.

Eine Relevanz als tumorbiologischen prädiktiven Marker konnte ebenfalls für die Bestimmung des Plasminogenaktivators vom Urokinase-Typ (uPA) einschließlich seinem spezifischer Inhibitor PAI-1 und der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) nachgewiesen werden (Kuhn et al., 1999, Lengyel et al., 2001). Momentan wird die

Rolle verschiedener Kallikreine als Tumor- und Prognosemarker beim Ovarialkarzinom untersucht (Dorn et al., 2006).

Trotz der vielen Erkenntnisse im Bereich der tumorbiologischen Parameter ist eine routinemäßige Bestimmung dieser laut Mayr et al. (2010) derzeit nicht von klinischem Nutzen. Denn all diese Faktoren lassen momentan noch keine Individualisierung der bisherigen Standardtherapie, angepasst an das persönliche Risiko der Patientin, bei einem Ovarialkarzinom zu. Somit werden sie momentan nur im Rahmen von klinischen Studien bestimmt.

1.2. Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie

„Voraussetzung für das Leben eines mehrzelligen komplexen Organismus ist die dauerhafte und zugleich flexible Kommunikation der Zellen miteinander.“ (Wagener und Müller, 2010f, Wagener und Müller, 2010e).

Die Koordination der dafür nötigen biologischen Vorgänge, wie beispielsweise Differenzierung, Proliferation oder Apoptose, findet durch die Regulation spezifischer Gene in den einzelnen Zellen statt. Wann und wie stark die Expression der jeweiligen Gene ist, wird durch zellexterne Signale (externe Stimuli), wie unter anderem durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, chemische Agenzien und auch durch Tumorpromotoren, bestimmt. Diese externen Stimuli interagieren entweder direkt mit der DNA oder binden an zellmembranständige oder zytoplasmatische Rezeptoren. Durch diese Rezeptoren wird eine Signalkaskade, die vor allem aus Proteinkinasen und Phosphatasen besteht, in Gang gesetzt, an deren Ende die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors steht. Dieser Transkriptionsfaktor interagiert mit der DNA, indem er an DNA-Motive in 5'-Richtung des Promotors oder an weiter entfernte sogenannte Enhancer- bzw. Silencer-Elemente bindet und somit die Aktivität des basalen RNA-Polymerase-II-Transkriptionskomplexes beeinflusst (Wagener und Müller, 2010f).

Ein solcher Transkriptionsfaktor ist das „*activating-protein-1*“ (AP-1) (Angel et al., 1987). Der AP-1-Komplex entspricht einem Homo- oder Heterodimer, das aus Proteinen der Jun-, der Fos- und der ATF-Familie zusammengesetzt sein kann. Die Proteine der Jun-Familie (c-Jun, JunB, JunD) können untereinander Homodimere und mit den Proteinen der Fos-Familie (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) oder auch mit den Proteinen der ATF-Familie (ATF-2, ATF-3/LRF-1, BH-ATF) Heterodimere bilden. Die ATF-Familie kann sowohl Homo- als auch selektiv Heterodimere bilden. Nur den

Proteinen der Fos-Familie ist es aufgrund von elektrostatischen Eigenschaften der Leucin-Zipper-Region nicht möglich, Homodimere zu bilden. Ihnen ist nur die Bildung von Heterodimeren mit Proteinen der Jun-Familie möglich (Angel und Karin, 1991, Karin et al., 1997).

Die AP-1 Proteine gehören in die bZIP-Proteinfamilie (Landschulz et al., 1988). Alle Mitglieder der AP-1 Proteine besitzen eine sogenannte *bZIP-Region*. Diese setzt sich aus zwei funktionellen Untereinheiten zusammen. Die eine ist eine basische Region, die aus 12-14 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Sie ermöglicht den AP-1 Proteinen eine Bindung an spezifische Bindungssequenzen innerhalb der Promotor- bzw. Enhancer-Bereiche der jeweiligen Zielgene, den sogenannten *TPA-responsive elements (TRE)*. Die andere Untereinheit ist eine der basischen Region benachbarte Leucin-Zipper-Region. Diese ermöglicht die Dimerisierung der AP-1 Komponenten miteinander. Sie besteht aus einer α -Helix, in der jede siebte Aminosäure ein Leucin ist. Die Leucin-Seitenketten ragen an einer Seite aus der α -Helix hinaus und bilden so eine hydrophobe Fläche, die die Dimerisierung der AP-1 Komponenten miteinander ermöglicht. (Vogt und Bos, 1990)

Weiterhin besitzen die AP-1 Proteine eine sogenannte transaktivierende Domäne (TAD), die N-terminal der bZIP-Region liegt. Die Proteine c-Fos und FosB tragen diese Domäne zusätzlich auch noch C-terminal der bZIP-Region (siehe Abbildung 3). Diese funktionelle Domäne ist für den direkten und indirekten Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie zuständig und beeinflusst die Transkriptionsrate des jeweiligen Zielgens (Angel und Karin, 1991, Leppä et al., 1998).

Zusätzlich wurden noch weitere bZIP- Proteine identifiziert, die mit Jun- oder Fos-Proteinen Dimere bilden können, und ähnliche DNA-Bindungsspezifitäten haben: Zum einen die Maf-Proteine – vMaf und c-Maf - und zum anderen die beiden Proteine JDP1 und JDP2, die Dimere mit den Jun-Proteinen bilden können (Karin et al., 1997).

Die AP-1 Komplexe binden an spezifische Sequenzen der DNA, die sogenannten *TPA-responsive elements (TREs)*. Diese TREs liegen innerhalb palindromischer Abschnitte in Promotor- oder Enhancerbereichen und bestehen aus acht Basenpaaren: 5'-TGAG/CTCA-3'. Eine weitere Sequenz, an die die Dimere mit einer etwas abgeschwächten Affinität binden, sind die *cAMP-responsive-elements (CREs)* (Angel und Karin, 1991).

Die Fähigkeit von AP-1, verschiedene zelluläre Prozesse zu beeinflussen, benötigt die Aktivierung von unterschiedlichen Zielgenen unter unterschiedlichen Bedingungen. Es ist möglich, dass die Veränderung der AP-1-Zusammensetzung essentiell für die zelluläre Antwort auf unterschiedliche Stimuli ist (Mahner et al., 2008). Durch die vielen verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten an AP-1 Proteinen entsteht eine große Vielfalt an AP-1 Komplexen. Je nach Dimerisierungspartner ergeben sich durch externe Stimuli unterschiedlichste Veränderungen in der Transkriptionsrate der jeweiligen Zielgene, trotz der Beteiligung ähnlicher regulatorischer Elemente (Hai und Curran, 1991). Durch unterschiedliche externe, aber auch interne Stimuli werden die entsprechenden AP-1-Proteine aktiviert bzw. vermehrt gebildet und führen damit zu einer veränderten Regulation bestimmter Zielgene (siehe Abbildung 2).

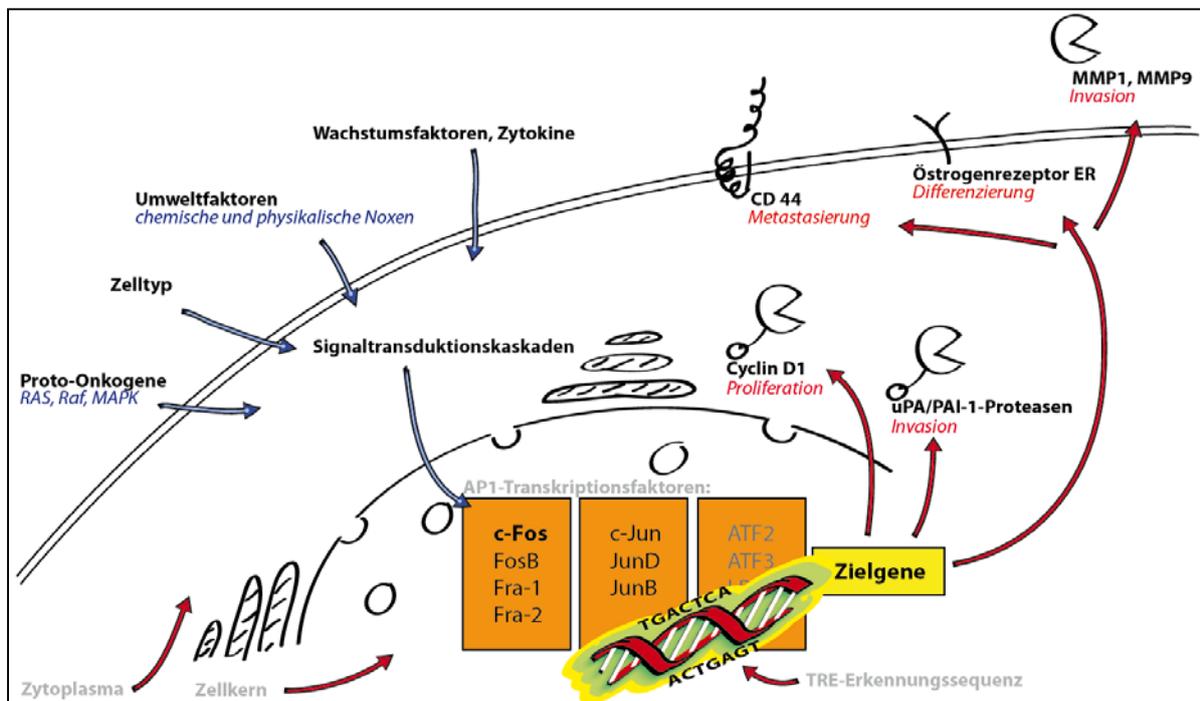


Abbildung 2: Einfluss von ex- und internen Stimuli über Jun- und Fos-Transkriptionsfaktoren auf Vorgänge der Tumorentstehung durch Regulation spezifischer Zielgene, nach Schröder (Schröder, 2009).

Mittlerweile sind viele der durch AP-1 regulierten Gene bekannt (Übersichtsartikel: (Shaulian und Karin, 2001)). Die Tabelle 3 zeigt einige durch AP-1 regulierte Gene.

Tabelle 3: Durch AP-1 regulierte Gene, nach Schröder (Schröder, 2009)

Proteinklasse	Genprodukt / Protein	Beschrieben von:
Wachstumsfaktoren	NGF	Hengerer et al. (1990)
Proteinasen	MMP-9	Gum et al. (1996), Crowe und Brown (1999), Angel et al. (1987)
	Collagenasen	(Angel et al., 1987)
	Stromelysin	Kerr et al. (1988)
	Urokinasen (uPA und PAI-1)	Nerlov et al. (1991)
Zellzyklusregulatoren	Cyclin D1	Albanese et al. (1999), Sabbah et al. (1999), Bakiri et al. (2000)
	p16	Passegué und Wagner (2000)
	p53	Schreiber et al. (1999)
Apoptose	FasL	(Kasibhatla et al., 1998, Kolbus et al., 2000, Le-Niculescu et al., 1999)
Zelltypische Genprodukte	Involucrin	Ng et al. (2000)
	Keratin 18	Oshima et al. (1990), Pankov et al. (1994)

1.2.1. c-Fos

Der Transkriptionsfaktor c-Fos gehört neben Fra-1, Fra-2 und FosB zur Gruppe der FOS-Proteine, die wiederum der AP-1-Familie angehören. Nachdem Curran und Teich (1982) ein phosphoryliertes Protein, mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, in durch FBJ-MSV transformierten Zellen entdeckt hatten, ermittelten van Straaten et al. im Jahr 1983 (van Straaten et al., 1983) die vollständige Nukleotidsequenz des menschlichen c-fos Gens. Dieses ist das humane zelluläre Homolog des v-fos Gens (Maus) und codiert für ein Protein mit 380 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa. V-fos ist das Onkogen des Finkel-Biskins-Jinkins Mäuse-Osteosarkom Virus, das aus einer CF-1 Maus, nach Infektion mit dem FBJ-MS-Virus, isoliert worden ist (Finkel et al., 1966).

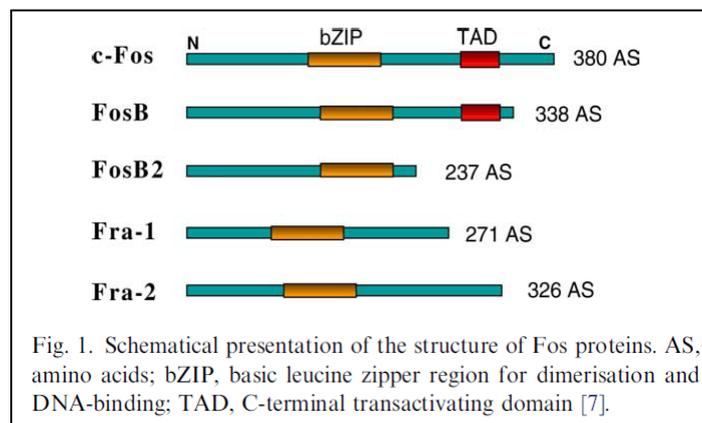


Abbildung 3 Schematische Darstellung von c-Fos, entnommen aus Milde-Langosch (Milde-Langosch, 2005)

Der Transkriptionsfaktor c-Fos ist als Bestandteil von AP-1 an der Signaltransduktion, der Differenzierung und der Proliferation von Zellen beteiligt (Shaulian und Karin, 2001). Zunächst konzentrierten sich viele Studien auf die onkogenen Funktionen von c-Fos. Hierbei wurden von c-Fos regulierte Gene entdeckt, wie beispielsweise *dnmt1* (DNA (cytosine-5)-Methyltransferase 1), die wichtig für die Tumorgenese sind (Bakin und Curran, 1999) oder die, wie zum Beispiel OPN (Osteopontin), auch zu einem invasiven Wachstum von Krebszellen führen (Hu et al., 1994, Milde-Langosch, 2005). C-Fos kann ebenfalls zu einem Verlust der Zellpolarität führen und eine epithelial-mesenchymale Transition verursachen, was, wie von Fialka und Kollegen Fialka et al. (1996) beschrieben, ein invasives und metastasierendes Wachstum in Mammakarzinom-Zellen hervorruft.

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen untersuchten einige Studien die Funktion der c-Fos-Expression in humanem Tumorgewebe (Milde-Langosch, 2005): In Osteosarkomen und Endometriumkarzinomen war eine Überexpression von c-Fos mit hochgradigen Läsionen und einem ungünstigerem Krankheitsverlauf verbunden (Gamberi et al., 1998, Bamberger et al., 2001). Auch in einer Vergleichsanalyse zwischen präkanzerösen Läsionen der Zervix uteri und dem invasiven Zervixkarzinom zeigte sich eine signifikant geringere c-Fos-Expression in den präkanzerösen Läsionen (Prusty und Das, 2005).

Anfangs hielt man c-Fos zunächst nur für einen die Tumorentstehung und Tumorentwicklung unterstützenden Transkriptionsfaktor. Jüngere Studien deuten darauf hin, dass c-Fos auch eine tumorsuppressive Aktivität und vielleicht sogar eine Funktion bei der Apoptose hat (Teng, 2000). Mikula et al. (2003) stellten fest, dass eine Überexpression von c-Fos die Progression des Zellzyklus inhibiert, in murinen Hepatozyten den Zelltod stimuliert und *in vivo* die Tumorbildung stark unterdrückt. Durch die Regulation von c-Fos während der Entwicklung von Mäusen, konnte diesem Transkriptionsfaktor eine funktionelle Rolle in der Apoptose nachgewiesen werden (Jochum et al., 2001). Kustikova et al. (1998) beobachteten eine stärker reduzierte c-Fos-Expression in metastasierten Mammakarzinom-Zellen im Vergleich mit nicht-metastasierenden Zellen. Auch in Zellen von humanen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen und von Schilddrüsen-Karzinomen zeigte sich im Vergleich mit Zellen aus Normalgewebe eine reduzierte c-Fos-Expression (Levin et al., 1995, Liu et al., 1999). In einer immunhistochemischen Studie mit insgesamt 600 Magenkarzinom-

Patienten zeigte sich ebenfalls, dass eine reduzierte c-Fos-Expression mit einem negativeren Ausgang der Erkrankung assoziiert war (Jin et al., 2007).

Mahner et al. (2008) stellten in einer retrospektiven Studie mit insgesamt 101 Ovarialkarzinom-Patientinnen fest, dass ein Verlust der c-Fos-Expression signifikant häufiger in hochgradigen Karzinomen (G3) vorlag. Zusätzlich war eine reduzierte c-Fos-Expression mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben ($p=0,003$) und Gesamtüberleben ($p=0,003$) assoziiert (siehe Abbildung 4).

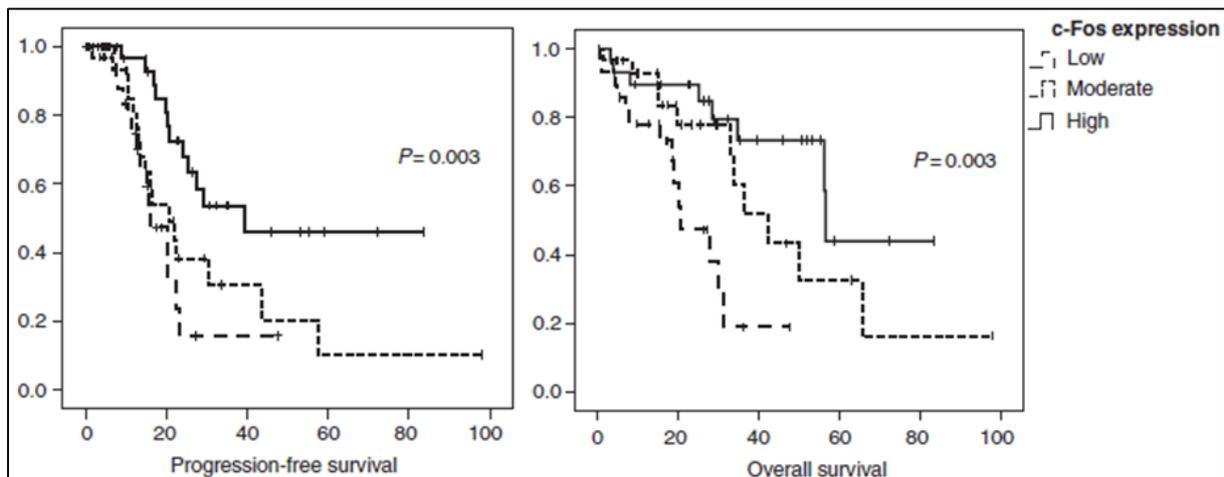


Abbildung 4: Reduzierte c-Fos-Expression ist mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert Mahner et al. (Mahner et al., 2008)

Darüber hinaus ermittelten Mahner et al. mit einer multivariaten Analyse (Cox Regression) eine reduzierte c-Fos-Expression und ein Resttumorgröße $\geq 1\text{cm}$ als unabhängige Faktoren für ein kürzeres progressionsfreies Überleben und ein kürzeres Gesamtüberleben.

Auch Meinhold-Heerlein et al. (2005) hatten die c-Fos-Expression in Ovarialkarzinomen von unterschiedlichen Graden und sogenannte Borderline-Tumoren durch einen molekularen Vergleich untersucht. Sie stellten eine Assoziation zwischen einer hohen c-Fos-Expression und „low-grade“ Tumoren fest. Passend hierzu stellte man in Gen-Expressions-Analysen von Ovarialgewebe eine hohe c-Fos Expression in Normalgewebe und eine niedrige c-Fos-Expression in Tumorgewebe fest (Welsh et al., 2001).

Eine mögliche pro-apoptotische Funktion von c-Fos könnte eine wichtige Rolle in der Tumorsuppression spielen. Eine c-Fos-Induktion in murinen Hepatozyten resultierte in einer Apoptose (Mikula et al., 2003). Fos^{-/-}tp53^{-/-} double-knockout Mäuse entwickelten hochinvasive und proliferative wachsende Rhabdomyosarkome, die selten in tp53^{-/-}

knockout Mäusen beobachtet werden. Durch eine Reexpression von c-Fos in den Zellen dieser Mäuse erhöhte sich die Apoptoserate der Tumorzellen (Fleischmann et al., 2003). Auch wenn der genaue Mechanismus, über den c-Fos an der Apoptose mitwirkt, bis jetzt sehr wenig verstanden ist, so äußerten Mahner et al. (2008) die Vermutung, dass Tumoren mit viel c-Fos, aufgrund seiner proapoptotischen Funktion, eine höhere Chemosensitivität haben könnten. Somit könnten Ovarialkarzinome, wenn c-Fos aktiviert ist, für chemotherapeutische Behandlungen verstärkt empfänglich sein: Patienten mit einem fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom zeigten eine höhere Ansprechrate auf Zytostatikabehandlung und ein verbessertes Überleben, wenn die Expression von c-Fos hoch war (Singh et al., 1998).

C-Fos scheint auf die Tumorgenese, abhängig vom Zelltyp, einen fördernden oder auch unterdrückenden Einfluss zu haben. Dies ließe sich, wie Mahner und Kollegen (2008) vorschlugen, vielleicht zum einen durch eine unterschiedliche Mischung der Proteine in den Tumorzellen und zum anderen durch die unterschiedlichen Tumorumfelder erklären. Zum Beispiel könnten jeweils andere Dimerisierungspartner oder auch andere Co-Aktivatoren vorliegen.

1.3. Kennzeichen der Tumorprogression

Zellen bösartiger Tumore, wie dem Ovarialkarzinom, besitzen bestimmte charakteristische Eigenschaften wie u.a. ein erhöhtes Zellwachstum, die Fähigkeit invasiv und metastasierend zu wachsen und den teilweisen oder sogar völligen Verlust der Zelldifferenzierung. Hanahan und Weinberg definierten in ihrer Arbeit „THE HALLMARKS OF CANCER“ für ein großes Kollektiv von Karzinomen sechs immer wieder auftretende Veränderungen in der Zellphysiologie von Tumorzellen:

„... the vast catalog of cancer cell genotypes is a manifestation of six essential alterations in cell physiology that collectively dictate malignant growth.“ (Hanahan und Weinberg, 2000)

Somit zeigen transformierte Zellen die folgenden sechs pathophysiologischen Mechanismen:

- Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- Vermeidung von programmiertem Zelltod (Apoptose)

- grenzenloses Teilungspotential
- Fähigkeit zur Neoangiogenese
- Fähigkeit zur Gewebeinvasion und –metastasierung

Jeder dieser Mechanismen ist für transformierte Zellen eine Möglichkeit, die in jeder Körperzelle verankerten Abwehrmechanismen gegen den Eintritt in die maligne Progression zu durchbrechen, um dann in den Prozess der malignen Tumorprogression einzutreten (Hanahan und Weinberg, 2000). In ihrem nachfolgenden Paper erweiterten Hanahan und Weinberg (2011) die Möglichkeiten der Zelltransformation um die folgenden beiden Mechanismen: Zum einen die Anpassung des Energiestoffwechsels der Tumorzelle und zum anderen die Vermeidung durch das Immunsystem zerstört zu werden.

Im Folgenden werden diejenigen Mechanismen näher betrachtet, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.3.1. Zellproliferation

Die Anzahl der Zellen in einem Gewebe wird normalerweise hauptsächlich von zwei Prozessen, der Zellproliferation und der Apoptose, reguliert. Beide Mechanismen werden durch stimulierende und hemmende Faktoren kontrolliert. Diese Faktoren können sowohl in gelöster Form, z.B. als Wachstumsfaktoren oder Zytokine, als auch als Faktoren, die auf der Oberfläche von Nachbarzellen präsentiert werden, wirken.

Damit Zellen proliferieren können, müssen sie sich teilen. Jede Zelle eines Organismus befindet sich in einer bestimmten Phase des Zellzyklus. Der Zellzyklus ist ein sehr genau geregelter und kontrollierter Mechanismus von Zellen zwischen den einzelnen Zellteilungen. Seine Funktion ist die korrekte Verdoppelung der genetischen Information einer Zelle mit der anschließenden Verteilung auf zwei identische Tochterzellen. Er wird durch ein fein abgestimmtes Kontrollsystem reguliert, das sicherstellt, dass die einzelnen Vorgänge zum richtigen Zeitpunkt und in der richtigen Reihenfolge stattfinden. Hierfür gibt es verschiedene Kontrollpunkte, die sogenannten Restriktionspunkte, innerhalb des Zellzyklus. Über diese Kontrollpunkte können die zuvor schon erwähnten stimulierenden bzw. inhibierenden Faktoren auf die jeweiligen Zellen wirken. Diese Restriktionspunkte liegen in der späten G1-Phase, am Ende der G2-Phase und in der M-Phase.

Der Zellzyklus wird in vier Phasen eingeteilt, die G1-, die S- und die G2-Phase, die als Interphase zusammengefasst werden, und die M-Phase, die der Mitose entspricht (siehe Abbildung 5) (Wagener und Müller, 2010g). In der G1-Phase wächst die Zelle und produziert die Proteine, die für die in der S-Phase stattfindende DNA-Verdopplung nötig sind. In der sich anschließenden S-Phase wird das gesamte Genom der Zelle verdoppelt und das Zentriol, der Ausgangspunkt der Mitosespindel, teilt sich. Nun folgt die G2-Phase, in der die Mitose, u.a. durch die Synthese hierfür spezifischer Proteine, vorbereitet wird und die neu synthetisierten DNA-Stränge auf Fehlpaarungen kontrolliert und gegebenenfalls repariert werden. Schlussendlich geht die Zelle in die M-Phase über, die aus Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase besteht und an deren Ende zwei identische Tochterzellen entstehen. Einige Zellen treten im Anschluss an die M-Phase in die sogenannte G0-Phase, einem sogenannten Ruhezustand ein. Auslöser hierfür können z. B. das Erreichen eines bestimmten Differenzierungsgrades, eine niedrige Konzentration an Wachstumsfaktoren oder eine hohe Zelldichte sein. Während dieser Phase findet kein Zellwachstum statt, die Zellen haben aber einen aktiven Stoffwechsel. Zellen können dauerhaft in der G0-Phase verbleiben, z.B. wenn sie sich weiter differenzieren. Sie können aber auch mithilfe bestimmter Wachstumssignale wieder in die G1-Phase eintreten.

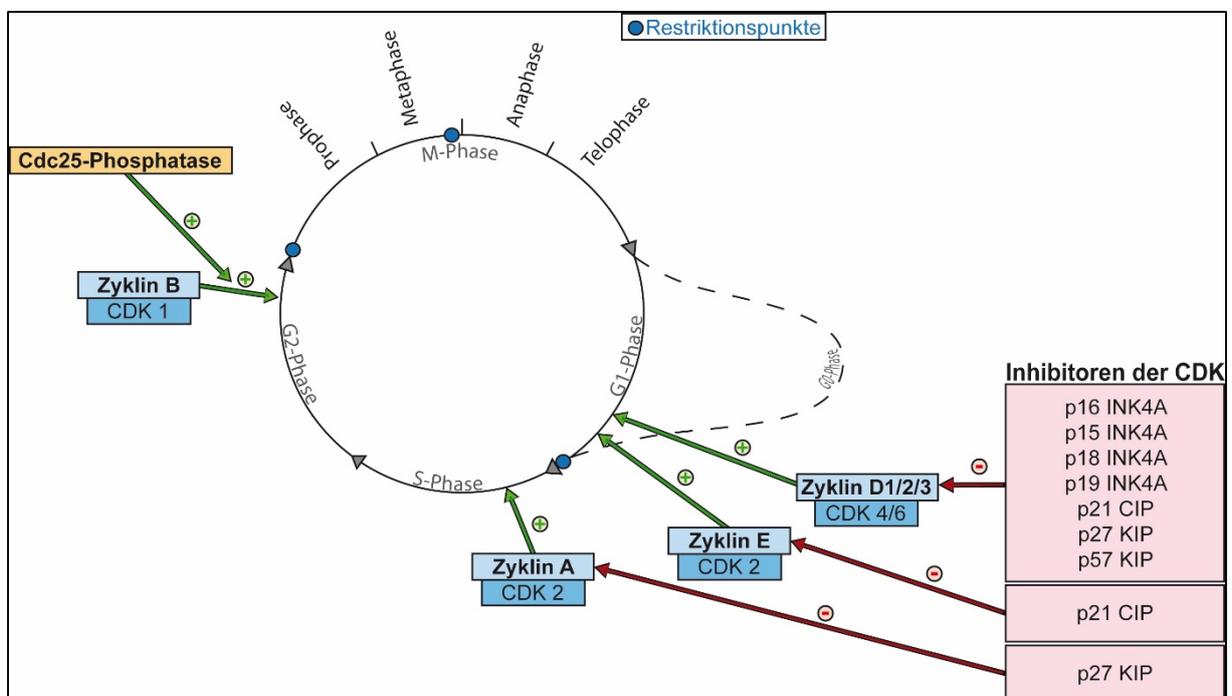


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zellzyklus und seiner Regulatoren nach Netzker und Wagener et al. (Netzker, 2006a, Wagener und Müller, 2010a)

Die Regulation des Zellzyklus und somit die Kontrolle über die Zellteilung findet durch die Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) statt. Deren Aktivität wiederum wird durch die Bindung von Zyklinen, durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung und durch CDK-Inhibitorproteine (CKI) reguliert. Die CDKs sind nur im Beisein von Zyklinen aktiv und bilden mit ihnen sogenannte heterodimere Komplexe. Die Zykline selber sind Proteine, die phasenspezifisch gebildet werden und somit durch ihre wechselnden Konzentrationen die Zellzyklusphasen steuern. Die CDK-Zyklin-Dimere-Aktivität kann u.a. von Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Genauso kann die Aktivität dieser Dimere durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen gesteuert werden. Dabei kann ein CDK-Zyklin-Dimer abhängig vom Phosphorylierungsort stimuliert oder auch inhibiert werden. Die dritte Möglichkeit der Zellzyklusregulation bieten die CKIs. Die CKIs stehen am Ende von Signalkaskaden, die von antiproliferativen bzw. mitogenen Signalen aktiviert wurden, und hemmen bestimmte CDKs, können diese aber auch auf noch unbekannte Art manchmal aktivieren. Einige dieser CKIs gelten als Tumorsuppressorgene, durch deren Fehlfunktion es zu einer Entartung der Zelle, einem unkontrollierten Zellwachstum und somit zu einer Tumorbildung kommen kann.

Normale Zellen benötigen mitogene Wachstumsfaktoren, um zu proliferieren. Diese sezernierten externen Stimuli binden an Transmembranfaktoren an der Zelloberfläche und induzieren darüber die Zellproliferation. Transformierte Zellen besitzen die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren in einer hohen Anzahl selbstständig und unabhängig zu produzieren. Diese „erworbene Wachstumsfaktoren-Autonomie“ von Tumorzellen ermöglicht ihre hochgradige Proliferation. Über einen weiteren Mechanismus, die Dysregulation in der Expression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren, können diese Zellen trotz einer normalen Konzentration von Wachstumsfaktoren sehr stark proliferieren, indem sich viel mehr Rezeptoren auf der Zelloberfläche befinden (Fedi et al., 1997).

Der Transkriptionsfaktor c-Fos könnte über die den Zellzyklus regulierenden Faktoren einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Ovarialkarzinomzellen haben. Um dies näher zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. (Netzker, 2006a, Milde-Langosch und Riethdorf, 2003, Lundberg und Weinberg, 1999)

1.3.2. Zellinvasion

Ein weiterer Schritt in der Tumorprogression ist die Invasion. Als Invasion bezeichnet man das Durchbrechen der Basalmembran des jeweiligen Gewebes und die Degradierung der extrazellulären Matrix. Die Invasion und auch die Migration sind Möglichkeiten, der durch die hohe Proliferationsrate drohenden Unterversorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu entgehen. Eine erfolgreiche Invasion ist die Voraussetzung für die Metastasierung von Zellen in andere Gewebe.

Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht aus zwei Komponenten. Die eine Komponente besteht aus der 50-100 nm breiten Basalmembran, die für die Zellen vielfältige Funktionen erfüllt: Einerseits bietet die Basalmembran als Leitstruktur eine Anhaftungsfläche für Epithelzellen und ist Leitschiene für die Migration der Zellen. Andererseits ist sie aufgrund ihrer selektiven Permeabilität eine Art Filtrationsschranke. Sie besteht vor allem aus Kollagen Typ IV, Laminin (Glykoprotein), Perlecan (Heperansulfat-Proteoglykan) und Entactin. Die andere Komponente der ECM besteht aus interstitiellem Bindegewebe, das sich hauptsächlich aus Kollagenfasern (vor allem Typ I und III), Glykoproteinen, wie Fibronectin, und Proteoglykanen (Versican, Decorin, Biglykan, Hyaluronsäure) zusammensetzt. Im interstitiellen Bindegewebe sind unter anderem Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen eingebettet (Wagener und Müller, 2010b).

Damit Tumorzellen invadieren können, müssen sie sich mit Adhäsionsmolekülen, wie den Integrinen, den Cadherinen, den Ig-CAMs (immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules) und den Selektinen an die Basalmembran oder andere ECM-Bestandteile anheften und diese durchwandern (Aplin et al., 1998, Lauwaet et al., 2000, Cairns et al., 2003). Die ECM wird unter anderem mit Hilfe von Proteasen, wie den Matrixmetalloproteinasen (MMPs), den Cysteinproteinasen (Cathepsin B, H, L), Serinproteinasen (Kallikreine, Dipeptidyl Peptidase 4) und den Faktoren des Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA) degradiert und anschließend durchwandert (Coussens und Werb, 1996, Chambers und Matrisian, 1997, López-Otín und Matrisian, 2007, Duffy, 1996). Hierbei müssen die Tumorzellen diese Faktoren nicht zwingend selbst produzieren. Sie benutzen auch die Faktoren, die von in dieses Gewebe eingewanderten Stromazellen und inflammatorischen Zellen sezerniert werden (Werb, 1997, Lauwaet et al., 2000). Diese Prozesse, die Aktivierung von Zell-Zell- und von

Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen und die Nutzung von extrazellulären Proteasen, spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Invasion und Metastasierung:

„The activation of extracellular proteases and the altered binding specificities of cadherins, CAMs, and integrins are clearly central to the acquisition of invasiveness and metastatic ability.“ (Hanahan und Weinberg, 2000)

Dem Transkriptionsfaktor AP-1, der sich unter anderem auch aus c-Fos zusammensetzen kann, konnte eine die Invasion verstärkende Rolle nachgewiesen werden. Dieser Transkriptionsfaktor induziert zum einen Gene, die einen die Invasion unterstützenden Effekt haben, und unterdrückt zum anderen Gene, die einen die Invasion supprimierenden Effekt haben. Welche Rolle AP-1 ausübt, ist von Typ der Zelllinie bzw. des Tumors abhängig. Ozanne und Kollegen beschrieben dies z.B. für Plattenepithelkarzinome, Kolonkarzinome, Mammakarzinome und Fibrosarkome (Ozanne et al., 2007). Daher ist es interessant zu untersuchen, ob c-Fos seine progressionsprotektive Funktion in Ovarialkarzinomen eventuell über eine Verminderung der Invasion ausübt. Dafür sollte der mögliche Einfluss von c-Fos auf die Invasion mit Hilfe eines Invasions-Assays näher untersucht werden.

1.3.3. Zellmigration

Migration ist ein vielfältig vorkommender physiologischer Prozess. Zu diesem Prozess gehören z.B. die Organogenese im Rahmen der Embryogenese, die Umbildung der weiblichen Brust zur Milchproduktion, der Heilungsprozess von Wunden oder die Wanderung von Immunzellen im menschlichen Körper.

Damit Tumorzellen invadieren und metastasieren können, müssen sie ebenfalls die Fähigkeit der Migration besitzen. Es können drei Formen der Zellbewegung unterschieden werden. Als erstes die mesenchymale Migration, als zweites das amöboide Gleiten und als drittes die kollektive Bewegung eines epithelialen Zellverbandes (Wagner und Müller, 2010c). Durch Bindegewebe beispielsweise bewegen sich Karzinomzellen häufig im Kollektiv, aber sie nutzen auch andere Formen der Fortbewegung. Darüber hinaus können Tumorzellen auch zwischen den einzelnen Migrationsarten wechseln. Wird beispielsweise der Kontakt zu Bindegewebsbestandteilen blockiert, so kann eine Tumorzelle von der mesenchymalen Migration in die amöboide Fortbewegung wechseln, für die sie diesen Kontakt nicht benötigt (Wagner und Müller, 2010c).

Die Migration einzelner Zellen ermöglicht es diesen Zellen, sich in Geweben oder in sekundären Wucherungen zu positionieren. Dies geschieht unter anderem während der Morphogenese oder während der Tumorentstehung bzw. Metastasenbildung. Die Zellen des Immunsystems wiederum besitzen die Fähigkeit, ein Gewebe zeitweise zu durchwandern (Friedl und Gilmour, 2009).

Eine weitere Möglichkeit der Zellbewegung ist die kollektive Migration, die sehr vielfältig ist. Unabhängig von der Vielfalt der kollektiven Migrationsmodi liegen all diesen ähnliche zelluläre und molekulare Mechanismen zugrunde: Sie benötigen alle Zell-Zell-Zusammenhalt, eine gemeinsame Zellpolarisierung, eine gemeinsame Koordination der Zytoskelett-Aktivität, die Führung durch chemische und physikalische Signale, sowie eine gemeinsame Lageveränderung gegenüber dem Substrat. Die notwendige Zell-Zelladhäsion wird durch Adhäsionsproteine, wie unter anderem den Cadherinen, den Ig-CAMs oder den Integrinen vermittelt (siehe auch Kapitel 1.3.2). Beispielsweise sind die auf Cadherinen basierenden Verbindungen sowohl während der physiologischen Morphogenese, wie z.B. bei der Ausbildung von Milchgängen in der weiblichen Brust, als auch in unterschiedlichen invasiven Krebsarten von

besonderer Bedeutung. Ein Verlust von E-Cadherin beispielsweise führt sowohl in der Morphogenese, als auch in Krebsmodellen zu einer Schwächung der Zellverbindungen gefolgt von Zellablösung und dem Wechsel in die Einzel-Zell-Migration (Friedl und Gilmour, 2009). Dieser Effekt ist, wie Friedl und Gilmour publizierten, ein Hinweis dafür, dass E-Cadherin ein dominanter Vermittler der kollektiven Zellinteraktionen ist, dessen Verlust eventuell durch andere Zell-Zell-Adhäsionswege kompensiert werden kann.

Ein hemmender Einfluss von c-Fos auf die Migration von Ovarialkarzinom-Zellen wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die schwächere Expression von c-Fos in den Metastasen im Vergleich mit dem Primärtumor. Um dies zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Migrations-Versuche durchgeführt, deren Schwerpunkt in jeweils anderen Migrationsmodi liegt: Zum einen der Migrations-Assay, der die mesenchymale Zellmigration untersucht, zum anderen der Wundheilungs-Assay, der die kollektive Zellmigration untersucht.

1.3.4. Selektin-Liganden

Sowohl in der Migration und der Invasion, als auch in der Extravasation spielen Adhäsionsmoleküle, die sich u.a. auf der Zelloberfläche befinden, eine entscheidende Rolle. Bisher lässt sich der Großteil der Adhäsionsmoleküle in folgende vier Proteinuntergruppen einteilen (Bogenrieder und Herlyn, 2003):

- Cadherine
- Selektine
- Integrine
- Immunglobulin-Superfamilie

Bei vielen dieser Adhäsionsmoleküle konnte eine entscheidende Rolle während der Tumorprogression nachgewiesen werden (Cavallaro und Christofori, 2001). Sie dienen z.B. als interzelluläre Kontaktstellen zur Kommunikation der Zellen im Rahmen der Proliferation oder Migration. Ebenso bilden die Adhäsionsmoleküle Anheftungsmöglichkeiten für die Zelle an die ECM, an Mesothel oder Endothel.

Die Familie der Selektine beispielsweise umfasst drei Mitglieder: Das L-Selektin, das als Erstes auf Leukozyten entdeckt wurde, das P-Selektin, das auf Blutplättchen identifiziert wurde und das E-Selektin, das auf Endothelzellen gefunden wurde (Aplin

et al., 1998, Barthel et al., 2007). Selektine spielen als Adhäsionsmoleküle eine Rolle bei der Lenkung von Leukozyten im Gewebe, um Infektionen zu beheben und Wunden zu heilen. Die Selektin-Bildung konnte als einer der entscheidenden Schritte bei der initialen Adhäsion und dem „*Homing*“ von Leukozyten und Tumorzellen identifiziert werden. Selektine scheinen somit auch eine wesentliche Rolle während der Metastasierung in unterschiedlichen Tumorarten zuzuspielen (Barthel et al., 2007). E-Selektine beispielsweise werden sowohl auf aktivierten endothelialen Zellen, als auch auf mesothelialen Zelloberflächen exprimiert (Gebauer et al., 2013). Selektine interagieren mit speziellen Selektin-Liganden, die als struktureller Bestandteil auf vielen Zelloberflächenmolekülen vorkommen. Der Großteil der Selektin-Liganden besteht aus unterschiedlichen Glykanstrukturen, welche die Tetrasaccharide Sialyl-Lewis X (CD15s) und Sialyl-Lewis A (CA 19-9) auf ihrem Proteingerüst tragen. Diese beiden Bestandteile an Zelloberflächenmolekülen könnten möglicherweise die Bindung von Tumorzellen an das Endothel, sowie eventuell auch an das Mesothel vermitteln. Somit könnten sie sowohl eine Rolle in der Migration, als auch in der Invasion und Extravasation spielen: Daher wurde in dieser Arbeit mittels einer FACS-Analyse untersucht, ob c-Fos einen Einfluss auf die Expression von Sialyl-Lewis X und A an der Zelloberfläche haben könnte.

1.3.5. Apoptose

Der programmierte Zelltod, der als Apoptose bezeichnet wird, ist ein durch zellexterne und zellinterne Stimuli ausgelöster Prozess, bei dem die Zelle im Gegensatz zur Nekrose kontrolliert abstirbt. Bei der Nekrose schwillt die Zelle so lange an, bis die Plasmamembran undicht wird oder platzt. Der Zellinhalt gelangt in den interzellulären Raum und eine Entzündungsreaktion wird hervorgerufen. Bei der Apoptose schrumpft die Zelle, verformt sich und verliert den Kontakt zu ihren Nachbarzellen. Das Chromatin in der Zelle kondensiert und die DNA der Zelle wird durch Endonukleasen in ca. 200 Basenpaare große Stücke zerschnitten. Im letzten Schritt der Apoptose bilden sich aus der „Zelle“ viele Membranvesikel, sogenannte Apoptosekörper, die von Makrophagen phagozytiert werden.

Die Apoptose ist in vielen Bereichen von wesentlicher Bedeutung. Sie ist für die kontrollierte Beseitigung von potentiell gefährlichen oder überflüssig gewordenen Zellen unerlässlich. Bei der Differenzierung eines mehrzelligen Organismus spielt die Apoptose ebenfalls eine Rolle. Mit ihrer Hilfe wird z.B. schon während der embryonalen

Entwicklung die menschliche Körperform, wie die Entwicklung der Finger und Zehen, gestaltet. Auch als Bestandteil der Entwicklung der Immuntoleranz eines Menschen ist die Induktion der Apoptose in Immunzellen, die sich gegen körpereigene Bestandteile richtet, von essentieller Bedeutung. Viele Gewebe des menschlichen Körpers, wie z.B. Haut und Schleimhaut, befinden sich in einem stetigen Umbauprozess. Diese Zellzahlhomöostase muss genau kontrolliert werden, wobei auch hier die Apoptose einen wesentlichen Regulationsmechanismus darstellt. Beispielsweise muss nach der Entwöhnung des Babys von der Muttermilch ein großer Teil der sekretorischen Epithelzellen in den Brustdrüsen entfernt werden. Diese Involution (Rückbildung des Organs) findet kontrolliert mit Hilfe von Apoptose statt (Schaerli und Jaggi, 1998). Die Beseitigung von defekten oder infizierten Zellen findet ebenfalls mit Hilfe von Apoptose statt. Irreparable DNA-Schäden in Zellen können über den sogenannten intrinsischen Weg die Apoptose in der Zelle induzieren. Zytotoxische T-Zellen können beispielsweise in virusinfizierten Zellen über den sogenannten extrinsischen Weg die Apoptose einleiten.

Die Apoptose kann durch zwei unterschiedliche Signalwege ausgelöst werden, den intrinsischen und den extrinsischen Weg. Beide enden in ein und derselben Caspase-Kaskade. Neben den Caspasen sind auch die Proteine der Bcl-Familie und die Inhibitors of Apoptosis (IAPs) an der Apoptose beteiligt.

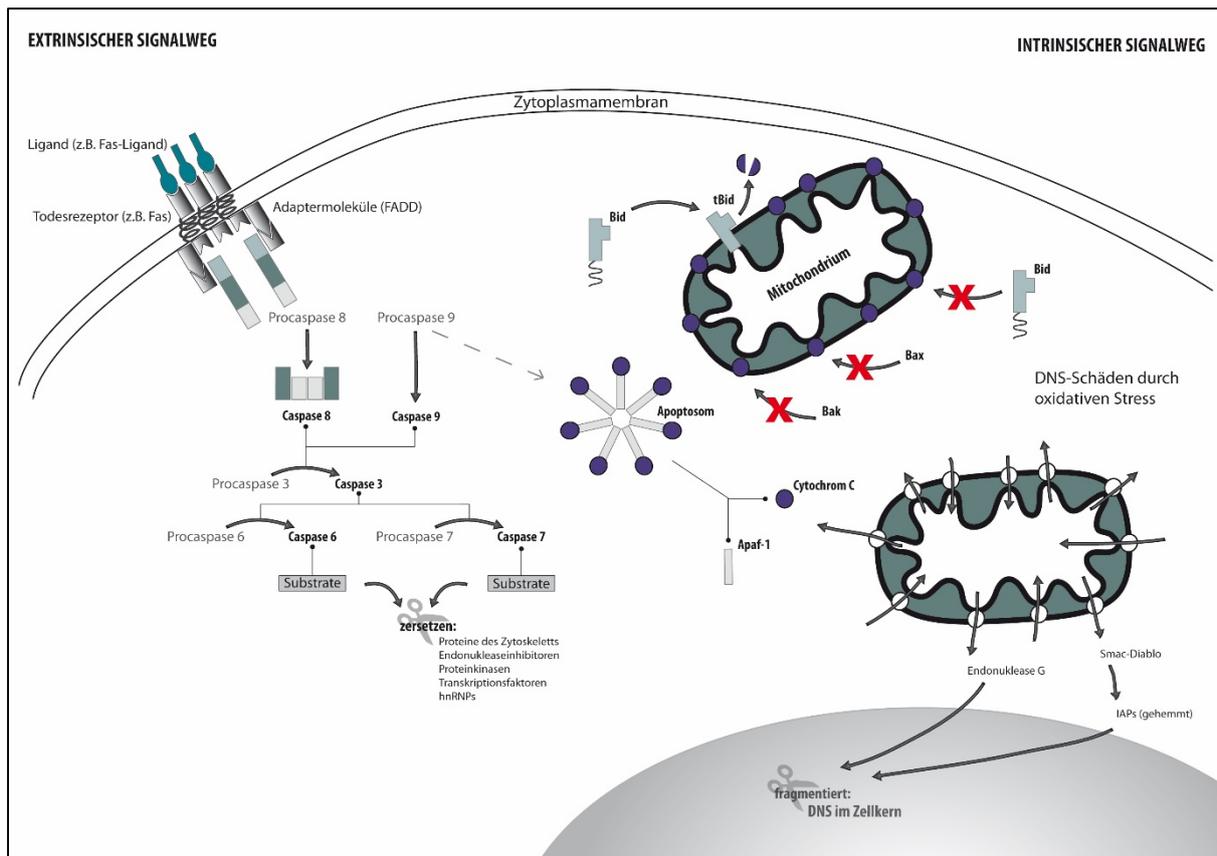


Abbildung 6: Signalwege der Apoptose nach Netzker (Netzker, 2006b)

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung bestimmter Liganden an sogenannte Todesrezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche befinden, induziert. Zu diesen Rezeptoren gehören u.a. TNFR-1, Fas und die TRAIL-Rezeptoren. Über einen bestimmten Mechanismus, der hier nicht näher erklärt werden soll, entsteht durch autokatalytische Spaltung aus Procaspase 8 Caspase 8. Caspase 8 induziert die kaskadenartige Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7, die für die proteolytische Spaltung der Zellbestandteile zuständig sind. Zusätzlich wird über die Caspase 8 auch der intrinsische Signalweg aktiviert. Die Caspase 8 spaltet das proapoptotische Bcl-2-bindende Protein Bid in tBid, welches sich in die äußere Mitochondrienmembran einlagert.

Der intrinsische Signalweg wird von zellinternen Signalen, wie oxidativem Stress oder irreparablen DNA-Schäden (z.B. über p53), ausgelöst. Hierbei treten aus den durchlässig gewordenen Mitochondrien Apoptosemediatoren aus. In einer gesunden Zelle verhindert das anti-apoptotische Protein Bcl-2, das sich in der äußeren Mitochondrien-Membran befindet, dass die pro-apoptotischen Proteine Bax, Bak und Bid in der äußeren Membran oligomerisieren können. Dieser Zustand wird nur

aufrechterhalten, wenn sich die anti- und die pro-apoptischen Proteine in einem Gleichgewicht befinden. Treten Stresssignale auf, führen diese zu einer verstärkten Expression von Bax oder Aktivierung von Bid durch Caspase 8. Sobald der Schutz durch Bcl-2 nicht mehr ausreicht, bilden Bax und Bak gemeinsam mit weiteren mitochondrialen Proteinen (Porine) sogenannte Permeabilitäts-Transitions-Poren. Das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran bricht zusammen und die Apoptosemediatoren Cytochrom C, Smac/Diablo und Endonuklease G gelangen ins Zytoplasma. Cytochrom C führt letztendlich zur Bildung eines Apoptosoms, welches über die Aktivierung von Caspase 9 zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 führt. Smac/Diablo deaktivieren die Hemmung der Effektorcaspasen durch die IPAs und die Endonuklease G trägt zur DNA-Fragmentierung im Zellkern bei.

Der Verlust der Apoptosefähigkeit einer Zelle kann zusammen mit anderen Faktoren der Tumorgenese zur malignen Proliferation führen. Die Fähigkeit zur Apoptose stellt einen wichtigen Faktor bei der Tumorsuppression dar, vor allem durch die Erhöhung der Chemosensitivität. Um zu untersuchen, ob c-Fos eine tumorsuppressive Wirkung über einen Einfluss auf die Apoptose ausübt, wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt.

1.3.6. Veränderung der Genexpression

Damit normale Zellen zu Tumorzellen transformieren, muss sich die DNA zuvor durch Mutationen verändert haben. Diese Mutationen führen zu dauerhaften Veränderungen in der Nukleotidsequenz (Wagener und Müller, 2010g). Solche Mutationen können durch spontane DNA-Veränderungen, wie z.B. Punktmutationen oder Deletionen, oder durch endogene bzw. exogene Mutagene hervorgerufen werden. Exogene Mutagene können physikalischer, chemischer oder biologischer Genese sein. Einige exogene Mutagene sind karzinogen. Tumorgene sind ursächlich an der Entstehung und/oder der Progression von Tumoren beteiligt (Wagener und Müller, 2010d). Sie unterliegen Mutationen, die ihre Struktur, ihrer Aktivität oder die Regulation ihrer Produkte beeinflussen. Gene, die durch Mutationen aktiviert wurden, heißen Onkogene. Diese Gene liegen in der gesunden Zelle als Proto-Onkogene vor und werden durch Mutationen oder Amplifikationen (Vermehrung von DNA-Abschnitten) zu Onkogenen, wie z.B. das Ras-Gen durch Punktmutation. Bei Tumorsuppressorgenen, wie dem Retinoblastom-Gen, führt ein Aktivitätsverlust zu einer Förderung der Entstehung und/oder der Progression von Tumoren.

Viele der mutierten Gene in Tumoren kodieren für Transkriptionsfaktoren. Dadurch können eine Vielzahl von Genen und deren Produkte beeinflusst werden. Für die Funktion von Transkriptionsfaktoren nimmt neben strukturellen Veränderungen auch der Grad der Expression des entsprechenden Gens eine wichtige Rolle ein. Wie auch in gesunden Zellen können Transkriptionsfaktoren in Tumorzellen durch ihre aktivierende oder unterdrückende Wirkung auf die Expression von Genen bestimmte Zellfunktionen verstärken oder aktivieren bzw. schwächen oder inhibieren.

Mittels der stabilen Transfektion von Zellen lassen sich diese genetisch manipulieren, so dass bestimmte Gene verstärkt exprimiert werden. Die Wirkungen der Veränderung der Genexpression eines bestimmten Genes in einer Zelle lassen sich dann, z.B. durch einen c-DNA-Microarray, auf RNA-Ebene oder durch Western-Blot-Analysen auf Proteinebene analysieren und quantifizieren. Eine mögliche Veränderung der Genexpression durch c-Fos sollte auch in der vorliegenden Arbeit auf RNA- und Proteinebene untersucht werden.

1.4. Zielsetzung

Der Transkriptionsfaktor c-Fos war zunächst hauptsächlich für seine onkogenen Funktionen bekannt. Jüngere Studien zeigten jedoch, dass c-Fos auch eine tumorsuppressive Aktivität hat und eine Rolle in der Apoptose spielen kann. Mahner et al. (2008) stellten in einer retrospektiven Studie an 101 Ovarialkarzinomen fest, dass eine geringere c-Fos-Expression signifikant häufiger in hochgradigen Karzinomen (G3) vorlag. Daneben war eine reduzierte c-Fos-Expression mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert.

Bisher ist noch nicht bekannt, über welche Mechanismen c-Fos seine tumorsuppressive Funktion ausübt. Dies könnte jedoch gerade für die Therapie von Ovarialkarzinomen von essentieller Bedeutung sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von c-Fos in Ovarialkarzinom-Zellen genauer untersucht werden.

Nach Etablierung von stabil transfizierten Zelllinien mit einer erhöhten c-Fos-Expression, im Vergleich mit der Ursprungszelllinie SKOV3, sollte anhand von Untersuchungen zur Proliferation, Invasivität, Motilität und Apoptose die Rolle von c-Fos in der Tumorprogression näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten mögliche regulatorische Einflüsse dieses Transkriptionsfaktors auf RNA-Ebene mittels

eines c-DNA-Microarrays untersucht und eventuelle Zielgene von c-Fos auf Proteinebene validiert werden.

Mit dieser Vorgehensweise sollten mögliche tumorsuppressiv wirksame Funktionen des Transkriptionsfaktors c-Fos identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Allgemeines

2.1.1.1. Verwendete Geräte

Es wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Geräte benutzt.

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Geräte	Vertrieb
Zellkulturschrank HeraCell	Heraeus/Thermo Scientific, Dreieich, DE
Zell-Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, DE
Nikon DIAPHOT 300	Nikon, Tokio, JP
Axioskop 40	Carl Zeiss, Göttingen, DE
LEICA DFC 320	Leica Microsystems LTD., Heerbrugg, DE
Wärmeplatte HT200	Minitüb GmbH, Tiefenbach, DE
Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg, DE
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
Hoefer SE 600 Vertical Slab Gel Unit (inklusive Spacer, Glasplatten, Kämmen)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
Hoefer TE 42 Series Transphor Electrophoresis Unit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, DE
Densitometer GS700	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Autoradiografie-Kassetten	PROTEC GmbH & Co. KG, Oberstenfelde, DE
Sunrise TECAN Elisagerät	Tecan, Crailsheim, DE
FACScalibur	Becton&Dickinson, Heidelberg, DE
Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau, DE
Nanodrop ND1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
pH-Meter	inoLap WTW, Heidelberg, DE
Thermocycler Peltrier Cycler PTC-200	Biozym, Oldendorf, DE
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, DE
Vortexer Heidolph	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, DE
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, DE
Mini-Vac power (Pumpe aus Zellkultur)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Fotoentwickler Curix 60	AGFA, Morsel, BE
RotoFix 32 A	Hettich LAB TECHNOLOGY, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, DE

2.1.1.2. *Verwendete Materialien*

Es wurden die in der Tabelle 5 aufgeführten Materialien verwendet. Einmal-Plastikwaren, wie zum Beispiel Zellkultur-Gefäße oder Pipettenspitzen, wurden von verschiedenen Firmen, wie unter anderem Greiner Bio-One GmbH, (Frickenhausen, DE), Sarstedt AG & CO (Nürnberg, DE), Falcon (B&D Heidelberg, DE), NALGENE® Labware (Schwerte, DE) und Eppendorf (Hamburg, DE), bezogen. Diese wurden jedoch nicht im Einzelnen aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Materialien

Material	Vertrieb
Blotting-Papier	Macherey-Nagel, Düren, DE
Immobilon-P Transfer Membrane (Porengröße: 0,45µm; Filter-Typ: PVDF)	Millipore Corporation, Bedford, USA
Fuji Medical X-ray Film Super HR (100 NIF 18 x 24)	Fujifilm Corporation, Tokyo, JP
Spritze, Injekt®, 20ml	Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Cryo-Einfriergerät	Nalge Nunc International, New York, USA
Neubauer-Zählkammer	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE

2.1.1.3. *Verwendete Reagenzien und Chemikalien*

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und sind in der Tabelle 6 aufgelistet. Wasser für wässrige Lösungen wurde durch ein Laborwassersystem der Firma MEMBRAPURE GMBH (Berlin, DE) hergestellt. Alle Lösungen wurden in sterilen Glasgefäßen angesetzt und anschließend autoklaviert.

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Vertrieb
Aceton	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Remmingen, DE
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (AA/BAA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Aqua (ad inieciabilia)	Baxter Healthcare SA, Zürich, CH
Bromphenolblau	MERCK, Darmstadt, DE
Albumin Fraktion V (bovine) (BSA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Camptothecin (CAMP)	Calbiochem, EMD Chemicals, Inc. San Diego, Kalifornien; USA
Cell Dissociation Buffer, Enzyme-Free, PBS-based (Dissoziationspuffer)	GIBCO®, invitrogen™, Paisley, Schottland, GB
Chloroform	MERCK, Darmstadt, DE
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (pH 7,2)	PAA-Laboratories GmbH, Pasching, AT
Ethanol (70 %)	Walter CMP GmbH & Co.KG, Kiel, DE

Reagenzien und Chemikalien	Vertrieb
Eukitt (Vitro-Clud®)	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, DE
Fetal Bovine Serum Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
L-Glutamine 200mM	Gibco Life Technologies Corporation, Paisley, GB
Glycerin 87 %	MERCK, Darmstadt, DE
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Kaiser's Glycerin Gelatine	MERCK, Darmstadt, DE
Magermilchpulver (Blotting grade Non-Fat dry)	Bio-Rad Laboratories, München, DE
McCoy's 5A Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Methanol (reinst)	Walter CHP GmbH & Co.KG, Kiel, DE
Na-Azid	SIGMA-Life-Science, SIGMA ALDRICH, Co, Saint Luis, Missouri, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	GIBCO/Invitrogen®, Paisley, GB
Propidiumjodid - Färbelösung	Dianova GmbH, Hamburg, DE
Puromycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
RNAse-Away	Molecular BioProducts, San Diego, Kalifornien, USA
Saccharose	Serva Electrophoresis, IMPLEN GmbH, München, DE
Salzsäure 37 %	MERCK, Darmstadt, DE
Sodiumdodecylsulfat-	FLUKA Biochemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
β-Mercaptoethanol	SIGMA-Life-Science, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Tricine	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Trizma-Base	SIGMA-Life-Science, SIGMA ALDRICH, Co, Saint Luis, Missouri, USA
TRIzol®-Reagent	invitrogen™, Paisley, Schottland, GB
Trypsin EDTA	Gibco Life Technologies Corporation, Paisley, Schottland, GB
TWEEN20	MERCK, Darmstadt, DE
Weißes Vaseline	Ceaser & Loretz GmbH, Hilden, DE

2.1.2. Material Zellkultur

2.1.2.1. Zelllinien

Es wurde die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3 verwendet.

Herkunft/Eigenschaften:

HTB-77; humanes Adenokarzinom des Ovars, resistent gegen „tumor necrosis factor“ und einige Zytotoxine wie Diphtherietoxin, Cisplatinum und Adriamycin, epithelial

Quelle:

ATCC, USA

Diese Zelllinie wurde 1973 aus dem Adenokarzinom einer 64 Jahre alten Kaukasierin etabliert. Aus dieser Ursprungszelllinie wurden mittels stabiler Transfektion zwei „neue“ Zelllinien hergestellt:

SKOV-3 c-Fos 1MK: In dieser Zelllinie wurde nach der Transfektion der Transfektionsfaktor c-Fos verstärkt exprimiert. Durch Einzelzellklonierung dieser Zelllinie wurden die beiden Klone SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 etabliert.

SKOV3 NC: Diese „neue“ Zelllinie wurde durch Transfektion eines Leer-Vektors mit Puromycin-Resistenz etabliert, so dass sie als Negativkontrolle verwendet werden konnte.

2.1.2.2. Plasmide

Die in der Tabelle 7 aufgeführten Plasmide wurden für die Transfektion der Zelllinie SKOV-3 verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pIRES-P	Leervektor mit Puromycin-Resistenz, dient der negativen Kontrolle (siehe Abbildung 7.)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Volker Assmann aus dem Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf; Genbanknummer: Z75185
c-Fos-pIRES-P	Expressionsvektor für c-Fos mit Puromycinresistenz (siehe Abbildung 7): Die vollständige kodierende Sequenz der c-Fos-RNA wurde an den Schnittstellen Nhe1 und EcoR1 einkloniert und durch Sequenzierung bestätigt.	Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch aus dem Labor der gynäkologischen Forschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

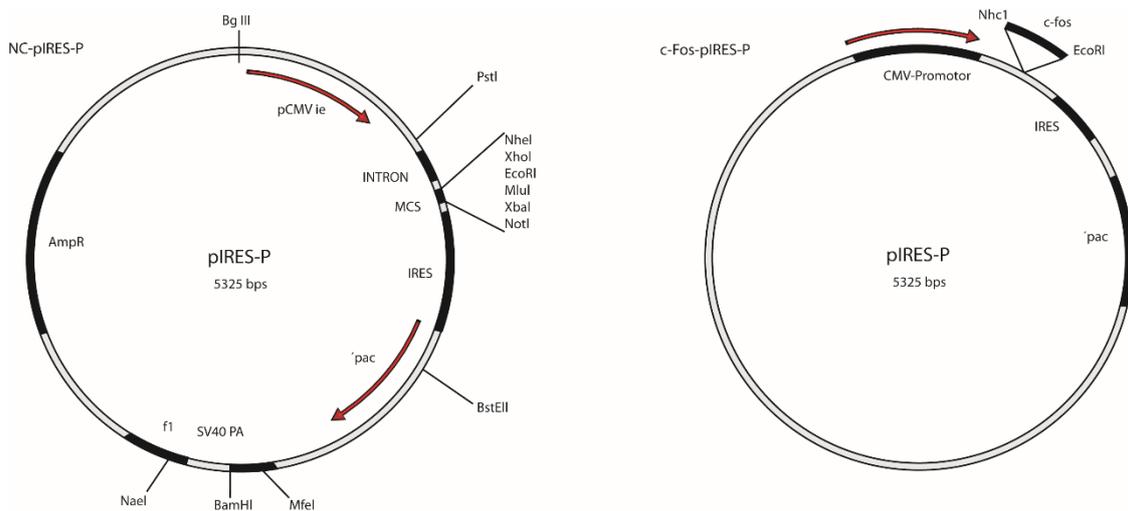


Abbildung 7: Zusammensetzung der verwendeten Plasmide pIRES-P und c-Fos-pIRES-P

2.1.3. Antikörper

Die in der Tabelle 8 aufgeführten Antikörper wurden für Western-Blot-Analysen, Durchflusszytometrie und Apoptosetests verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Antikörper-Bezeichnung	Bestellnummer	Vertrieb
anti-c-Fos (55 kDa), rabbit	sc-52	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Anti-Cyclin D1 (36 kDa), mouse	Sc-6281	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Anti-Aktin (43 kDa)	Sc-1616	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Sc-2004	Santa Cruz Technology, Heidelberg, DE
Anti-mouse HRP-conjugated, goat	Sc-2055	Santa Cruz Technology, Heidelberg, DE
Donkey anti-goat IgG-HRP	Sc-2020 Sc-2056	Santa Cruz Technology, Heidelberg, DE
M30 CytoDEATH	12140322001	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Anti-Mouse-CD15s	551344	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Anti-Ca 19-9 [SPM110]	NB120-15146	Novus Biologicals, Colorado, USA
Anti-Mouse IgG Biotinylated, polyclonal Rabbit	E0469	DAKO, Hamburg, DE
Anti-human CD54 [ICAM-1], PE-conjugated	12-0549-71	eBioscience, Frankfurt, DE
Anti-human CD171 [L1-CAM], PE-conjugated	12-1719-73	eBioscience, Frankfurt, DE
Anti-CD 166 [ALCAM], PE-conjugated	12-1661-81	eBioscience, Frankfurt, DE
Anti Human CD 44FITC conjugated, mouse IgG1	852.601.010	Diaclone SAS, Besançon, FR
APC Goat Anti-Mouse-IgG	550826	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Negativ Control Mouse IgM	X0942	DAKO, Hamburg, DE
Isotype Control Mouse IgG 1, PE-conjugated	12-4714-71	eBioscience, Frankfurt, DE
Isotype Control Mouse IgG1-FITC	130-092-213	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE

Antikörper-Bezeichnung	Bestellnummer	Vertrieb
Isotype Control Mouse IgG2a, PE-conjugated	130-091-835	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Isotype Control Rat IgG2a, PE-conjugated	12-4321-81	eBioscience, Frankfurt, DE
OPN Antibody (FL-314), rabbit polyclonal IgG	Sc-20788	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE

2.1.4. Fertig-Kits

Die in der Tabelle 9 aufgeführten Fertig-Kits wurden verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Fertig-Kits

Kit-Bezeichnung	Bestellnummer	Vertrieb
FuGENE® HDTransfection Reagent	04 709 691001	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid)	23227	Thermo Scientific, part of Thermo fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	34080	Thermo Scientific, part of Thermo fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution, 10x	2502	EMD Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA
Cell Proliferation Kit I (MTT)	11465007001	Roche Applied Science/ Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
Matrigel Invasion Chambers in two 24-well plates, 8.0 µm	354480	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Control Cell Culture Inserts in two 24-well plates, 8.0 µm	354578	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Diff-Quick Staining-Set	13083	Medion Diagnostics, Düringen, CH
VECTASTAIN ABC Kit (Mouse IgG)	PK 4002	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
DAB Peroxidase Substrate Kit, 3,3'-diaminobenzidine	SK 4100	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
109249 Mayers Hämalaunlösung	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Pellet Paint® Co-Precipitant	69049-3	Novagen®/Merck, Darmstadt, DE
RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen, Hilden, DE
Streptavidin-Allophycocyanin	BD554067	BD Bioscience, Heidelberg, DE
GeneChip IVT Express Kit	901229	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA
GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit	901241	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA
GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array	900466	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA

2.1.5. Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden wie in der nachfolgenden Tabelle 10 hergestellt.

Tabelle 10: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) für 10 ml	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g Ammoniumpersulfat abwiegen • 10 ml Aqua ad iniectionabilia mischen • in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotieren und bei -20 °C lagern
10x Anodenpuffer (1.000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 242,28 g Trizma-Base abwiegen • 800 ml entionisiertes Wasser hinzugeben • pH auf 8,9 mit HCL einstellen • Entionisiertes Wasser auf 1.000 ml auffüllen • Autoklavieren
5 % bzw. 1,5 % Blocking-Reagenz (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml TBST-Waschpuffer mit 5 g bzw. 1,5 g Magermilchpulver mischen
FACS-Puffer (1.000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml FCS abfüllen • 0,4 ml Na-Azid hinzugeben • mit PBS (pH7,6) auf 1000 ml auffüllen
3xGelpuffer mit 10 % SDS (500 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 181,7 g Trizma-Base abwiegen • auf 400 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen • mit HCL den pH-Wert auf 8,45 einstellen • mit entionisiertem Wasser auf 500 ml auffüllen • autoklavieren • bei +4-8 °C lagern • kurz vor Gebrauch 15 ml 10 % SDS hinzugeben
Inkubationspuffer (10 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml TBS-Arbeitslösung abfüllen und 100 mg BSA hinzugeben, mischen
10x Kathodenpuffer (1.000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 121,14 g Trizma-Base mit 179,2 g Tricine mischen • auf 800 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen • pH-Wert auf 8,25 mit HCL einstellen • auf 1.000 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen und autoklavieren
Pcsb1-Proteinpuffer (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml 0,5 M-Tris-Puffer (pH 6,8) mit 10 ml 10 % SDS mischen • 10 g Saccharose abwiegen und hinzugeben • auf ein Volumen von 100 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen, ggf. aliquotieren und bei -20 °C lagern
Pcsb2-Gellade-Denaturierungspuffer (10 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 g Saccharose abwiegen • 1 ml 0,5 M-Tris-Puffer (pH 6,8) und 4 ml 10 % SDS hinzugeben • 1-2 mg Bromphenolblau abwiegen und hinzugeben • alles in 3,5 ml Aqua ad iniectionabilia lösen • 1,5 ml β-Mercaptoethanol hinzugeben (Abzug!) • ggf. aliquotieren und bei -20 °C lagern
10 % SDS-Lösung (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • Mundschutz! • 10 g Sodiumdodecylsulfat-Natriumsalz abwiegen und in ein Volumen von 100 ml Aqua ad iniectionabilia geben • Lösung steril filtrieren
TBS-Arbeitslösung (1.000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml 10x TBS-Lösung (pH 7,6) mit 1ml reinem TWEEN20 mischen • mit Aqua ad iniectionabilia auf ein Volumen von 1.000 ml auffüllen
10x TBS-Lösung (1.000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 24,22 g Trizma-Base und 80,06 g NaCl mit 800 ml entionisiertem Wasser mischen • pH-Wert auf 7,6 mit HCL einstellen • mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 1000 ml auffüllen • autoklavieren
TBST-Waschpuffer (1.000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml 10x TBS-Lösung (pH 7,6) mit 5 ml 10 % TWEEN20 mischen • mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 1.000 ml auffüllen
10x Transferpuffer (1.000 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 121,14 g Trizma-Base mit 144,89 g Glycin mischen • mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 1.000 ml auffüllen • autoklavieren

Puffer/Lösung	Bestandteile
0,5 M-Trispuffer (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 6,05 g Trizma-Base abwiegen und mit 80 ml entionisiertem Wasser mischen • pH-Wert auf 6,8 einstellen mit HCL • Volumen mit entionisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen und alles autoklavieren
10 % TWEEN20 (50 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • 5 g TWEEN20 in 50 ml entionisiertem Wasser lösen und autoklavieren

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeiten mit den eukaryotischen Zellen fanden unter sterilen Laborbedingungen in einem Genlabor der Stufe S1 in einer ZELL-STERILBANK HERASAFE statt.

Die Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, in (T25cm²-, T75cm²-) Zellkulturflaschen bzw. in Zellkulturschalen (96-, 24-, 12-, 6-Well-Platten) in einem Inkubator bei 37 °C und wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Nach jeweils mindestens zwei und höchstens drei Tagen fand ein Wechsel des Kulturmediums statt, um den Zellen neue Nährstoffe zuzuführen und Abfallstoffe zu entfernen. Für alle Zelllinien wurde Nährmedium, dessen Zusammensetzung in Tabelle 11 beschrieben ist, verwendet. Alle vier Wochen wurden die transfizierten Zellen mittels eines Selektionsmediums (siehe Tabelle 11) für eine bis zwei Wochen nachselektioniert. Somit konnte ein Verlust der stabilen Transfektion ausgeschlossen werden.

Tabelle 11: Regelmäßig verwendete Kulturmedien und ihre Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
Nährmedium	McCoy's 5A-Medium 1 % Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin (PenStrep) 10 % Fetal Bovine Serum Gold (FCS)
Karenzmedium	McCoy's 5A-Medium 1 % Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin (PenStrep) 1 % Fetal Bovine Serum Gold (FCS)
Selektionsmedium	McCoy's 5A-Medium 1 % Glutamin 1 % PenStrep 10 % FCS 0,5 µg/ml Puromycin

2.2.1.2. Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei einer Zelldichte von minimal 70 % und maximal 90 % passagiert, um eine ständige Proliferation der Zellen zu gewährleisten:

- Nach Absaugen und Auswaschen des alten Mediums durch Überschichtung mit 37 °C warmem DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS) wurde ein vom Kultivierungsgefäß abhängiges Volumen Trypsin auf die Zellen gegeben.

- Die Zellen wurden bis zum vollständigen Ablösen durch eine leichte Erschütterung auf der Wärmeplatte bei 37 °C inkubiert.
- Anschließend wurde das Trypsin 1:10 mit vorgewärmtem Nährmedium verdünnt, um so die zelltoxische Wirkung des Trypsins zu stoppen.
- Das in eine neue Zellkulturflasche zu überführende Zellsuspensionsvolumen wurde so angepasst, dass die einzelnen Zellkulturen nur einmal pro Woche passagiert werden mussten. Zuvor wurde das Kultivierungsgefäß mit dem entsprechenden Volumen von zellfreiem Medium befüllt. Für Versuche wurden auch größere Volumina an Zellsuspension überführt. Die Tabelle 12 zeigt die vom Kultivierungsgefäß abhängigen Volumina an Trypsin und Füllungsvolumen.
- Schlussendlich erfolgte eine Kontrolle des erfolgreichen Umsetzens unter dem Mikroskop.

Tabelle 12: Kultivierungsvolumina

Kultivierungsgefäß	Benutztes Trypsinvolumen	Vorgesehenes Füllungsvolumen
96-Well-Platte	100 µl	200 µl
24-Well-Platte	250 µl	1,5 ml
12-Well-Platte	0,5 ml	2,5 ml
6-Well-Platte	0,5 ml	4 ml
T25cm ² -Zellkulturflasche	1 ml	5 ml
T75cm ² -Zellkulturflasche	1 ml	15 ml

2.2.1.3. Kryokonservierung der Zellen

Generell wurden nur gut proliferierende und vital aussehende Zellen zum Einfrieren verwendet.

- Die Zellen wurden einige Tage vor der Kryokonservierung entweder in einer T25er (T25cm²-Zellkulturflasche) oder T75er (T75cm²-Zellkulturflasche) ausgesät.
- Am Tag der Kryokonservierung betrug die Zelldichte in den Kultivierungsgefäßen zwischen 80 % und 90 %. Je nach Größe der Zellkulturflasche konnte folgende Anzahl an Kryoröhrchen (1 ml) hergestellt werden:
 - T25er (80-90% konfluent) → 1-2 Kryoröhrchen
 - T75er (80-90% konfluent) → 3-4 Kryoröhrchen

- Die Zellen wurden „trypsiniert“, sorgfältig resuspendiert, in ein 50 ml-Röhrchen überführt (siehe Kapitel 2.2.1.2) und anschließend für 6 bis 8 min. bei Raumtemperatur (RT) und 1.200 $1/\text{min}$ zentrifugiert.
- Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, so dass nur das Zellsediment am Boden des Röhrchens übrig blieb.

Im Folgenden wurde auf Eis gearbeitet, damit sich die zelltoxische Wirkung des Dimethylsulfoxid (DMSO) nicht entfalten konnte:

- Das Zellsediment wurde in einem eiskaltem DMSO/FCS-Gemisch (1:10) aufgenommen und so lange resuspendiert, bis sich die Zellen ohne Blasenbildung und ohne Klumpenbildung gut verteilt hatten. Pro Kryoröhrchen wurde 1 ml DMSO/FCS-Gemisch benötigt.
- Die mit den Zellen gefüllten Kryoröhrchen wurden nun in einem mit Isopropanol befülltem Zellfroster, in dem die Temperatur 1 °C pro Minute sinkt, langsam auf -80 °C eingefroren.
- Frühestens 24 h nach der Kryokonservierung konnte durch eine Auftauprobe (siehe Kapitel 2.2.1.4) der Erfolg der Kryokonservierung kontrolliert werden. War diese erfolgreich, wurden die eingefrorenen Zellen in eine Stickstofftonne zur weiteren Aufbewahrung überführt.

2.2.1.4. Auftauen der Zellen

Der gesamte Vorgang des Auftauens der Zellen aus den Kryoröhrchen musste zügig erledigt werden, da das DMSO für die Zellen toxisch ist:

- Die Zellen in den Kryoröhrchen wurden auf Trockeneis zwischengelagert. Jedes Röhrchen wurde im Wasserbad bei 37 °C so lange angetaut, bis sich die gefrorene Zellsuspension von alleine aus diesem löste. Nach Desinfektion des Röhrchens wurde die Zellsuspension in ein 10 ml-Röhrchen überführt und tropfenweise 10 ml Nährmedium hinzugegeben, um ein Platzen der Zellen aufgrund einer zu schnellen Temperaturerhöhung zu verhindern.
- Anschließend wurden die Zellen bei 1.000 bis 1.200 $1/\text{min}$ für 6 bis 8 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in frischem Nährmedium vorsichtig resuspendiert, um die Zellsuspension danach in eine Zellkulturflasche zu überführen.

- Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator aufbewahrt und am nächsten Tag unter dem Mikroskop beurteilt.
- Handelte es sich hierbei um eine Auftauprobe (siehe Kapitel 2.2.1.3), so durften nicht mehr als 10 % der Zellen tot sein, sonst mussten erneut Zellen kryokonserviert werden.

2.2.1.5. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung in einem bestimmten Volumen erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde eine kleine Menge der Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben und das Zählkreuz mit dem Mikroskop fokussiert. Die Zellzahl in jedem der vier Großfelder, jedes bestehend aus 16 Kleinquadraten, wurde einzeln ausgezählt und der Mittelwert aus ihnen gebildet. Nach folgender Formel ergab sich daraus die Zellkonzentration pro ml:

$$c = \frac{n}{V} \rightarrow c = n * 10^4 \text{ ml}^{-1}$$

c = Zellkonzentration

n = Zellzahl: Mittelwert der Zellzahl aus allen vier Großfelder

V = Volumen: Die Fläche eines Großquadrates beträgt 1 mm², die Höhe 0,1 mm.

Somit handelt es sich im ausgezählten Bereich um ein Volumen von 10⁻⁴ ml.

2.2.1.6. Stabile Transfektion, Selektion und Einzel-Zellklonierung der Zellen

Bei der stabilen Transfektion von Zellen wird ein exogenes Gen in die Zelle eingebracht und dauerhaft in die zelleigene DNA eingebaut. Das entsprechende Gen wurde zuvor in ein bakterielles Plasmid kloniert. In dieser Arbeit waren das die Plasmide pIRES-P und c-Fos-pIRES-P (siehe Abbildung 7). Das Plasmid enthält, neben vielen für den korrekten Einbau der exogenen DNA in die Zell-DNA wichtigen Bestandteilen, einen Viruspromotor. Dieser Viruspromotor, in dieser Untersuchung ein CMV-Promotor (Cytomegalievirus), ermöglicht es, dass das entsprechende Gen gleichmäßig stark exprimiert wird. Zusätzlich enthält das Plasmid noch eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum, hier ist es Puromycin. Mittels dieser Antibiotikaresistenz ist es möglich, zwischen Zellen, die das Plasmid erfolgreich und stabil aufgenommen haben und Zellen, bei denen dies nicht funktioniert hat, unterscheiden zu können.

Indem man die Zellen anschließend mit Selektionsmedium, das dieses Antibiotikum beinhaltet, kultiviert, kann man nach einer gewissen Zeitspanne davon ausgehen, dass alle überlebenden Zellen das entsprechende Gen in ihrer DNA beinhalten und stabil exprimieren.

Um sicherzustellen, dass die Expression des entsprechenden Gens möglichst konstant und gleichmäßig hoch ist, vereinzelt man diese Zellen. Dabei verteilt man zwischen einer und maximal fünf Zellen auf verschiedene Kultivierungsgefäße (Vertiefungen von 96-Well-Platten) mit Hilfe einer Verdünnungsreihe und versucht Abkömmlinge (Klone) von einer einzelnen Zelle zu ziehen (siehe Abbildung 8). Ist dieser Vorgang erfolgreich, so vermehrt man diese Klone und hält diese Zellen in Kultur. In dieser Arbeit wurden somit die beiden c-Fos-überexprimierenden Zellklone *SKOV3 c-Fos #1* und *SKOV3 c-Fos #6* etabliert.

Transfektion

Es wurde das von der Firma Roche veröffentlichte Protokoll für FUGENE®HD TRANSFECTION REAGENT genutzt. Dabei wurden am Vortag in 4 Vertiefungen einer 12-Well-Platte je 75.000 Zellen ausgesät. Das Fugene®-DNA-Verhältnis betrug 4:2. Es wurden die in Tabelle 7 genannten Plasmide, pIRES-P und c-Fos-pIRES-P, für die Transfektion benutzt.

Wie im Roche-Protokoll wurden die folgenden vier „Ansätze“ angefertigt:

- Der „*Transfektionsansatz*“: Er beinhaltete die zu transfizierenden Zellen, das entsprechende Plasmid mit Puromycinresistenz, sowie Fugene® und zusatzfreies McCoy's-Medium (Basalmedium). Fugene® erleichtert dabei die Aufnahme des Plasmids in die Zellen. Somit kann die Expression eines bestimmten Gens verändert werden.
- Die „*Puromycinkontrolle*“: Dieser Ansatz enthielt die Zellen in Basalmedium ohne Plasmid-Zugabe. Diese Zellen starben alle unter der Behandlung mit dem Selektionsmedium und zeigten dadurch eine erfolgreiche Selektion der Zellen durch Puromycin an.
- Der „*Mock*“: Dieser Ansatz beinhaltete die zu transfizierenden Zellen, Fugene® und zusatzfreies McCoy's-Medium. Diese Zellen starben alle durch die Selektion und dienen zum Ausschluss eines Einflusses der Fugene® auf die Selektion.

- Die „*Wachstumskontrolle*“: Sie beinhaltete die Zellen in Basalmedium. Diese Zellen wurden nur mit Nährmedium behandelt. Dieser Ansatz diente als Kontrolle einer erfolgreichen Zellproliferation.

Selektion

24 h nach der Transfektion wurde das vorhandene Medium gegen Selektionsmedium in den Transfektionsansätzen „*Mock*“, „*Puromycinkontrolle*“ und „*Transfektionsansatz*“ ausgetauscht. Dieses Medium wurde dreimal wöchentlich erneuert. Die Selektion erfolgte so lange, bis sich eine ausreichende Anzahl stabil transfizierter Zellen im „*Transfektionsansatz*“ etabliert hatte. Die Transfektionsansätze „*Mock*“ und „*Puromycinkontrolle*“ wurden so lange beobachtet und mit behandelt, bis alle darin befindlichen Zellen gestorben waren. Die „*Wachstumskontrolle*“ wurde beobachtet, bis sich im Kultivierungsgefäß eine Zelldichte von 100 % eingestellt hatte. Daraufhin wurden diese Zellen verworfen.

Einzel-Zellklonierung

Bei der Einzel-Zellklonierung wird eine Zellsuspension mittels einer Verdünnungsreihe so sehr verdünnt, dass man letztendlich nur 1 bis maximal 5 Zellen in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte überführt. Aus einer einzelnen proliferierenden Zelle entstehen daraufhin, zur Ursprungszelle identische, sogenannte Klone.

Hierfür wurde die mit dem Plasmid c-Fos-pIRES-P stabil transfizierte Massenkultur *SKOV-3 c-Fos 1MK* verwendet.

- Die Zelle wurden trypsiniert und die genaue Zellzahl pro Volumen dann mittels Zählkammer bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.1.5).
- Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (siehe Abbildung 8).
- Die einzelnen Vertiefungen der 96-Well-Platte, wie in Abbildung 8 beschrieben, wurden mit einer Zellzahl von einer bis fünf Zellen in 200 µl-Selektionsmedium befüllt.
- Die 96-Well-Platten wurden mehrmals pro Woche unter dem Mikroskop kontrolliert. Es wurden nur diejenigen Ansätze verwendet, bei denen deutlich zu erkennen war, dass sich Klone aus einer einzigen Zelle entwickelt hatten. Ansätze, bei denen sich mehrere Klone in einer Vertiefung bildeten, wurden ausgemustert.

- Sobald die Zellen eines Klon in einer Vertiefung eine Zelldichte von 60 % erreicht hatten, wurden sie in die Vertiefung einer 12-Well-Platte überführt, um dann erneut bei einer Zelldichte von 60 % in die nächstgrößere Vertiefung (6-Well-Platte) überführt zu werden.

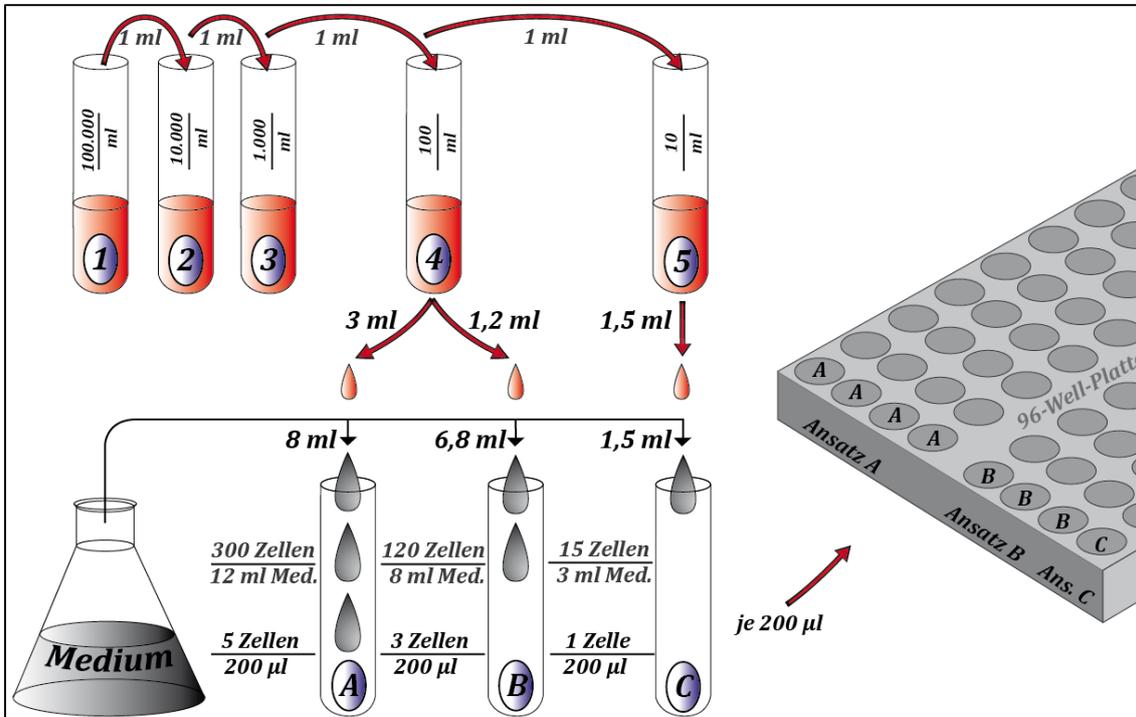


Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung der Einzel-Zellklonierung

Alle nachfolgenden Versuche wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit folgenden Zellen durchgeführt:

- **SKOV-3**: Ursprungszelllinie
- **SKOV3 NC**: Negativkontrolle
- **SKOV3 c-Fos #1**: c-Fos-überexprimierender Zellklon
- **SKOV3 c-Fos #6**: c-Fos- überexprimierender Zellklon

2.2.1.7. Proliferations-Assay: Cell Proliferation Kit I (MTT)

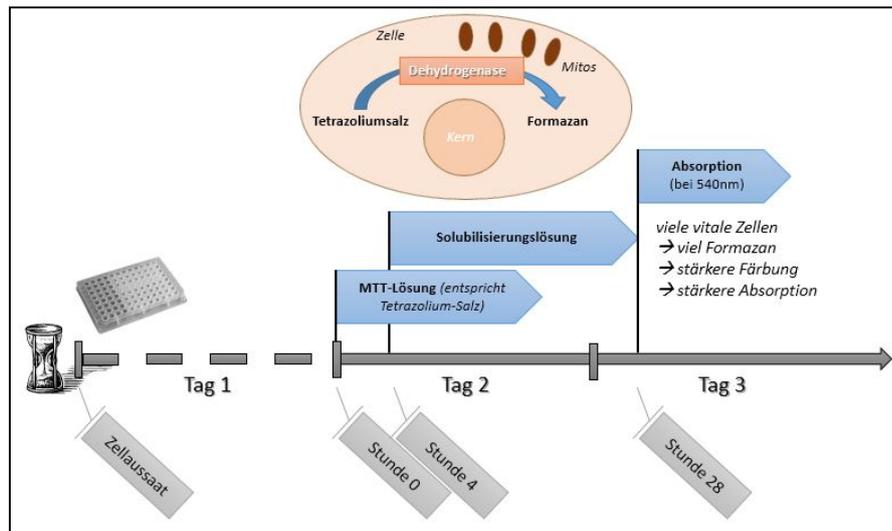


Abbildung 9 Schematische Darstellung des Proliferations-Assays

Für den Proliferations-Assay wurde das CELL PROLIFERATION KIT I (MTT) benutzt. Mit Hilfe dieses Tests lässt sich die Proliferation von Zellen über einen bestimmten Zeitraum indirekt quantitativ bestimmen. Hierbei macht man sich zunutze, dass vitale Zellen die Fähigkeit haben, Tetrazolium-Salze, wie MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid] in der Atmungskette zu Formazan umzusetzen (siehe Abbildung 9). Gibt man Tetrazolium-Salze (gelb) zu den Zellen, nehmen diese das Salz auf und reduzieren es durch ihre mitochondrialen Dehydrogenasen zu violetten Formazankristallen. Mit Hilfe einer Solubilisierungs-Lösung werden die Kristalle dann aus den Zellen gelöst. Nach einer gewissen Inkubationszeit kann anschließend der Grad der Absorption durch die violette Färbung mit einem ELISA-Reader spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 540 nm ermittelt werden. Indem man diese Messung nach Ablauf unterschiedlicher Zeiträume durchführt (24 h, 48 h, 72 h), lässt sich die Proliferation der Zellen indirekt durch die gemessene Absorption darstellen.

- Jeder Versuch wurde sowohl in normalem Nährmedium (10 % FCS), als auch in „Karenzmedium“, das sich nur in der Menge an FCS (1 % FCS), vom normalen Nährmedium unterschied, durchgeführt. Die Zellen befanden sich vor jedem Versuch für mindestens 1 Woche in Nährmedium bzw. „Karenzmedium“.
- Am Tag 1 wurden alle zu untersuchenden Zelllinien mit einer Zellzahl von 6.500 (Versuch 1) bzw. 5000 Zellen (Versuch 2-4) in 100 µl Medium pro Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellzahl war so gewählt, dass nach 24 h Inkubationszeit im Brutschrank die Konfluenz in jeder Vertiefung bei ca. 50 % lag.

Es wurden immer Doppelbestimmungen (2 Ansätze pro zu untersuchendem Zelltyp) durchgeführt. Für jede Messreihe (Versuchsdauer von 24, 48 und 72 h) wurde am ersten Tag jeweils eine eigene 96-Well-Platte angefertigt. Die Platten wurden bis zur Weiterbehandlung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

- Nach 24 h wurde zu jedem Ansatz der 96-Wellplatte „24 Stunden“ 10 µl MTT-Lösung aus dem Kit hinzugegeben und die Platte für 4 h erneut im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde in diese Ansätze jeweils noch 100 µl Solubilisierungslösung aus dem Kit hinzu gegeben und die Platte erneut für 24 h im Brutschrank inkubiert.
- Nach Ablauf der 24 h wurde die Färbung der Ansätze bei 540 nm im ELISA-Reader photometrisch quantifiziert.

Die anderen 96-Wellplatten wurden nach 48 bzw. 72 h auf die gleiche Weise behandelt.

2.2.1.8. Invasions- und Migrations-Assay

Für die Untersuchungen zur Invasion und Migration wurden die folgenden beiden Kits verwendet:

Invasion: Matrigel Invasion Chambers in two 24-well plates, 8,0 µm

Migration: Control Cell Culture Inserts in two 24-well plates, 8,0 µm

Dieser Invasions- und Migrations-Assay lässt eine *in vitro*-Betrachtung von Tumorzellen in Bezug auf ihr Invasions- bzw. Migrationsverhalten zu. Diese Methode wurde erstmals von Albini et al. (1987) als „Boyden chamber assay“ beschrieben, und es ermöglicht das Invasionspotential von Tumorzellen quantitativ zu bestimmen. Der Versuchsaufbau besteht aus zwei Kammern, die durch eine künstliche Basalmembran (Matrigel®), die über einer porösen Membran liegt, voneinander getrennt sind (siehe Abbildung 10). Das Matrigel® besteht aus Kollagen IV, Laminin, Entacin und Heparansulfatglykan und ähnelt der Basalmembran des menschlichen Gewebes sowohl in Struktur und Zusammensetzung, als auch in physikalischen Eigenschaften. Parallel zum Invasions-Assay findet auch ein Migrations-Assay statt, der sich in Durchführung und Aufbau des Testsystems nur durch das Fehlen des Matrigels® unterscheidet (siehe Abbildung 10). Hier wird somit ausschließlich nur die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen quantitativ bestimmt.

Sowohl in die Invasionskammern, als auch in die Migrationskammern, wird nach Vorbehandlung die gleiche Zellzahl ausgesät und der gesamte Versuchsaufbau für einen bestimmten Zeitraum im Brutschrank inkubiert. Danach werden diejenigen Zellen, die sich auf der Unterseite der Membranböden befinden, angefärbt, die Böden herausgeschnitten und auf Objektträgern (OT) fixiert. Anschließend lässt sich durch Auszählung der angefärbten Zellen die Anzahl der invadierten bzw. migrierten Zellen bestimmen.

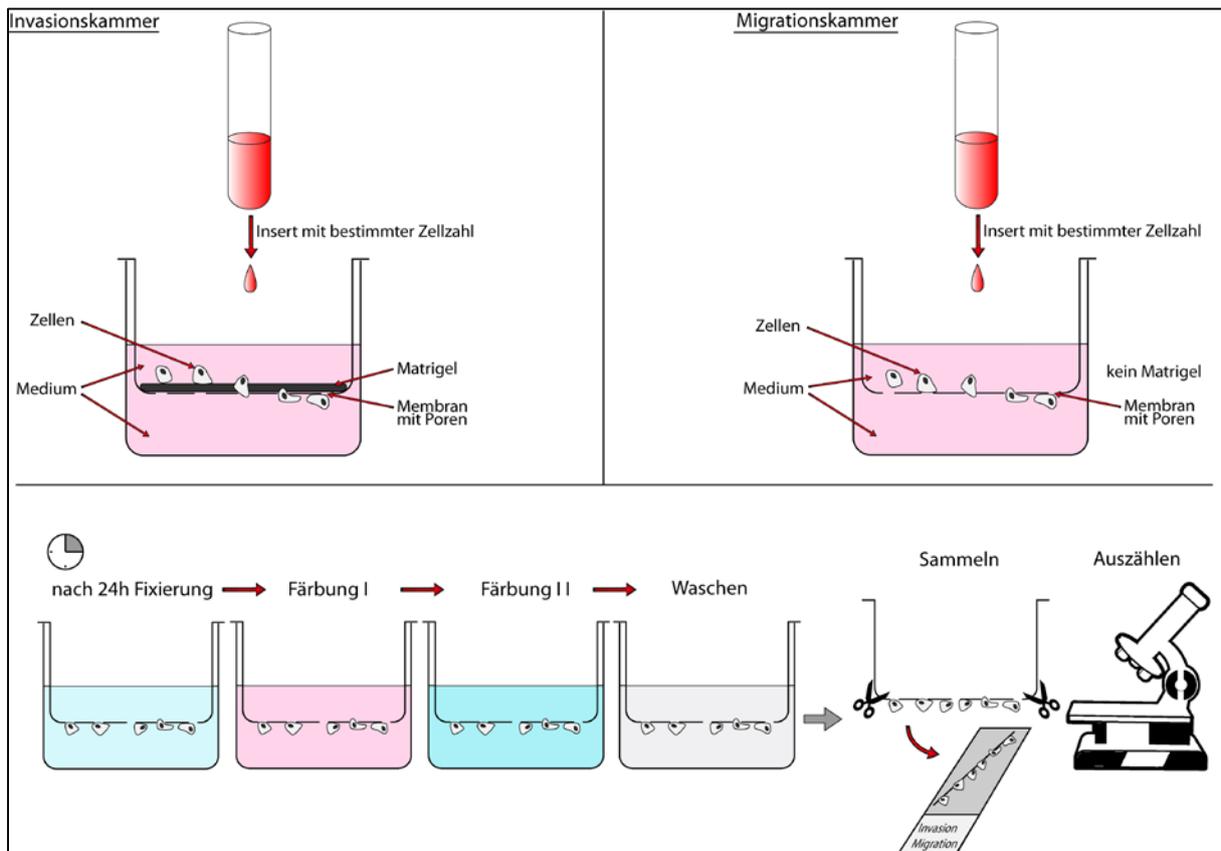


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Invasions- und Migrations-Assays

Der Invasions- und Migrations-Assay wurde in Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll der Firma BD Biosciences für die BD BIOCOAT™ MATRIGEL™ INVASION CHAMBER durchgeführt.

Versuchsdurchführung

- Die BD BIOCOAT™ MATRIGEL™ INVASION CHAMBER 24-WELL PLATE 8.0 MICRON mit den Matrigel-Einsätzen wurde für 15 min bei RT aufgetaut.
- Anschließend wurden die jeweils 6 Vertiefungen der Reihe 1 und 3 der 24-Well-Platte mit 750 µl Basalmedium gefüllt. In diese Vertiefungen wurden die Matrigel-Einsätze gehängt und als Nächstes jeweils mit 500 µl serumfreiem McCoy's-

Medium befüllt. Die Pipettenspitze sollte den Boden hierbei nicht beschädigen. Ebenfalls sollten keine Luftblasen am Boden des Einsatzes entstehen, da diese das Ergebnis des Versuches verfälschen können.

- Anschließend wurde die 24-Well-Platte für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Während der Inkubationszeit konnten die zu untersuchenden Zellen vorbereitet werden.

- Die Zellen wurden trypsiniert (siehe Kapitel 2.2.1.2), in Nährmedium resuspendiert, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und dann bei 1.200 ¹/_{min} für 8 min zentrifugiert.
- Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in Nährmedium, das nur mit 1 % FCS versetzt worden war, resuspendiert.
- Nachdem die Zellzahl mittels Zählkammer (siehe Kapitel 2.2.1.5) bestimmt worden war, wurden für jede der zu untersuchenden Zelllinien Ansätze hergestellt, bei denen sich in 500 µl 1 % FCS-Nährmedium 12.500 Zellen befanden. Das Volumen der jeweiligen Ansätze war abhängig von der Anzahl der zu befüllenden Einsätze pro Zelllinie.

Nach Ablauf der 2 h konnte die 24-Well-Platte weiter vorbereitet werden:

- Die CONTROL INSERTS 24-WELL PLATE 8.0 MICRON mit den Kontroll-Einsätzen wurde aus dem 4 °C-Kühlschrank genommen und zunächst unter der Zell-Sterilbank bis zu ihrem Gebrauch aufbewahrt.
- Das Basalmedium wurde aus den Matrigel-Einsätzen entfernt und die Einsätze in die Reihen 2 und 4 umgesetzt und das Medium aus den Vertiefungen der Reihen 1 und 3 abgesaugt.
- Anschließend wurden die Vertiefungen der Reihen 1 und 3 mit jeweils 750 µl Nährmedium, welches mit 2 % FCS statt 10 % FCS versetzt worden war, befüllt (ohne Luftblasen), um danach die Matrigel-Einsätze dort einzusetzen.
- In die Reihen 2 und 4 wurde ebenfalls pro Vertiefung 750 µl Nährmedium mit 2 % FCS hinein pipettiert, um daraufhin die Kontroll-Einsätze aus der CONTROL INSERTS 24-WELL PLATE 8.0 MICRON einzusetzen.
- Letztendlich wurde in jeden der 24 Einsätze 12.500 Zellen in 500 µl Nährmedium, welches mit 1 % FCS versetzt worden war, überführt. Dabei wurden pro Zelllinie

jeweils drei Matrigel- und drei Kontroll-Einsätze befüllt. Anschließend wurde die 24-Well-Platte für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen an den Außenseiten der Einsatzböden mit dem DIFF-QUICK® STAININGSET wie folgt angefärbt:

- Zuvor wurden vier saubere 24-Well-Platten alter Invasions-Assays wie folgt vorbereitet:
 - Platte 1: 1 ml Fixierlösung (hellblau) pro Vertiefung
 - Platte 2: 1 ml Färbelösung I (rot) pro Vertiefung
 - Platte 3: 1 ml Färbelösung II (dunkelblau) pro Vertiefung
 - Platte 4: 1 ml Aqua dest. pro Vertiefung zum Waschen
- Die 24-Well-Platte mit den Zellen wurde aus dem Brutschrank genommen, die Matrigel- und Kontroll-Einsätze wurden jeweils eindeutig beschriftet und alle Einsätze im Folgenden auf die gleiche Weise behandelt:
- Der Inhalt jedes Inserts wurde verworfen. Der innere Einsatzboden wurde daraufhin mit einem mit Aqua dest. angefeuchteten Wattestäbchen ausgewischt, ohne den Einsatzboden zu beschädigen, um nicht gewanderte Zellen zu entfernen. Dann wurde jeder Einsatz umgekehrt hingestellt.
- Im ersten Schritt wurden die Einsätze für 2,5 min in die Fixierlösung der Platte 1 gehängt, dann die restliche Lösung aus den Einsätzen gekippt und anschließend auf saugfähigem Papier über Kopf „herausgeklopft“. Im zweiten bzw. dritten Schritt wurden die Einsätze in die Färbelösungen der Platte 2 und 3 für ebenfalls 2,5 min gehängt, um dann genauso wie zuvor zu verfahren. Im vierten Schritt wurden die Einsätze in ein mit Aqua dest. gefüllten Becherglas zweimal eingetaucht, um dann für 5 min in die Platte 4 mit Aqua dest. gehängt zu werden.
- Der Flüssigkeitsrest in den Einsätzen wurde im Folgenden, wie zuvor auch schon, auf einem saugfähigen Papier ausgekippt. Als nächstes wurde der innere Boden jedes Einsatzes einmal mit einem feuchten und anschließend mit einem trockenen Wattestäbchen gründlich ausgewischt. Zu guter Letzt wurde mit dem zweiten Wattestäbchen noch einmal der äußere Rand jedes Einsatzbodens durch „Herumrollen“ und ohne Berührung der Membran, gesäubert.

Alle Einsätze wurden umgekehrt hingestellt und für 30 min bei RT luftgetrocknet.

Anschließend wurden die Matrigel- und Kontroll-Membranen von den Einsätzen auf die vorher eindeutig beschrifteten OT überführt:

- Auf den OT wurde 1 Tropfen Eukitt gegeben. Die Membran wurde vorsichtig mit einem Skalpell, das am Membranrand herumgeführt wurde, bis auf einen kleinen Bereich vom Einsatz gelöst, um dann mit einer Pinzette vollständig vom Insert entfernt zu werden. Die Membran wurde anschließend so auf den Eukitt-Tropfen gelegt, dass die zuvor untere Membranseite des Inserts nun nach oben zeigte.
- Im Folgenden wurde ein Tropfen Eukitt mittig auf ein Deckglas gegeben und die Membran luftblasenfrei eingedeckelt.

Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, konnten die Membranen unter dem Mikroskop wie folgt ausgewertet werden:

- Die einzelnen Membranen wurden alle in der gleichen Vergrößerung (10x) und auf dieselbe Weise mit einer LEICA DFC 320 fotografiert. Insgesamt wurden pro Membran acht sich nicht überschneidende Ausschnitte jeder Membran in derselben Vorgehensweise fotografiert und als TIFF-Datei gespeichert.
- Anschließend wurde für jedes Bild die Anzahl der angefärbten Zellen mit dem Programm ADOBE PHOTOSHOP CS4 am Computer ausgezählt und der Mittelwert aus den Zellzahlen aller acht Bilder einer Membran gebildet.

2.2.1.9. Wundheilungs-Assay

Mit dem Wundheilungs-Assay kann die Migrationsfähigkeit von Zellen aus einer Zellgruppe beobachtet werden. Hierfür wird in einen konfluenten Zellrasen eine gleichmäßig breite Zelloücke, sozusagen eine künstliche Wunde, gezogen. Ein markierter Teil in dieser Lücke wird nachfolgend beobachtet (siehe Abbildung 11). Im zeitlichen Verlauf bewegen sich die beiden „Zellrasen-Ränder“ aufeinander zu. Diese Migration wird dokumentiert und der vollständige Schluss der Zelloücke abgepasst. Mit diesem recht einfachen Versuchsaufbau lässt sich das Migrationsverhalten zwischen verschiedenen Zelllinien vergleichen.

- Zunächst wurde von außen auf die Vertiefung einer 6-Well-Platte mit einem schmalen Stift ein Kreuz gezogen. Für alle vier Zelllinien wurden so viele Zellen ausgesät, dass die Konfluenz am Folgetag mindestens 90 % betrug.

- Am Folgetag wurde in jedem Ansatz das Medium gegen ein Nährmedium mit 5 % FCS ausgetauscht. Anschließend wurde mit einer sterilen 100 µl-Pipettenspitze in jedem Ansatz anhand des Kreuzes eine gleichmäßig große „Wunde“, also ein Bereich, an dem sich keine Zellen befanden, geschaffen.
- Pro Zelllinie wurden 2 unterschiedliche „Wundbereiche“ in den Vertiefungen markiert und beobachtet, die folgende Kriterien erfüllten: Die Ränder des zellfreien Bereich mussten gerade, gleichmäßig und zu 100 % konfluent bewachsen sein. Es durften keine Zellen vom Rand in die zellfreie Zone gerutscht sein, und es durften sich keine Zellen am Randbereich stapeln.
- In den folgenden Stunden bzw. Tagen wurden die markierten Bereiche mit der LEICA DFC 320 in regelmäßigen, zum Lückenschluss hin kürzer werdenden Abständen fotografiert, um die Zellmotilität zu erfassen. Dabei wurde immer in der gleichen Vergrößerung (4x) fotografiert, um die Bilder später miteinander vergleichen zu können. Wichtig war hierbei vor allem, den Lückenschluss genau abzupassen.
- Die Bilder wurden mit ADOBE PHOTOSHOP CS4 am Computer ausgewertet. Dabei wurde die Pixelanzahl im zellfreien Bereich jedes Bildes durch die „Zauberstab-Funktion“ bestimmt und mit dem Messwerkzeug ausgezählt. Die Pixelanzahl des Bildes zur Stunde 0 wurde dabei immer als 100 % gesetzt. Ebenfalls wurde der Zeitraum bis zum vollständigen Lückenschluss dokumentiert.

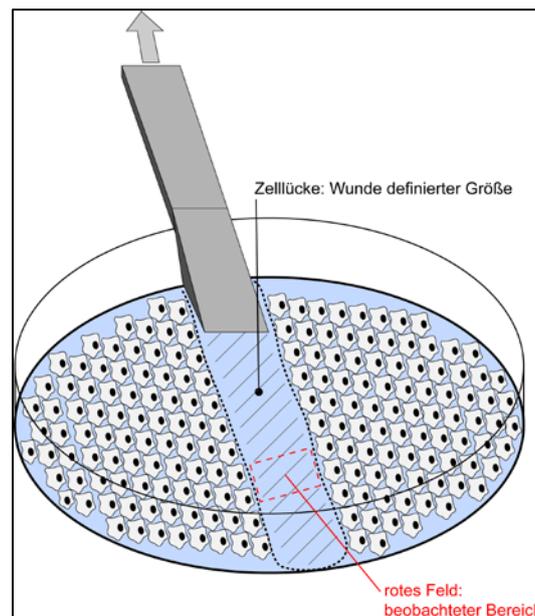


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Wundheilungs-Assays

2.2.1.10. Apoptose-Assay für die Anfärbung mit M30 auf Cytospins

Das Apoptoseverhalten von kultivierten Zellen lässt sich mit Hilfe des Antikörpers M30 CYTODEATH untersuchen. Dieser Antikörper färbt diejenigen Zellen an, die sich während des Beobachtungszeitraums in der Apoptose befinden.

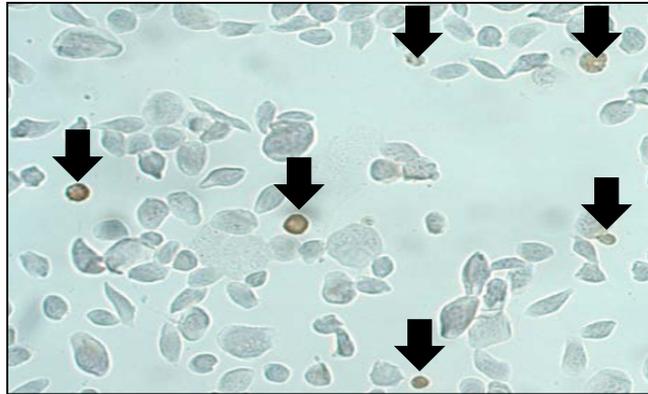


Abbildung 12: Mit M30 CytoDeath braun angefärbte apoptotische Zellen (siehe Pfeile)

Er erkennt hierbei ein spezifisches Caspase-Spaltprodukt des Cytokeratins 18, welches in nicht-apoptotischen Zellen nicht vorhanden ist. Bei dem hier verwendeten Apoptose-Assay wurden die zu untersuchenden Zellen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen des Zytotoxins Camptothecin (CAMP) und mit Nährmedium für einen bestimmten Zeitraum behandelt. Anschließend wurden mittels eines Cytospin-Gerätes definierte Zellvolumina auf OT übertragen. Mit Hilfe des Antikörpers M30 CYTODEATH ließen sich dann all diejenigen Zellen braun anfärben, die sich in der Apoptose befanden. Anschließend konnten die apoptotischen Zellen quantitativ bestimmt werden (siehe Abbildung 12).

Insgesamt wurden 3 Versuche mit den Zelllinien SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 wie folgt durchgeführt.

Tag 1: Für alle 4 Zelllinien wurden jeweils 3 Ansätze mit 600.000 Zellen pro 5 ml Nährmedium hergestellt und diese bis zum nächsten Tag inkubiert.

Tag 2: In allen Ansätzen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Für alle Zelllinien wurde jeweils einer der drei Ansätze wie folgt behandelt:

- Ansatz A: 5 ml normales Nährmedium
- Ansatz B: 5 ml Nährmedium mit 0,04 µg/ml CAMP
- Ansatz C: 5 ml Nährmedium mit 0,4 µg/ml CAMP

- Alle Ansätze wurden daraufhin 16 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tag 3: Nach Ablauf der 16 h wurden die Zellen jedes Ansatzes trypsiniert (siehe Kapitel 2.2.1.2), in ein entsprechend beschriftetes 50 ml-Röhrchen überführt und bei 1.200 $\frac{1}{\text{min}}$ für 8 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment durch Resuspendieren in 600 μl PBS gelöst. Aus einem Ansatz mit 600.000 Zellen in 600 μl konnten 3 OT mit je 200.000 Zellen in 200 μl PBS mit dem mittleren Trichter des CYTOSPIN-GERÄTES ROTOFIX 32 A hergestellt werden. Dafür wurden die Zellen für 3 min bei 12.000 $\frac{1}{\text{min}}$ auf die eindeutig beschrifteten OT zentrifugiert.

Anschließend ließ man die OT mit den darauf befindlichen Zellen bis zum nächsten Tag an der Luft bei RT trocknen.

Tag 4: Die Zellen wurden auf den OT fixiert, um dann die sich in der Apoptose befindlichen Zellen mit dem Antikörper M30 CYTODEATH bräunlich anzufärben:

Versuchsdurchführung

Fixierung: Die OT wurden für 30 min bei -20 °C in flüssiges Methanol und anschließend für 1 min, ebenfalls bei -20 °C in flüssiges Aceton getaucht. Anschließend wurden sie für 30 min bei RT an der Luft getrocknet.

Färbung:

- Umkreisen des mit Zellen bedeckten Bereiches auf jedem OT mit einem DAKO-Pen.
- Dieser Bereich wurde daraufhin jeweils dreimal mit PBS bedeckt und für je 2 min bei RT inkubiert.
- Anschließend wurden auf jeden OT 2-3 Tropfen „*Blocking-Lösung*“ gegeben und die OT wurden in einer feuchten Kammer bei RT für 10 min inkubiert.

Blocking-Lösung:

1 ml TBS-Arbeitslösung (siehe Kapitel 2.1.5)

20 μl des Normalserums aus dem Vectastain Elite ABC Kit (mouse) von Vector Laboratories

- In der Zwischenzeit wurde die Primär-Antikörper-Lösung M30 1:20 in Inkubationspuffer (siehe Kapitel 2.1.5) frisch hergestellt. Nach Abgießen der Blocking-Lösung von den OT wurden 2-3 Tropfen der Primär-Antikörper-Lösung

auf jeden OT gegeben. Die Präparate wurden dann für 1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert.

- Die Antikörper-Lösung wurde abgegossen und jeder OT dreimal für je 2 min mit 4-5 Tropfen TBS-Arbeitslösung überschichtet.
- Daraufhin wurden die OT mit je 2-3 Tropfen der Sekundär-Antikörper-Lösung für 30 min in der feuchten Kammer bei RT inkubiert.

Sekundär-Antikörper-Lösung:

1 ml TBS-Arbeitslösung (siehe Kapitel 2.1.5.11)

20 µl Normalserum aus Vectastain Elite ABC Kit (mouse)

20 µl Anti-Mouse IgG biotinylated Antibodies aus Vectastain Elite ABC Kit (mouse)

- Der Sekundär-Antikörper wurde abgekippt und jeder OT dreimal für je 2 min mit TBS-Arbeitslösung überschichtet.
- Anschließend wurden alle OT für 30 min bei RT in der feuchten Kammer mit 2-3 Tropfen ABC-Reagenz, das 30 min vor seinem Gebrauch frisch angesetzt werden muss, inkubiert.

ABC-Reagenz:

1 ml TBS-Arbeitslösung (siehe Kapitel 2.1.5.11)

20 µl Reagenz A und 20 µl Reagenz B aus dem Vectastain Elite ABC Kit von Vector Laboratories

- Nachfolgend wurde drei Mal für je 2 min mit TBS-Arbeitslösung gespült.
- Zellen, die den Antikörper M30 gebunden hatten, wurden mit DAB-Substrat angefärbt. Dieses wurde immer erst kurz vor Gebrauch angesetzt, um mit 2-3 Tropfen pro OT unter Sichtkontrolle (bräunlich-rote Verfärbung der Zellen) für 3 bis 7 min bei RT inkubiert zu werden.

DAB-Substrat:

5 ml Aqua dest.

2 Tropfen Buffer aus Peroxidase Substrate Kit DAB von Vector Laboratories

- Anschließend wurden die OT mit einem Färberahmen dreimal für jeweils 5 min in Aqua dest. gespült, um die Zellen dann mit MAYERS HÄMALAUNLÖSUNG gegenzufärben, indem jeder OT mit 2-3 Tropfen überschichtet und für 2 min inkubiert wurde.
- Die OT wurden erneut zweimal für je 5 min in Aqua dest. gespült und nach dem zweiten Spülvorgang bis zum „Eindeckeln“ darin stehen gelassen.
- Für das „Eindeckeln“ mit einem Deckglas wurde KAISER'S GLYCERIN GELATINE, die zuvor in einem Wasserbad leicht erwärmt wurde, benutzt. Es wurde ein OT aus dem Aqua dest. genommen, auf den feuchten einzudeckenden Bereich ein Tropfen der KAISER'S GLYCERIN GELATINE gegeben, das Deckglas an einer Seite mit Aqua dest. angefeuchtet und mit der feuchten Seite zuerst auf den Gelatine-Tropfen

gelegt. Die folgenden zwei bis drei Tage mussten die OT bei RT so lange trocknen, bis die Gelatine vollständig ausgehärtet war.

Für die Auswertung des Apoptosetests wurden die Zellen in einer 20-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop fotografiert. Bei jedem OT wurde zuerst das Zentrum des kreisrunden Bereiches mit den Zellen eingestellt und ausgehend von diesem Zentrum wurden mindestens drei Bildausschnitte, die direkt nebeneinander lagen, sich aber nicht überschneiden, in gleicher Weise mit der Kamera LEICA DFC 320 aufgenommen. Anschließend wurde am Computer mittels ADOBE PHOTOSHOP CS4 zum einen die Gesamtzellzahl, zum anderen die Anzahl der braungefärbten und somit apoptotischen Zellen für jedes Bild ausgezählt. Aus den drei Bildern jedes OT wurde ein Mittelwert für die Gesamtzellzahl und für die apoptotische Zellen gebildet. Aus den Mittelwerten konnte daraufhin für jeden OT die Anzahl der apoptotischen Zellen von 1.000 gezählten Zellen errechnet werden.

2.2.1.11. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen sowohl auf ihre Größe und Granulationsstärke, als auch mit Hilfe von Antikörpern auf die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle untersucht. Die Zellen fließen dabei einzeln, wie an einer Perlenschnur, durch eine Kapillare an einem Laserstrahl vorbei. Je nach Größe und je nach Granulationsgrad wird der Laserstrahl verändert und gestreut, so dass das Durchflusszytometrie-Gerät, in dieser Arbeit FACSKALIBUR, daraus auf Größe und Granulationsgrad der Zelle schließen kann. Um bestimmte Oberflächenmoleküle untersuchen zu können, müssen die Zellen zuvor mit entsprechenden fluoreszierenden Antikörpern behandelt werden. Es können Antikörper verwendet werden, die selbst fluoreszieren, oder es wird zusätzlich noch ein fluoreszierender Sekundärantikörper benutzt, der an den FC-Teil des primären Antikörpers bindet. Folgende Antikörper mussten noch mit einem entsprechenden Sekundärantikörper behandelt werden: *Anti-Mouse-CD15s*, *Anti-CA 19-9 [SPM110]*, *Negativ Control Mouse IgM*. Den Grad der Expression eines bestimmten Oberflächenmoleküls der untersuchten Zellen misst das Gerät, indem es die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle einer Probe, die durch den Laserstrahl wandert, misst. Das Gerät gibt dabei den geometrischen Mittelwert (Geomean= GM) der Fluoreszenzintensitäten an. Der GM ist äquivalent zur Menge der gebundenen Antikörper und damit zum Expressionsgrad der Moleküle auf der Zelloberfläche. Um eventuelle falsch-positive

oder falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, wird jedes Mal sowohl eine Positivkontrolle, als auch eine Negativkontrolle unter denselben Bedingungen analysiert. Für die Positivkontrolle benutzt man einen fluoreszierenden Antikörper, der sicher an die Zelle bindet. Für die Negativkontrolle nutzt man sogenannte Isotypkontrollen. Diese Isotypkontrollen sind Antikörper, die ganz sicher nicht an Strukturen binden, die auf der Zelloberfläche zu finden sind. Indem man kurz vor der Untersuchung zur Zellsuspension Propidiumiodid hinzufügt, verändern alle toten Zellen ihr Verhalten so, dass mittels einer Rasterfestlegung durch das entsprechende Computerprogramm alle toten Zellen nicht mit in der Analyse berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit wurden Analysen zu den Oberflächenmolekülen ALCAM, ICAM-1, CD44, CA19-9 und CD15s durchgeführt.

Mit Hilfe der CELLQUEST SOFTWARE wurden die im FACS-Gerät erhobenen Daten erfasst und durch Daniel Wicklein aus der Anatomie II des UKE´s mit den Programmen WinMDI und PowerPoint (Microsoft Office) ausgewertet.

Versuchsdurchführung

- Zuerst wurden die Ansätze für die Antikörper und für die Isotypkontrollen auf Eis hergestellt. Die Antikörper bzw. die Isotypkontrollen wurden 1:50 mit *FACS-Puffer* verdünnt. Das Volumen (pro Probe 50 µl) der Ansätze richtete sich dabei nach Anzahl der zu untersuchenden Zelllinien.
- Für jede der zu untersuchende Zelllinien wurde eine mindestens zu 90 % konfluente T75er mit 5 ml *PBS* gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Sichtkontrolle mit je 2 ml *Dissoziationspuffer* vom Flaschenboden gelöst.
- Es wurde jeweils 8 ml *FACS-Puffer* hinzugegeben und die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt.
- Die Ansätze wurden dann für 8 min bei 1.500 $1/\text{min}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment wurde in einem bestimmten Volumen von *FACS-Puffer* resuspendiert. Das Volumen des *FACS-Puffers* war von der Anzahl der Antikörper und der Isotypkontrollen abhängig.
- Anschließend wurde für jede zu untersuchende Zelllinie eine entsprechende Anzahl von 2 ml-Reaktionsgefäßen mit 50 µl der jeweiligen Zellsuspension befüllt. Die Anzahl der Ansätze richtete sich dabei nach der Zahl an Antikörpern und

Isotypkontrollen, die benötigt wurden. Jeder Zellprobe wurden dann 50 µl des jeweiligen Antikörper- bzw. Isotypkontroll-Ansatzes hinzugegeben.

In der Regel waren die Antikörper und die Isotypkontrollen (FITC, PE, APC) direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. War dies nicht der Fall (*Anti-Mouse-CD15s*, *Anti-CA 19-9 [SPM110]*, *Negativ Control Mouse IgM*), so musste der (Primär-) Antikörper mit einem entsprechenden Sekundär-Antikörper (Streptavidin FITC) gekoppelt werden, der wiederum einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden hatte:

- Der (Primär-) Antikörper wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Handelte es sich hierbei um Antikörper, die nicht direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt waren, so mussten noch folgenden Schritte zusätzlich durchgeführt werden:
 - Nach Ablauf der 30 min wurde 1 ml FACS-Puffer zu der entsprechenden Zellprobe hinzugegeben, resuspendiert und die Probe für 5 min bei 2250 $1/\text{min}$ zentrifugiert.
 - Der Überstand wurde anschließend abgenommen und dem Zellsediment wurde dann 50 µl des mit FACS-Puffer 1:200 verdünnten Sekundär-Antikörpers hinzugegeben. Die betroffenen Proben wurden dann für 30 min auf Eis inkubiert.
 - Anschließend wurde wieder 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und diese Zellprobe wieder zentrifugiert.
 - Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurde dem Zellsediment 100 µl des APC-Streptavidin-Mastermixes (1:100 mit FACS-Puffer verdünnt) hinzugegeben und das Ganze dann mit allen Proben für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert.
- Anschließend wurde zu jedem Ansatz 1 ml *FACS-Puffer* gegeben, gründlich resuspendiert und für 5 min bei 2250 $1/\text{min}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment wurde wie zuvor mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen.
- Abermals wurde der Überstand abgenommen und das Zellsediment in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und diese Zellsuspension in ein vorbereitetes FACS-Röhrchen überführt.
- Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

- Erst direkt vor jeder Messung im FACS-Gerät FACSCALIBUR wurde jeder Probe 5 µl Propidiumjodid hinzugegeben.
- Mit Hilfe der CellQuest Software wurden die im FACS-Gerät erhobenen Daten erfasst und durch Daniel Wicklein aus der Anatomie II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit den Programmen WinMDI und PowerPoint (Microsoft Office) ausgewertet.

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Um die durch die Transfektion der Zellen veränderte Konzentration an c-Fos und die durch c-Fos möglicherweise veränderten Proteinkonzentrationen anderer Moleküle zu überprüfen, sollten Western-Blot-Analysen durchgeführt werden. Dafür wurden die Zellen mittels Pcsb1-Puffer lysiert und die Proteine eingefroren.

- Die Zellen wurden entsprechend der benötigten Proteinmenge in die Vertiefungen einer 6-Well-Platte oder in eine T25er bzw. T75er ausgesät. Am Tag der Proteinextraktion sollten die Zellen in den Kultivierungsgefäßen eine Konfluenz von 80-90 % haben.
- Das Medium wurde abgesaugt, gründlich mit PBS gewaschen und anschließend auf Eis gestellt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern.
- Nach 10-20 s wurde ein bestimmtes Volumen von Pcsb1-Proteinpuffer, wie in Tabelle 13 dargestellt, auf die Zellen pipettiert und großflächig durch Schwenken verteilt. Der Pcsb1-Proteinpuffer bewirkt eine Zelllyse, so dass nur noch die Zellproteine übrig bleiben.

Tabelle 13: zu pipettierendes Volumen des Pcsb1-Proteinpuffers

Kultivierungsgefäß	Menge des Pcsb1-Proteinpuffers in µl
Vertiefung einer 6-Well Platte	100-150
T25er-Zellkulturflasche	200-300
T75er-Zellkulturflasche	450-550

- Sobald beim Schwenken der Pcsb1-Proteinpuffer schlierig und viskös aussehend über den Gefäßboden lief, konnte das Proteinextrakt mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst werden. Anschließend wurde das Proteinextrakt vollständig aus dem Kultivierungsgefäß in ein zuvor beschriftetes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt.
- Die Suspension musste mehrmals resuspendiert werden, bis das Extrakt homogen und noch leicht viskos war. Waren trotz mehrfachen Resuspendierens noch Proteinklumpen vorhanden, konnte noch so viel Pcsb1-Proteinpuffer hinzugegeben werden, bis die Extrakt homogen wurde. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte erfolgte mit dem KIT BCA PROTEIN ASSAY REAGENT (BICINCHONINIC ACID):

- Zunächst wurde eine Eichkurve wie in Tabelle 14 mit der BSA-Stammlösung aus dem BCA PROTEIN ASSAY REAGENT hergestellt:

Tabelle 14: Pipettierschema zur Erstellung einer Eichkurve

Einsatz BSA-Lösung in µl	Eingesetzte Lösungen	Pcsb1 in µl	TRIS/HCL in µl 50 mM	Endkonzentration BSA in µg/ml	Eppendorf-Reaktionsgefäß-Nr.
500	Stamm	200	300	1000	A
375	Stamm	200	425	750	B
500	A	100	400	500	C
500	C	100	400	250	D
500	D	100	400	125	E
500	E	100	400	62,5	F
200	E	160	640	25	G

- Die Proteinextrakte wurden auf Eis aufgetaut, und im Folgenden wurde auf Eis weiter gearbeitet. Die Proteinextrakte wurden kurz vor Gebrauch immer nochmals gründlich mit dem Rüttler durchmischt („gevortext“), um zu gewährleisten, dass die Proteine gleichmäßig verteilt waren.
- Als Erstes wurden die Proteinextrakte 1:5 mit 50 mM TRIS/HCL (pH= 6,8) verdünnt. Dafür wurden 25 µl Proteinextrakt mit 100 µl 50 mM TRIS/HCL in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt. Für den benötigten Leerwert wurde statt Proteinextrakt nur Pcsb1-Proteinpuffer benutzt.
- Sowohl die Eichlösungen, als auch die Proteinextrakte wurden immer doppelt bestimmt. Dafür wurden für jede Probe zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße beschriftet und in jedes je 50 µl der entsprechenden Eichlösung bzw. der entsprechenden Proteinverdünnung vorgelegt.
- Anschließend wurde zu jeder Probe 1 ml der frisch hergestellten BCA-Arbeitslösung des BCA PROTEIN ASSAY REAGENT hinzu gegeben, jede Probe dann „gevortext“ und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

BCA-Arbeitslösung:

Lösung A: Lösung B = 50:1

z.B. 20 ml Lösung A und 400 µl Lösung B

- Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Proben wieder auf Eis gestellt und zügig die Eichkurve bzw. die Proteinproben im Bio-Photometer bei 562 nm gemessen.

Dabei wurde immer zuerst mit dem Leerwert kalibriert, um dann die Eichkurve bzw. die Proteinproben zu messen. Das Gerät ermittelt dabei die Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$. Aus den Doppelbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet und dieser weiter verwendet.

2.2.2.3. Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist ein Verfahren, bei dem Proteine anhand ihrer Größe in einem Gel durch ein elektrisches Feld in Proteinbanden aufgetrennt und dann aus dem Gel auf eine Membran übertragen werden. Anschließend werden die Proteinbanden mit einer Antikörperreaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Die Proteine werden durch Hinzugabe eines Überschusses an Natriumdodecylsulfat (SDS) und durch anschließendes Erhitzen negativ geladen und verlieren ihre Sekundär- und Tertiärstruktur. Durch zuvor hinzugegebenes β -Mercaptoethanol werden zusätzlich noch Disulfidbrücken gespalten. Mit Hilfe eines diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gels (SDS-PAGE), dessen Struktur einem engmaschigen Netz gleicht, werden die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe durch ein elektrisches Feld in einer ionischen Pufferlösung anhand ihrer Größe aufgetrennt (modifiziert nach Leammli (1970)). Hashimoto et al. (1983) beschrieben, dass dabei die Wanderungsgeschwindigkeit der meisten Proteine umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer molekularen Masse ist.

Die aufgetrennten Proteine werden in einem weiteren Schritt aus dem Gel auf eine Membran, die aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder aus Nitrocellulose besteht, übertragen. Dies geschah im Rahmen der Arbeit in einer mit Transferpuffer gefüllten Nass-Blot-Apparatur durch Anlegen eines senkrecht zum Gel und zur Membran ausgerichteten elektrischen Feldes. Hierbei bleibt das Muster der Proteine bestehen.

Anschließend können in einer spezifischen Antikörperreaktion bestimmte Proteinbanden auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Die Membran wird zuerst mit einem spezifischen Primär-Antikörper und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper behandelt. In dieser Arbeit wurden die entsprechenden Proteinbanden durch eine sogenannte Chemilumineszenz-Lösung, die mit den Antikörpern reagierte, auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Bei der Reaktion der Peroxidase mit der Chemilumineszenz-Lösung werden Lichtsignale abgegeben und der Röntgenfilm belichtet. Je höher die Konzentration eines bestimmten Proteins ist, desto höher ist auch die Konzentration des assoziierten Antikörpers und damit nimmt auch der Schwärzungsgrad des Röntgenfilms an dieser Stelle zu. Um die gleichmäßige Proteinkonzentration der einzelnen Proben zu überprüfen, wurde bei jeder Western-Blot-Analyse in einem ReBlot das

„Housekeeping-Gen“ Aktin überprüft, das in jeder Zelle gleich stark exprimiert wird. Als c-Fos Positiv-Kontrolle diente die Mammakarzinom-Zelllinie MDA MB231. Die Stärke der Belichtung, die äquivalent zur Menge des detektierten Proteins ist, wurde mit Hilfe eines sogenannten Densitometers ausgewertet (siehe Kapitel 2.2.2.4).

Versuchsdurchführung

Elektrophorese

- Zusammenbau der Einsätze der Western-Blot-Kammer (siehe Abbildung 13 und 14).

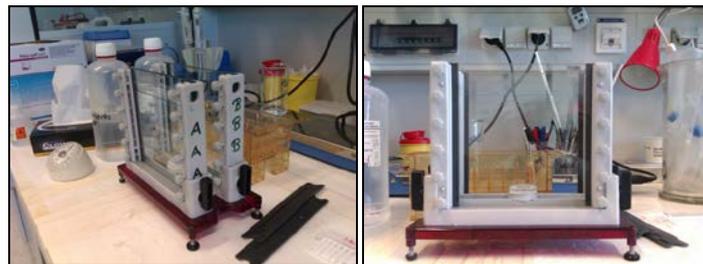


Abbildung 13 und 13: Versuchsaufbau zur Herstellung der Gele für die Elektrophorese

- Es wurden Trenn- und Sammelgel ohne die Zugabe von Tetramethylethylendiamine (TEMED) und 10 %ige Ammoniumpersulfat-Lösung (APS), wie in Tabelle 15 und Tabelle 16 beschrieben, hergestellt. TEMED und APS verursachen die Polymerisation des Gels. Beide Ansätze wurden bis zum Gebrauch mit dem Magnetrührer durchmischt.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Trenngels

Bestandteile des Trenngels	8 % Gel (Proteingröße: 80-100 kDa)	10 % Gel (Proteingröße: 40-90 kDa)	16 % Gel (Proteingröße: <40 kDa)
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA)	12 ml	15 ml	24,8 ml
3x Gelpuffer mit 10 % Natriumdodecylsulfat-Natriumsalz-Lösung (SDS)	20 ml	20 ml	20 ml
87 % Glycerin	8 g	8 g	8 g
Aqua dest. (steril)	20 ml	17 ml	7,2 ml
Tetramethylethylendiamine (TEMED)	30 µl	30 µl	30 µl
10 % Amoniumpersulfat-Lösung (APS)	300 µl	300 µl	300 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung des Sammelgels für zwei Gele

Bestandteile des Sammelgels	12er Kamm	20er Kamm
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA)	1,5 ml	2,3 ml
3x Gelpuffer mit 10 % Sodiumdodecylsulfat-Natriumsalz-Lösung (SDS)	3,1 ml	4,7 ml
Aqua dest. (steril)	7,9 ml	11,9 ml
Tetramethylethyldiamine (TEMED)	15 µl	22,5 µl
10 % Amoniumpersulfat-Lösung (APS)	150 µl	225 µl

- Dann wurde dem Trenngel TEMED und APS zugegeben und kurz untergemischt. Anschließend wurden 17 ml des Gels mit einer 10 ml-Pipette zwischen die Glasplatten gegeben und mit Aqua dest. überschichtet, um einen möglichst geraden Gelrand zu erhalten. Das Trenngel musste nun mindestens 45 min aushärten.

Inzwischen erfolgte die Vorbereitung der Proteinproben auf Eis:

- Die zu untersuchenden Proteine wurden auf Eis aufgetaut und die einzelnen Proteinmengen berechnet. Pro Geltasche sollten 20 µg Protein eingesetzt werden. Die Konzentration der Proteinproben war vorab mittels BCA-Methode (siehe Kapitel 2.2.2.2) bestimmt worden. Das Volumen, das 20 µg Protein enthielt wurde in Reaktionsgefäße pipettiert und bis zu einem Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Das Volumen des Pcsb2-Gelladepuffers musste immer genauso groß sein wie das Volumen des Proteinextrakts mit dem Pcsb1-Proteinpuffer zusammen. In dieser Arbeit entsprach das 25 µl Pcsb2-Gelladepuffer.
- Je nach Geltaschenanzahl wurde die entsprechende Zahl an beschrifteten Reaktionsgefäßen vorbereitet. Anschließend wurde das entsprechende Volumen des Pcsb1-Proteinpuffers jeder Probe vorgelegt und das berechnete Volumen des zu untersuchenden Proteinextraktes hinzugegeben. Die Proben wurden sorgfältig „gevortext“ und 25 µl des Pcsb2-Gelladepuffers unter dem Abzug (enthält β-Mercaptoethanol) mit einer Multipipette hinzugegeben. Wieder wurden die Proben mit dem Vortexer gemischt, um dann für 1 min bei 13.000 $1/\text{min}$ zentrifugiert zu werden.
- Anschließend wurden die Proben im THERMOCYCLER PELTRIER CYCLER PTC-200 bei 98 °C denaturiert, um dann bis zur weiteren Verwendung auf 4 °C herunter gekühlt zu werden.
- Kurz bevor die einzelnen Proben in die Taschen überführt wurden, wurden die Proben nochmals für 10 s bei 13.000 $1/\text{min}$ zentrifugiert und auf Eis gelagert.

- Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Wasser abgegossen und sämtliche Restflüssigkeit auf dem Gel mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt. Nun wurden 20-zählige Kämmen, zur Bildung der Geltaschen, jeweils mittig zwischen die Glasplatten eingesetzt.
- Den schon vorbereiteten Anteilen des Sammelgels konnten nun die entsprechenden Mengen von TEMED und APS beigemischt werden. Das fertige Sammelgel wurde mit einer 10 ml-Pipette luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegeben, so dass der Zwischenraum vollständig mit Sammelgel gefüllt war. Das Sammelgel musste im Folgenden für 30 min polymerisieren.
- In der Zwischenzeit wurde frischer Kathodenpuffer, angesetzt:
 - Kathodenpuffer:*
 - 70 ml 10x Kathodenpuffer*
 - 7 ml 10 % SDS*
 - 623 ml Aqua dest.*
- Nach dem vollständigen Polymerisieren des Sammelgels wurden beide Kämmen entfernt, alle Geltaschen wurden zweimal mit Hilfe einer Spritze mit Aqua dest. gespült. Sobald alles Restwasser entfernt worden war, wurden die Glasoberkanten im Bereich der Spacer (siehe Abbildung 13) mit Vaseline beschmiert und das Kammeroberteil, das später mit Kathodenpuffer befüllt wurde, konnte aufgesetzt werden. Die schwarzen Klammern wurden daraufhin umgesetzt und das Fußteil der Apparatur von den Glasplatten gelöst.
- Die Kathodenkammer wurde daraufhin unter den Abzug gestellt, zu 2/3 mit Kathodenpuffer befüllt. Mithilfe einer Kapillarpipette wurden die Proben in die Geltaschen gegeben. Letztendlich wurde die Kathodenkammer mit den probenbeladenen Gelen in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der restliche Kathodenpuffer wurde bis zur Maximalmarkierung in die Kathodenkammer gegeben. Die Elektrophoresekammer wurde an das ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY EPS 601 angeschlossen und die Elektrophorese erfolgte bei 55 V für 16 bis 20 h.

Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Vorbereitung:

- Pro Gel wurden sechs Blätter Whatman-Papier und eine PVDF-Membran je nach Gelgröße zurechtgeschnitten und Letztere eindeutig mit Bleistift beschriftet. Die Gitter mit den Schwämmen wurden zusammengebaut und eine große

Plastikschale zum Einlegen der Gitter wurde zu drei Viertel mit frischem Transferpuffer gefüllt.

*Transferpuffer:
100 ml 10x Transferpuffer
900 ml Aqua dest.*

- Die Kathodenkammer wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und der Kathodenpuffer abgegossen. Die schwarzen Klammern und das Kammeroberteil wurden entfernt. Die Glasplatten wurden so auf die Arbeitsfläche gelegt, dass das Gel A immer links, das Gel B immer rechts, bei beiden der Marker auf der linken Seite war und die blaue Bande unten.
- Die Glasplatten wurden mit einem Spatel auseinander gehebelt. Nach Entfernung der oberen Glasplatte, wurde das Sammelgel mit der blauen Bande (bis auf einen kleinen Rest) abgeschnitten und das Gel mit Aqua dest. gespült, um Gelreste zu entfernen.
- Nun wurde die PVDF-Membran zuerst gründlich in Methanol und dann in Aqua dest. frei schwimmend geschwenkt, bis sie vollständig hydratisiert war (Wasser perlte nicht mehr ab).

Pro Gel wurde nun wie folgt verfahren:

- Auf das Gel wurden drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Bögen gelegt und die Luftblasen mit einer 25 ml-Einwegpipette rollend entfernt.
- Die andere gesäuberte Glasplatte wurde auf die Whatman-Bögen gelegt und das Gel so umgedreht, dass sich der Marker nun rechts und die blaue Bande unten befand.
- Das Gel wurde anschließend vorsichtig mit einem Skalpell, immer vom Marker ausgehend, von der oben liegenden Glasplatte gelöst.
- Die PVDF-Membran wurde aus dem Aqua dest. genommen, in Transferpuffer geschwenkt und dann luftblasenfrei mit einer Pinzette auf das Gel gelegt.
- Auf die PVDF-Membran wurden drei weitere in Transferpuffer geschwenkte Whatman-Bögen gelegt und wieder die Luftblasen entfernt.
- Das Gitter wurde mit der schwarzen Seite nach unten in die Schale mit dem Transferpuffer gelegt und ein Schwamm aufgelegt. Wenn der Schwamm gut durchtränkt und luftblasenfrei war, wurde das Gel-PVDF-Membran-Watman-

Bögen-Paket mittig auf den Schwamm gelegt. Auf dieses „Paket“ wurde ein zweiter Schwamm gelegt, aus dem ebenfalls alle Luftblasen entfernt wurden.

- Nun wurde das Gitter geschlossen und tropfnass in die Blottingkammer eingesetzt, so dass der Verschluss nach unten und das graue Gitter nach vorne zeigte. Diese Anordnung gewährleistete, dass die durch das β -Mercaptoethanol negativ geladenen Proteine zur Anode hin „geblottet“ wurden.
- Nun wurde der restliche Transferpuffer aus der Schale in die Blottingkammer bis zur Maximalmarkierung gegossen, die Kammer wurde an das Gerät ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY EPS 601 angeschlossen und der Blottingvorgang wurde bei 400 mA für 4-5 h durchgeführt.
- Nach 4-5 h wurde das Programm beendet und die beiden Gitter aus der Kammer genommen. Die Gitter wurden geöffnet und alles bis auf die PVDF-Membran entfernt.
- Die Membranen wurden erneut in Methanol geschwenkt und dann für 30 min auf einem Filterpapier getrocknet.
- In der Zwischenzeit wurde die 5 % Blocking-Reagenz (siehe Kapitel 2.1.5), hergestellt. Für ein 20-Taschen-Gel wurde ein Volumen von 20 ml benötigt.
- Die getrockneten Membranen wurden nochmals erst in Methanol und dann in Aqua dest. geschwenkt, um dann in einer verschließbaren Schale mit 20 ml der 5 % Blocking-Reagenz überschichtet und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert zu werden. Wurde die Membran hingegen nicht gleich am nächsten Tag weiter verwendet, so wurde sie direkt nach dem Trocknen in einer Folie eingeschweißt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Folien vor ihrer Verwendung, wie oben beschrieben, mit 5 %igem Blocking-Reagenz behandelt.

Proteindetektion mittels Antikörper

Vorbereitung:

- Das benötigte Volumen von 1,5 % Blocking-Reagenz für die Herstellung der Antikörperlösungen wurde angesetzt: Für ein 20-Taschen-Gel wurde ein Volumen von 20 ml 1,5 % Blocking-Reagenz benötigt.
- Die über Nacht mit 5 % Blocking-Reagenz inkubierten Membranen wurden bei RT auf einem Taumelschüttler erwärmt.

- In der Zwischenzeit wurde für jede Membran 20 ml Primär-Antikörper-Lösung angesetzt. Die benutzten Primärantikörper wurden mit 1,5 % Blocking-Reagenz wie folgt verdünnt:
 - Anti-c-Fos (rabbit): 1:1000
 - Anti-Aktin (goat): 1:2000
- Jeder Antikörper wurde vor Verwendung für 1 min bei 10.000 $1/\text{min}$ zentrifugiert.
- Das 5 % Blocking-Reagenz wurde abgegossen, die Primär-Antikörper-Lösung auf die Membran gegeben und das Ganze für 1 h auf einem Taumelschüttler inkubiert.
- In der Zwischenzeit wurde die benutzte Sekundär-Antikörper-Lösung wie folgt mit 1,5 % Blocking-Reagenz verdünnt:
 - goat anti-rabbit IgG-HRP: 1:8000
 - donkey anti-goat IgG-HRP: 1:8000
 - OPN Antibody (FL-314), rabbit polyclonal IgG: 1:2000
- Nach einer Stunde wurde die Primär-Antikörper-Lösung wieder abgegossen und die Membran dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml TBST-Waschpuffer auf dem Taumelschüttler bei RT gewaschen.
- Anschließend wurden 20 ml Sekundär-Antikörper-Lösung auf die Membran gegeben und diese ebenfalls für 1 h bei RT auf dem Taumelschüttler inkubiert.
- Die Sekundär-Antikörper-Lösung wurde abgegossen und die Membran vier Mal für jeweils 10 min mit TBST-Waschpuffer auf dem Taumelschüttler gewaschen.
- Nach dem letzten Waschgang verblieb die Membran im TBST-Waschpuffer, während 20 ml Chemilumineszenz-Lösung angesetzt wurden. Dabei wurde DAS KIT SUPERSIGNAL WEST PICO CHEMILUMINESCENT SUBSTRATE verwendet. Es besteht aus zwei Lösungen A und B, die in einem Verhältnis von 1:2 gemischt werden. Die Chemilumineszenz-Lösung wurde daraufhin auf die Membran gegeben und für 5 min bei RT auf dem Taumelschüttler inkubiert.
- Nach Ablauf der 5 min Inkubationszeit wurde die Chemilumineszenz-Lösung abgegossen und die Membran mit einer Pinzette kurz zum Abtropfen auf ein Filterpapier gelegt, um anschließend in die Prospekthülle gelegt zu werden. Die Luftblasen und der Überstand der Lösung wurden mit einem weichen Papier durch Darüberstreichen aus der Prospekthülle entfernt und die Kassette wurde verschlossen, um erst wieder im Entwicklungsraum bei Dunkelheit geöffnet zu werden.

- Die Filme wurden linksbündig und oben anliegend in eine Autoradiografie-Kassette gelegt. Die Entwicklung wurde mit dem FOTOENTWICKLER CURIX 60 durchgeführt. Zunächst wurde immer erst für eine Minute belichtet. Je nach Entwicklungsergebnis wurde die Belichtungszeit dann verlängert oder verkürzt. Nach Entwicklung der Filme wurden diese beschriftet, indem die Filme, wie während der Belichtung, auf die in der Kassette befindliche PVDF-Membran gelegt wurden. Bei jedem Film wurden mit Hilfe der gefärbten Markerproteine die Proteingrößen in kDa aufgezeichnet. Alle Filme wurden so genau beschriftet, so dass jederzeit eine eindeutige Zuordnung möglich war.
- Die benutzte Membran wurde in der Prospekthülle eingeschweißt, mit Western-Blot-Nummer und dem Primär-Antikörper beschriftet und bei -20 °C eingefroren.

Entfernung der Antikörper von einer Membran („Re-Blot“)

Um eine zuvor schon mit Primär- und Sekundär-Antikörpern beschichtete PVDF-Membran wieder von diesen zu reinigen, wurde die Membran, nachdem sie aufgetaut worden war, für 5 min mit entionisiertem Wasser auf dem Taumelschüttler gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 25 min in mit Aqua dest. 1:10 verdünnter REBLOT PLUS MILD ANTIBODY STRIPPING SOLUTION auf dem Taumelschüttler bei RT inkubiert. Dann erfolgten nochmals zwei Blockierungsschritte mit 5 %iger *Blocking-Lösung* für jeweils 5min auf dem Taumelschüttler bei RT, bevor die Membran anschließend erneut mit einem Primär-Antikörper für 1 h auf dem Taumelschüttler inkubiert werden konnte.

2.2.2.4. Densitometrische Auswertung

Die quantitative Auswertung der einzelnen Proteinbanden, die auf einem Röntgenfilm nach der Entwicklung durch den Fotoentwickler erscheinen, wurde mittels des DENSITOMETERS GS700 und der zugehörigen Betreibersoftware QUANTITY ONE durchgeführt. Mit Hilfe des „*Volume Quick Guide*“ dieses Programmes und der darin enthaltenen Funktion „*Volume Rect Tool*“ konnten über die Banden und über einen nicht geschwärzten Bereich (sog. „Background“) sehr eng gleichgroße Rechtecke gelegt werden. Die „Gesamtschwärze“ innerhalb dieser Rechtecke konnte dann mit der Funktion „*Volume Analysis Report*“ durch Summierung der Einzelintensitäten der im Bildausschnitt liegenden Pixel ermittelt werden. Um ausschließen zu können, dass eventuelle Differenzen in der Proteinkonzentration der einzelnen Proben den beobachteten Unterschied im Schwärzungsgrad hervorgerufen hatten, wurden die

Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der Aktin-Detektion derselben PVDF-Membran wie folgt gegengerechnet:

$$(Ratio) \frac{c - Fos}{Aktin} = \frac{Schwärzungsgrad c - Fos}{Schwärzungsgrad Aktin}$$

Über die Detektion von Aktin wurde abgeschätzt, ob gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden und somit vergleichbare Ausgangsbedingungen geschaffen worden waren.

2.2.2.5. Quantitative Bestimmung von uPA durch ELISA-Analyse

Die uPA-Menge (urokinase-type plasminogen activator) wurde mit einem ELISA, wie bei Jänicke et al. (1994) beschrieben, durch Frau DR. RER. NAT. MARTINA VETTER (UNIVERSITÄTSKLINIKUM HALLE (SAALE), DEUTSCHLAND) in folgenden Zellen untersucht: SKOV3 c-Fos #1, SKOV3 c-Fos #6 und SKOV3 NC.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA-Isolation und photometrische Bestimmung von RNA-Konzentrationen

Die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen (in Anlehnung an Chomczynski und Sacchi (2006)) benötigt eine Reihe von aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten. Dabei werden die Zellen zuerst lysiert, der Zellinhalt in Phasen aufgetrennt, um dann die RNA zu isolieren. Diese wird mit Hilfe des QIAGEN RNEASY MIDI KIT an Säulen mehrmals aufgereinigt, indem nur RNA an die Säulen bindet, und anschließend die RNA-Konzentration und ihr Reinheitsgrad bestimmt.

Die Konzentration und der Reinheitsgrad von RNA in einer Probe lässt sich mit Hilfe des Gerätes NANODROP spektrophotometrisch bestimmen. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass UV-Strahlung einer bestimmten Wellenlänge, die für jede zu untersuchende Substanz spezifisch ist, von dieser Substanz absorbiert wird. Dabei ist die Menge der absorbierten UV-Strahlung proportional zur Menge der zu untersuchenden Substanz in dieser Probe. Im NANODROP wird die Konzentration der einzelsträngigen Ribonukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Bei einem geeichten Gerät entspricht eine bestimmte Absorption einem ganz bestimmten RNA-Gehalt. Die Reinheit einer Probe lässt sich aus dem Quotienten der gemessenen Absorption bei 260 nm und 280 nm ermitteln (siehe Formel). Dabei muss der Quotient

idealerweise zwischen 1,8 und 2,1 (abhängig von pH-Wert und Ionenstärke) liegen. Werte, die <1,8 sind lassen auf eine starke Unreinheit der Probe schließen.

$$\text{Reinheit (Nukleinsäuren)} = \frac{A_{260}}{A_{280}} \quad A: \text{Absorption bei } x \text{ nm}$$

Bei allen Ansätzen musste am Tag der RNA-Präparation die Zelldichte in den T25ern bei ca. 80 % liegen. Ebenfalls wurden vor dem Versuch alle zu benutzenden Bereiche gereinigt und sämtliche benutzte Glas- und Plastikwaren autoklaviert, um eine Zersetzung der RNA durch RNasen so weit wie möglich zu reduzieren.

- Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden durch die Hinzugabe von 2.500 µl Trizol vom Flaschenboden gelöst. Dann wurde das Zell-Lysat mehrfach resuspendiert, auf zwei sterile 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und gründlich homogenisiert.
- Zu jedem Ansatz wurden 1 µl PELLET-PAINT und 250 µl Chloroform hinzugefügt. Jede Suspension wurde dann kräftig per Hand geschüttelt und für 2 min bei RT inkubiert.
- Die Ansätze wurden für 15 min bei 4 °C und 10.000 $1/\text{min}$ zentrifugiert und danach der wässrige obere Überstand in ein frisches 2 ml-Röhrchen überführt.
- Es wurden jeweils 625 µl Isopropanol hinzugegeben und der Inhalt der Ansätze durch mehrmaliges Kippen gemischt.
- Alle Ansätze wurden für 10 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 10.000 $1/\text{min}$ zentrifugiert.
- Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, so dass nur das Sediment im Reaktionsgefäß verblieb.
- Das Sediment wurde darauf mit 1.250 µl 75 %igem Ethanol gewaschen, indem man das Ethanol langsam von oben über das Sediment laufen ließ und unten gleich wieder absaugte. Dann wurde das Sediment für ungefähr 10 min an der Luft getrocknet.
- Anschließend wurde es in 100 µl DEPC-H₂O gründlich resuspendiert und für 30 min auf Eis stehen gelassen.

Nach Ablauf der 30 min wurde die RNA mit dem QIAGEN RNEASY MIDI KIT nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

- Den 100 µl RNA-DEPC-H₂O-Lösung wurden 350 µl *RLT-Buffer* aus dem Kit, und 250 µl 100 %iges Ethanol hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann gründlich resuspendiert.
- Der nun 700 µl große Ansatz wurde auf eine Säule aus dem Kit gegeben, die Säule auf ein ebenfalls aus dem Kit stammendes 2 ml-Sammelröhrchen gesteckt und das Ganze bei 12.500 ¹/_{min} für 30 s zentrifugiert.
- Anschließend wurde der Durchfluss nochmals auf die Säule gegeben und diese wiederum bei 12.500 ¹/_{min} für 30 s zentrifugiert.
- Die Säule wurde auf ein neues 2 ml-Sammelröhrchen gesteckt, 500 µl des *RPE-Buffer* auf die Säule gegeben und diese erneut für 30 s 12.500 ¹/_{min} zentrifugiert.
- Der Durchfluss wurde verworfen, erneut 500 µl *RPE-Buffer* auf die Säule gegeben und diese nun für 2 min. bei 12.500 ¹/_{min} zentrifugiert.
- Danach wurde die Säule vorsichtig entfernt und auf ein neues 1,5 ml-Röhrchen aus dem Kit gesteckt.
- Auf die Säule wurden 25 µl RNase-freies Wasser gegeben. Die Säule wurde 1 min bei RT inkubiert und das Ganze dann bei 12.500 ¹/_{min} für 2 min zentrifugiert.
- Anschließend wurde der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und wieder für 1 min bei RT inkubiert. Danach wurde es nochmal für 2 min bei 12.500 ¹/_{min} zentrifugiert.
- Die Säule wurde dann entfernt und verworfen. Das 1,5 ml-Röhrchen wurde mit Inhalt und Datum beschriftet.

Jede RNA-Probe wurde anschließend mit dem NANODROP ND 1000 quantifiziert und die Qualität überprüft. Dabei wurden nur RNA-Proben mit einer Reinheit zwischen 1,8 und 2,1 weiterverwendet.

Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2. cDNA Microarray

Der cDNA-Microarray ermöglicht die Analyse der Genexpression. In dieser Arbeit wurde dafür das Herstellerprotokoll GENECHIP® 3' IVT EXPRESS PROTOCOL für das GENECHIP® 3' IVT EXPRESS KIT und dem GENECHIP® HUMAN GENOME U133 PLUS 2.0 ARRAY von AFFYMETRIX verwendet.

Hierbei wird mittels reverser Transkription einzelsträngige cDNA aus aus Zellen isolierter RNA synthetisiert. Diese cDNA wird in Doppelstrang-DNA umgewandelt und

von dieser „Vorlage“ wird dann, aus biotin-konjugierten Nukleotiden, sogenannte antisense-RNA (aRNA) transkribiert. Diese aRNA wird aufgereinigt, um dann nach Fragmentierung auf einem Genchip hybridisiert zu werden. Bei dieser Hybridisierung binden die aRNA Fragmente an die zu ihnen passenden Genbereiche. Diese Chips werden dann mit einer fluoreszierenden Protein-Lösung (Streptavidin-Phycoerythrin) behandelt, so dass die Proteine hochspezifisch an die biotin-konjugierten Bestandteile der aRNA binden. Anschließend werden die Chips mit Hilfe des Fluoreszenzsignals ausgewertet und die somit erhaltene Expressionsanalyse wird mit der speziellen Software GCOS 1.4 ausgewertet.

Der cDNA-Microarray wurde von KRISTIN KLÄTSCHKE aus der KLINISCHEN CHEMIE DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS HAMBURG-EPPENDORF mit der zuvor isolierten RNA aus den folgenden Zelllinien durchgeführt:

- SKOV3 NC
- SKOV3 c-Fos #1
- SKOV3 c-Fos #6

Dabei wurde nach dem Protokoll der Firma Affymetrix gearbeitet. Es wurden das GeneChip® IVT Express Kit, das GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit und das GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array verwendet.

Die genaue Durchführung ist unter folgender URL zu finden: <http://microarray.csc.mrc.ac.uk/downloads/3'%20IVT%20Express%20Manual.pdf> (Stand 23.04.2014).

Die ermittelten Daten bezüglich der einzelnen Genexpressionen wurden von Kristin Klätschke mit der Software GENECHIPOPERATIONSOFTWARE (GCOS) 1.4 unter den Bedingungen Target Value Scaling (→ Target Value: 100) ausgewertet. Es wurde die Expressionsprofile SKOV3 NC mit denen von SKOV3 c-Fos #1 beziehungsweise von SKOV3 c-Fos #6 verglichen. Hierbei wurden die einzelnen Signalintensitäten (*_Signal*) der Proben für ein bestimmtes „Probeset“ miteinander verglichen. Mit der SLR (*_Signal Log Ratio*) wurde angegeben, um welchen Faktor sich die beiden Klone in ihrer Expression im Vergleich mit dem Kontrollversuch verändert hatten. Die SLR ist der Logarithmus zur Basis 2 (\log_2). Das heißt, dass bei einer SLR von ± 1 sich die Expression um einen Faktor von ± 2 verändert hat. Somit konnten Unterschiede in der Genexpression detektiert und quantifiziert werden.

Die ausgewerteten Rohdaten wurden dann in Form einer Exceldatei zur weiteren Auswertung und Bewertung übergeben.

Die erhaltene Excel-Datenbank beinhaltete sowohl den Vergleich zwischen dem Klon SKOV3 c-Fos #1, als auch den Vergleich zwischen dem Klon SKOV3 c-Fos #6 mit der Negativkontrolle. Um die große Datenmenge überblicken und weiter verarbeiten zu können, wurde die Excel-Datenbank nach bestimmten Kriterien weiter bearbeitet. Zuerst wurde zwischen den Genen unterschieden, die eine erhöhte Expression (hochregulierte Gene) und denjenigen die eine erniedrigte Expression (herunter regulierte Gene) in den c-Fos-Klonen zeigten, und für beide eine neue Excel-Datenbank angelegt. Anschließend wurden nach den in Tabelle 17 dargestellten Kriterien die entsprechenden Probesets aus der Liste entfernt.

Tabelle 17: Systematischer Auswertungsvorgang der Expressionsprofile

Probesets wurden aus der Datenbank für die herunter regulierten-Gene entfernt, wenn...	Probesets wurden aus der Datenbank für die hochregulierten Gene entfernt, wenn...
die Signalintensität (_Signal) von SKOV3 NC < 50 war.	die Signalintensität (_Signal) von SKOV3 c-Fos #1 < 50 war.
sich in der Signaldetektion von SKOV3 NC ein A (absent) zeigte, da diese Daten dann als nicht-informativ zu werten waren.	sich in der Signaldetektion von SKOV3 c-Fos #1 oder SKOV3 c-Fos #6 ein A (absent) zeigte, da diese Daten als nicht-informativ zu werten waren.
Sich bei SKOV3 c-Fos #1 bzw. SKOV3 c-Fos #6 eine SLR von $\geq -0,9$ und $\geq -0,8$ zeigte.	Sich bei SKOV3 c-Fos #1 bzw. SKOV3 c-Fos #6 eine SLR von $\leq 0,9$ und $\leq 0,8$ zeigte.
weder Gen-Symbol, noch Gen-Titel bekannt waren.	weder Gen-Symbol, noch Gen-Titel bekannt waren.

Ganz zum Schluss wurden all diejenigen Gene, die mehrfach vorhanden waren, das heißt, über verschiedenen Probesets vertreten waren, farblich markiert, ihre Anzahl in der Datenbank in einer extra Spalte notiert und nur das Gen mit der im Durchschnitt stärksten SLR nicht entfernt.

2.2.4. Statistische Auswertung und Darstellung

Die Ergebnisse jeder Untersuchung, mit Ausnahme des c-DNA-Microarrays und der Western-Blot-Analysen, wurden mit der Statistiksoftware IBM SPSS STATISTICS VERSION 20 (IBM, Ehningen, DE) untersucht. Zum einen wurden hierbei die Versuchsergebnisse mit dem T-Test für unabhängige Stichproben und zum anderen, wenn explizit erwähnt, mit einem „linear mixed model“, korrigiert nach Bonferroni und adjustiert für multiples Testen, untersucht. Dabei wurde ein Signifikanzniveau (p-Wert) von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Die Auswertung mittels IBM SPSS STATISTICS VERSION 20 erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Christine Gräfin

zu Eulenburg aus dem INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE BIOMETRIE UND EPIDEMIOLOGIE BIOMETRIE am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Die graphische Darstellung der ausgewerteten Ergebnisse erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mit Hilfe der Software GRAPHPAD PRISM 5.0 (GraphPad Software, Californien, USA).

3. Ergebnisse

Diese Arbeit gliedert sich in drei experimentelle Teile. Im ersten Teil wurden, ausgehend von der Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3, durch Transfektion Massenkulturen mit erhöhter c-Fos-Expression (SKOV-3 c-Fos 1MK) generiert. Durch Integration des Leervektors (SKOV3 NC) wurden außerdem entsprechende Zellen mit theoretisch unveränderter c-Fos-Expression generiert. Anschließend wurden aus der Massenkultur SKOV-3 c-Fos 1MK zwei c-Fos-überexprimierende Zellklone erzeugt (SKOV3 c-Fos #1/ SKOV3 c-Fos #6).

Dann folgten im zweiten Teil die einzelnen Untersuchungen zum Proliferations-, Migrations-, Invasions- und Apoptoseverhalten der modifizierten SKOV3-Zelllinien SKOV3 c-Fos #1, SKOV3 c-Fos #6 und SKOV3 NC.

Im dritten Teil wurde ein c-DNA-Microarray durchgeführt, der anschließend auf eventuelle Zielgene von c-Fos ausgewertet wurde.

3.1. Herstellung von stabilen SKOV3-Zelllinien

In dieser Arbeit wurde als Ursprungszelllinie die Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3 verwendet, da deren Zellen von Natur aus eine geringe Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos zeigen.

3.1.1. Etablierung der beiden c-Fos überexprimierenden SKOV3-Zelllinien und der Kontrollzelllinie

Mittels stabiler Transfektion, Selektion und sich anschließender Einzelzellklonierung wurden Zellklone etabliert, die dann in Western-Blot-Analysen auf die Stärke ihrer c-Fos-Expression auf Proteinebene überprüft wurden. Als Positiv-Kontrolle für c-Fos diente die Mammakarzinom-Zelllinie MDA MB231. Die Abbildung 14 zeigt unter (A) die qualitative Auswertung der Western-Blot-Analyse. Unter (B) wird tabellarisch die quantitative Auswertung der c-Fos- und Aktin-Expression dargestellt.

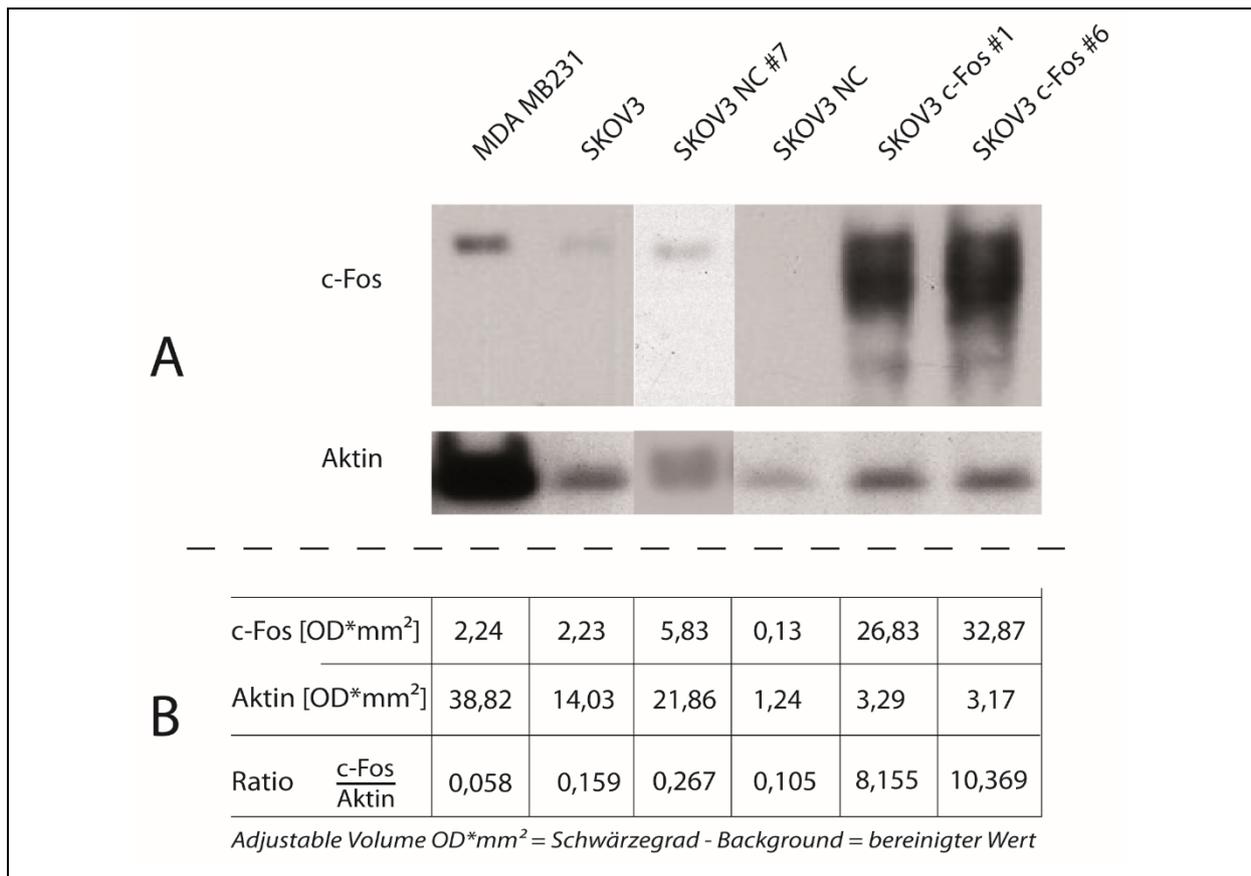


Abbildung 14: Qualitative (A) und quantitative (B) Ergebnisse der c-Fos- und Aktin-Expression auf Proteinebene der Zelllinien MDA MB231, SKOV3, SKOV3 NC, SKOV3 NC #7, SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6. (A) Die Western-Blot-Analyse zeigt eine in den SKOV3-Zelllinien annähernd gleichstarke Aktin-Expression und eine deutlich verstärkte c-Fos-Expression bei SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6. (B) Die Densitometer-Analyse zeigt bei den Zellklone SKOV3 c-Fos #1 und #6 eine um das ca. 78- bzw. 99-fache (Ratio) erhöhte c-Fos-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle SKOV3 NC.

Die Schwärzungsgrade für Aktin zeigten annähernd gleich große Konzentration in den Zelllinien SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6. C-Fos war in den beiden Zellklonen deutlich stärker als in den Zelllinien SKOV3 und SKOV3 NC exprimiert. Nach Abgleich mit den quantitativen Ergebnissen der Aktin-Detektion ergab sich bei den beiden c-Fos-überexprimierenden Zellklonen eine um das ca. 78-fache (SKOV3 c-Fos #1) bzw. das ca. 99-fache (SKOV3 c-Fos #6) erhöhte c-Fos-Proteinkonzentration im Vergleich mit der Negativkontrolle SKOV3 NC (siehe Abbildung 14 (B)).

Mit den Zellen der Ursprungszelllinie SKOV3, der Negativkontrolle SKOV3 NC (SKOV3 NC #7 nur für den Proliferationsassay) und den beiden c-Fos-überexprimierenden Klonen SKOV3 c-Fos #1 und #6 wurden die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde die Überexpression von c-Fos in einer Western-Blot-Analyse überprüft. SKOV3 NC #7 wurde nach dem Proliferations-Assay durch die neu-etablierte Negativkontrolle SKOV3 NC ersetzt, da

diese in einer unmittelbar nach dem Proliferationsassay durchgeführten Überprüfung keine stabile Transfektion mehr zeigte.

3.2. Funktionelle Analysen zur Rolle von c-Fos in der Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3

3.2.1. C-Fos schwächt die Proliferation von SKOV3-Zellen unter Nahrungskarenz

Mit Hilfe des Proliferations-Assays (siehe Kapitel 2.2.1.7) wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors c-Fos auf das Proliferationsverhalten der Ovarialkarzinom-Zelllinien SKOV3 untersucht.

Dieser Versuch wurde für alle Zelllinien sowohl in einem Medium mit 10 %igem FCS, als auch in Medium mit 1 %igem FCS durchgeführt. Die Abbildung 15 zeigt die mittlere Absorption nach 24, 48 und 72 h in Prozent, wobei der Wert zum Zeitpunkt „24 h“ als 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweiligen Doppelbestimmungen (n=6).

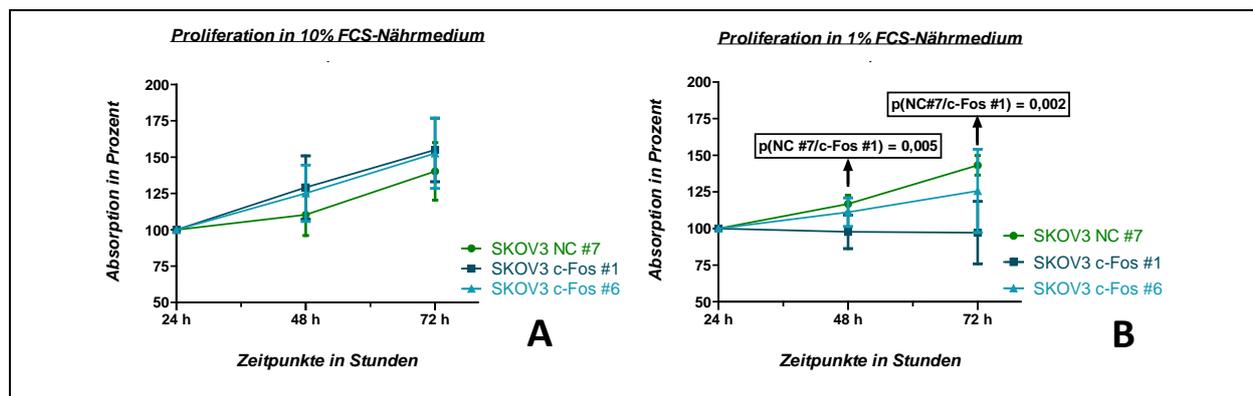


Abbildung 15: Proliferationsverhalten der c-Fos-Klone SKOV3 c-Fos #1 und #6 unter 10 %igem FCS (A) und 1 %igem FCS (B). (A) In 10 %-FCS-Nährmedium stieg die Absorption im Verlauf von 72 h bei allen drei Zelllinien an. Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen der Negativkontrolle und den c-Fos-Klonen. (B) In 1 %-FCS-Nährmedium (Nahrungskarenz) nahm die Absorption des Klons SKOV3 c-Fos #1 im Verlauf von 72 h ab. Verglichen mit der Negativkontrolle war dieser Unterschied statistisch signifikant.

Die Abbildung 15 (A) zeigt Absorptionsunterschiede zwischen der Negativkontrolle SKOV3 NC #7 und den beiden c-Fos-Klonen SKOV3 c-Fos #1 und #6 unter 10 %-FCS-Nährmedium. Die beiden Klone zeigten eine im Vergleich mit der Negativkontrolle (Absorptionsanstieg um 40,15 %) erhöhte Proliferationsrate im Verlauf von 72 h. Der Klon SKOV3 c-Fos #1 zeigte hierbei eine um 54,94 %, der Klon SKOV3 c-Fos #6 eine um 52,58 % gestiegene Absorption im Vergleich mit dem Ausgangswert. Die

Unterschiede in der Proliferation zwischen den beiden Klonen sind mit etwas mehr als 2 % gering und statistisch nicht signifikant.

Die Zellklone in 1 %-FCS-Nährmedium zeigten im Beobachtungszeitraum ein gegenüber dem Wachstumsverhalten in 10 %-FCS-Nährmedium Gegenteiliges Proliferationsverhalten. Wie in Abbildung 15 (B) dargestellt, zeigte die Negativkontrollzelllinie SKOV3 NC #7 mit einer Absorptionssteigerung von 43,1 % (72 h) das stärkste Wachstum. Für die Zelllinie SKOV3 c-Fos #6 wurde mit einem Proliferationsanstieg von 25,65 % (72 h) ein geringeres Zellwachstum im Beobachtungszeitraum als in 10 %-FCS-Nährmedium beobachtet. Die Zelllinie SKOV3 c-Fos #1 zeigte eine leichte Abnahme der Absorption von 2,84 % (72 h).

Der Unterschied in der Proliferationsrate zwischen der Negativkontrolle SKOV3 NC #7 und dem Klon SKOV3 c-Fos #1 war nach 48 h und 72 h statistisch signifikant ($p[48h]=0,005$; $p[72h]=0,002$).

Nach drei Versuchen wurde bei einer Überprüfung der transfizierten Zellen im Western-Blot festgestellt, dass die Negativkontrolle SKOV3 NC #7 eine stärkere c-Fos-Expression aufwies, als die Ursprungszelllinie. Daraufhin wurde eine neue Negativkontrolle etabliert (SKOV3 NC), die im Folgenden auch stabil blieb. Zur Kontrolle der Richtigkeit der letzten MTT-Versuche, wurde ein MTT-Versuch mit der neuen Negativkontrolle SKOV3 NC wiederholt. Diese zeigte keine Unterschiede im Vergleich mit den vorherigen drei Versuchen.

3.2.2. C-Fos verstärkt die Invasion in SKOV3-Zellen

Um eventuelle Einflüsse des Transkriptionsfaktors c-Fos auf die Invasivität von Ovarialkarzinomzelllinien zu ermitteln, wurden drei Invasions-Assays mit den drei Zelllinien SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 durchgeführt. Dabei wurden 12.500 Zellen pro Insert ausgesät und die Zellen für 24 h inkubiert. Parallel wurden Kontrollinserts, die eine mit Poren durchsetzte Membran ohne Matrigel beinhalteten, auf die gleiche Weise wie der Invasions-Assay behandelt (siehe Kapitel 2.2.1.8).

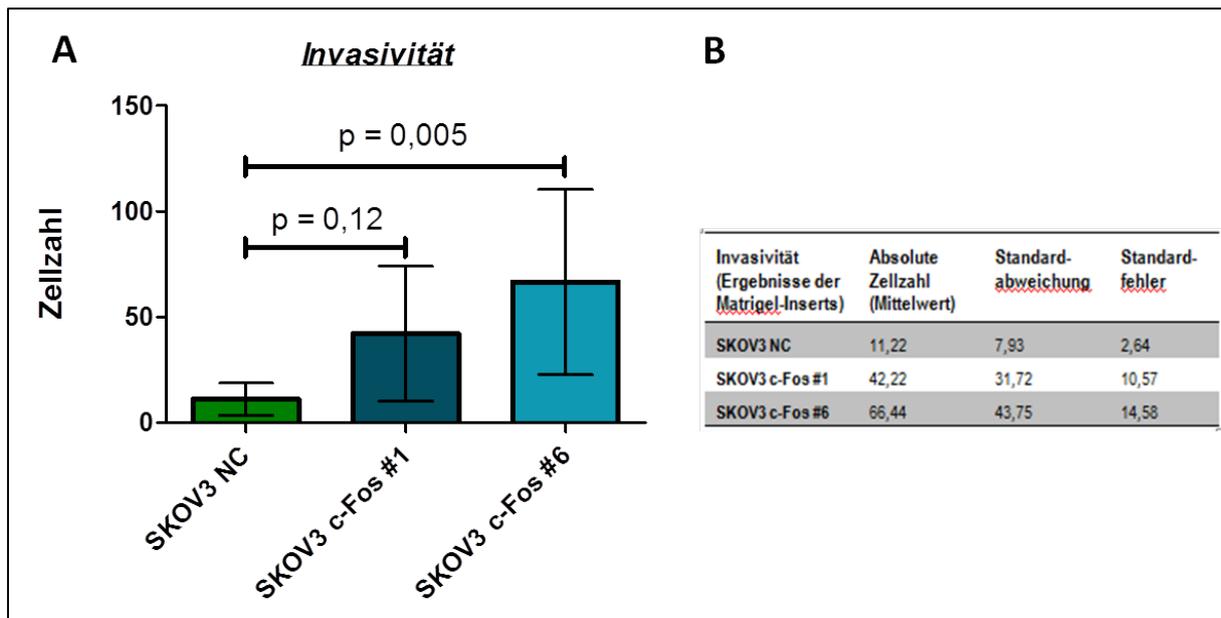


Abbildung 16: Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung für die Zelllinien SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehlern aus drei Versuchen mit jeweiliger Dreifachbestimmung ($n=9$) werden tabellarisch angegeben (B). Beide c-Fos-Klone zeigten eine um das 3,76-fache (SKOV3 c-Fos #1) bzw. um das 5,92-fache (SKOV3 c-Fos #6) signifikant stärkere Invasivität als die Negativkontrolle SKOV3 NC.

Wie Abbildung 16 zeigt, war die Invasivität der beiden c-Fos-überexprimierenden Klone im Vergleich mit der Negativkontrolle SKOV3 NC deutlich erhöht. Die Anzahl der Zellen, die die Matrigelmembran invasiv durchwanderten, war beim Klon SKOV3 c-Fos #1 im Vergleich mit der Kontrollzelllinie um etwas weniger als das 4-fache ($p = 0,012$) und beim Klon SKOV3 c-Fos #6 etwas weniger als das 6-fache ($p = 0,005$) signifikant erhöht. Der Unterschied zwischen der Kontrollzelllinie und der Zelllinie SKOV3 c-Fos #6 war auch nach der Anwendung eines „linear mixed model“ statistisch signifikant ($p = 0,002$).

Der Unterschied in der Invasivität zwischen den beiden Klonen war statistisch nicht signifikant.

Der Invasionsindex berücksichtigt neben der Durchwanderung der Zellen durch eine künstliche Basalmembran auch die eigentlich Migrationsfähigkeit der Zellen. Er wird wie folgt berechnet:
$$\text{Invasionsindex} = \frac{\text{Zellzahl Matrigel}}{\text{Zellzahl Kontrolle}} * 100$$

Er gibt somit die „reine Invasivität“ unabhängig von möglichen Veränderungen in der Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen wieder. Die Abbildung 17 stellt den mittleren Invasionsindex aller drei Zelllinien aus drei Versuchen mit Standardabweichung und Standardfehler dar.

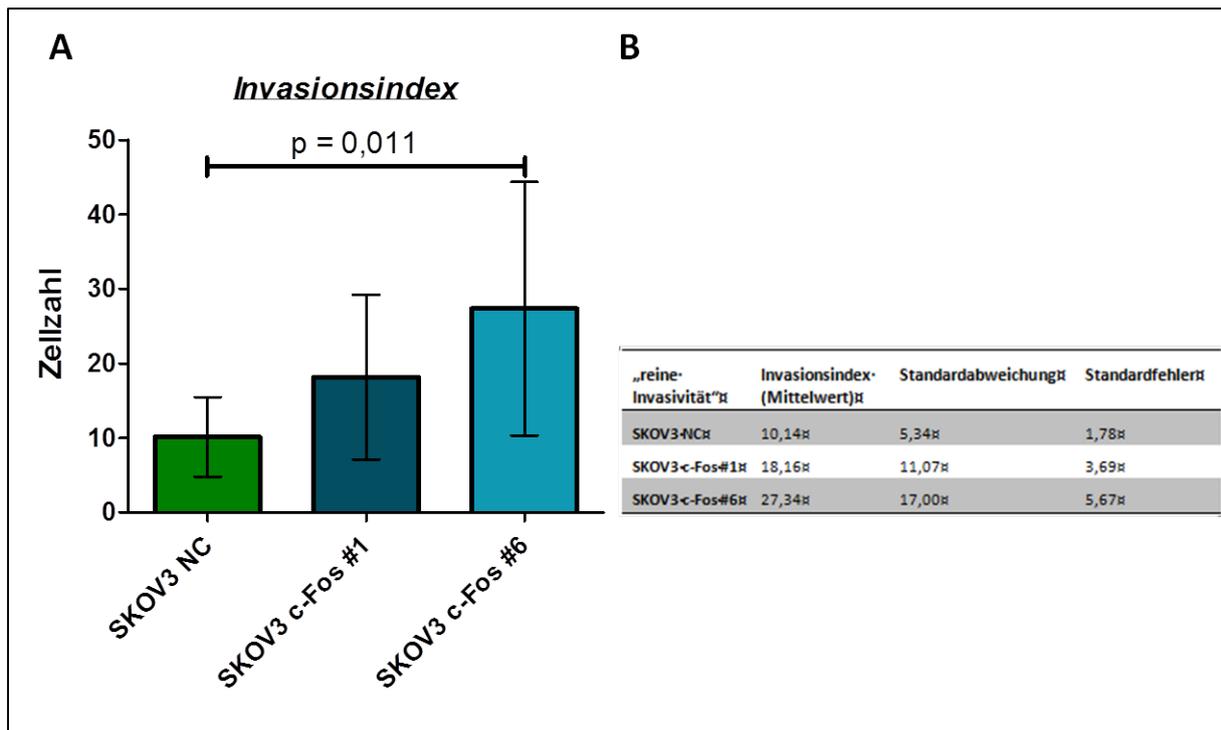


Abbildung 17: Die Grafik zeigt den mittleren Invasionsindex mit Standardabweichung für die Zelllinien SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos#1 und SKOV3 c-Fos #6 für (A). Die tabellarisch angegebenen Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler ergeben sich aus drei Versuchen mit jeweiliger Dreifachbestimmung ($n=9$)(B). Die beiden Klonzelllinien SKOV3 c-Fos #1 und #6 zeigten eine um das 1,8- bzw. 2,7-fache stärkere „reine Invasivität“, als die Kontrollzelllinie SKOV3 NC.

Die Abbildung 17 zeigt, ähnlich wie die Abbildung 16 zuvor, dass die beiden Zellklone SKOV3 c-Fos #1 und #6 eine 80-170 %ige Steigerung der „reinen Invasivität“ im Vergleich mit der Negativkontrolle aufweisen. Diese Steigerung ist für den Klon SKOV3 c-Fos #6 signifikant ($p = 0,011$).

3.2.3. C-Fos hat einen widersprüchlichen Einfluss auf das Migrationsverhalten von SKOV3-Zellen

Eventuelle Einflüsse von c-Fos auf das Migrationsverhalten von SKOV3-Ovariakarzinomzellen wurden in zwei verschiedenen Versuchen untersucht. Zum einen wurden zeitgleich zum Invasions-Assay Kontrollinserts, die nur eine mit Poren durchsetzte Membran ohne Matrigel beinhalten, mitgeführt. Dieser Migrations-Assay gibt die Migrationsfähigkeit einzelner Zellen wieder. Zum anderen wurde ein Wundheilungs-Assay durchgeführt, bei dem eine künstliche Wunde in einen konfluenten Zellrasen gerissen wird, die durch die Zellen wieder geschlossen werden muss. Die Länge der dafür benötigten Zeit im Zelllinienvergleich lässt eine Aussage über die Migrationsfähigkeit der Zellen im Zellverband zu.

c-Fos verstärkt die Migrationsfähigkeit einzelner SKOV3-Zellen

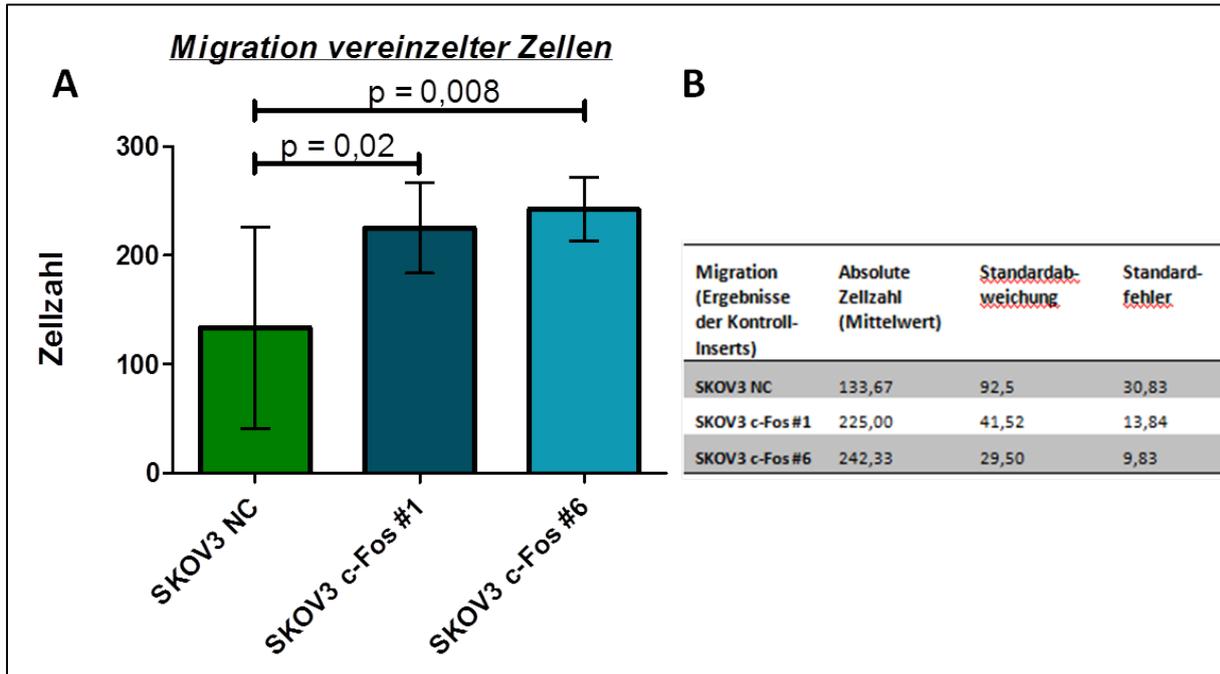


Abbildung 18: Die Grafik stellt die mittlere Zellzahl mit Standardabweichung für alle drei Zelllinien, die innerhalb von 24 h durch die Kontrollmembran migriert sind, dar (A). Die tabellarisch angegebenen Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler ergeben sich aus drei Versuchen mit jeweiliger Dreifachbestimmung (n=9)(B). Die c-Fos-überexprimierenden Zellklone zeigen eine signifikant erhöhte Migrationsrate.

Wie die Abbildung 18 zeigt, ist die Migrationsrate der beiden Klone höher als die der Negativkontrolle. Im Vergleich mit der Kontrollzelllinie SKOV3 NC war die Migrationsrate der Zellen des Klons SKOV3 c-Fos #1 um das 1,7-fache ($p = 0,02$) und die der Zelllinie SKOV3 c-Fos #6 um mehr als das 1,8-fache ($p = 0,008$) signifikant erhöht. Auch nach Untersuchung dieser Ergebnisse mittels eines „linear mixed model“ waren diese Ergebnisse statistisch signifikant: SKOV3 NC/SKOV3 c-Fos #1 ($p = 0,004$) und SKOV3 NC/SKOV3 c-Fos #6 ($p = 0,008$). Der Unterschied in der Migrationsrate zwischen den beiden c-Fos-überexprimierenden Klonen war sehr gering und statistisch nicht signifikant.

C-Fos schwächt die Migrationsfähigkeit von SKOV3-Zellen im Zellverband

Um zu untersuchen, ob sich die Beweglichkeit der Ovarialkarzinomzellen durch eine erhöhte c-Fos-Expression verändert, wurden sogenannte Wundheilungs-Assays durchgeführt. Die Abbildung 19 zeigt beispielhaft den beobachteten Vorgang des

Lückenschlusses während eines Wundheilungs-Assays (Doppelbestimmungen für jede Zelllinie).

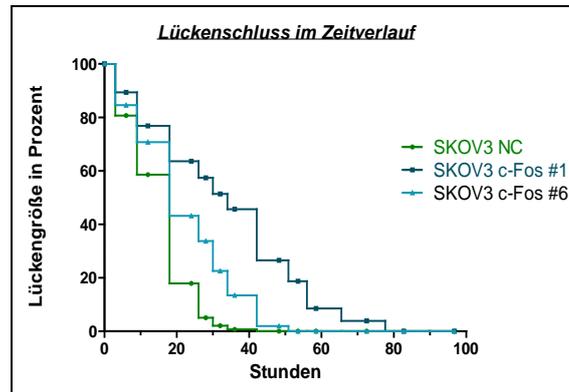


Abbildung 19: Beispielhafte Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Lückenschlusses eines der drei Wundheilungs-Assays. Für alle drei Zelllinien (jeweils Doppelbestimmungen) ist die prozentuale Größe der noch zellfreien Lückenbereiche nach bestimmten Zeitintervallen in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die beiden c-Fos-überexprimierenden Zellklone SKOV3 c-Fos #1 und #6 benötigten länger für den vollständigen Lückenschluss als die Negativkontrolle SKOV3 NC.

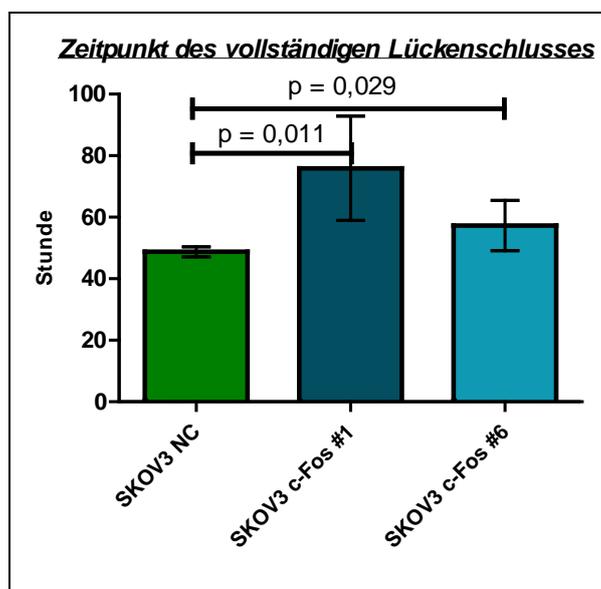


Abbildung 20: Dargestellt ist der mittlere Zeitpunkt des vollständigen Lückenschlusses mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung. Es zeigt sich ein bei den c-Fos-überexprimierenden Klonen ein signifikant verzögerter Lückenschluss.

In der Abbildung 20 zeigt sich, dass die Kontrollzelllinie SKOV3 NC eine stärkere Motilität als die beiden Klone aufweist. Im zeitlichen Vergleich schloss sich die Lücke bei den Zellen der Kontrollzelllinie deutlich früher, als bei den Klonen (siehe auch Abbildung 19). Im Mittel erfolgte der vollständige Lückenschluss beim Klon SKOV3 c-Fos #1 27 h nach dem der Kontrollzelllinie (*T-Test*: $p = 0,011$, *linear mixed model*: $p = 0,019$). Bei Klon SKOV3 c-Fos #6 lag der Lückenschluss 8,5 h nach dem der Kontrollzelllinie (*T-Test*: $p = 0,029$).

Somit zeigte sich, dass eine verstärkte c-Fos-Expression einen negativen Einfluss auf das Motilitätsverhalten von SKOV3-Ovarialkarzinomzellen im Wundheilungs-Assay hat.

3.2.4. C-Fos steigert die basale und zytotoxin-induzierte Apoptoserate in SKOV3-Zellen

Um zu untersuchen, ob eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos einen Einfluss auf den Eintritt der SKOV3-Ovarialkarzinomzellen in die Apoptose hat, wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Dafür wurden die Zellen aller drei Zelllinien auf drei verschiedene Arten (Nährmedium; 0,04 µg/ml CAMP; 0,4 µg/ml CAMP) für 16 Stunden behandelt (siehe Kapitel 2.2.1.10). Anschließend wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen mit Hilfe des Antikörpers M30 CytoDEATH ausgezählt.

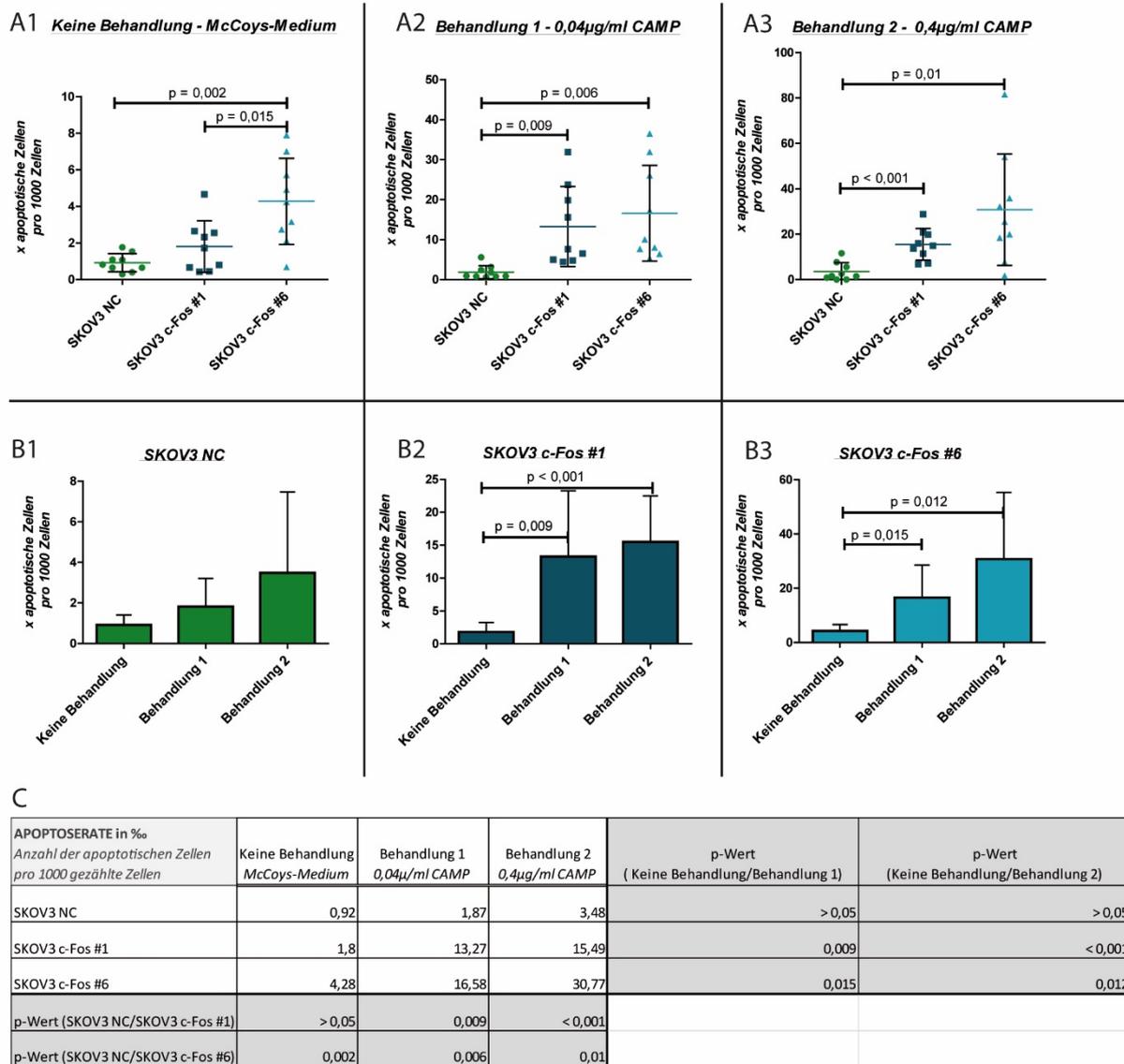


Abbildung 21: c-Fos hat einen positiven Einfluss auf die Apoptose in SKOV3-Zellen. Graphisch und tabellarisch dargestellt sind die mittlere Anzahl apoptotischer Zellen pro 1000 Gezählter mit den Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

A1-3: Vergleich der untersuchten Zelllinien SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 getrennt für jede Behandlung. Sowohl die basale, als auch die CAMP-induzierte Apoptoserate, war bei den c-Fos-überexprimierenden Klonen im Vergleich mit der Negativkontrolle statistisch signifikant erhöht.

B1-3: Vergleich der Behandlungsarten getrennt für jede Zelllinie. Alle drei Zelllinien zeigten eine steigende Apoptoserate mit steigender CAMP-Konzentration. Der Klon #6 zeigte insgesamt die höchsten Apoptoseraten, gefolgt von Klon #1.

C: Die Tabelle stellt die mittlere Anzahl apoptotischer Zellen in % aufgelistet nach Zelllinie und Art der Behandlung dar. Die grau gefärbten Bereiche geben die Ergebnisse des T-Tests für die beobachteten Unterschiede in der Zellzahl sortiert nach Behandlungsart und nach Zelllinien an.

Wie die Abbildung 21 A1-3 zeigt, war die Apoptoserate bei den c-Fos-überexprimierenden Klonen nach allen drei Behandlungen höher als bei der Kontrollzelllinie SKOV3 NC. Bei einem Vergleich der beiden Klone miteinander war die Zahl der apoptotischen Zellen beim Klon SKOV3 c-Fos #6 immer höher als beim Klon SKOV3 c-Fos #1.

Ohne Behandlung (siehe Abbildung 21: A1 und C) traten bei den beiden c-Fos-überexprimierenden Klonen mehr Zellen in die Apoptose ein als bei der Negativkontrolle SKOV3 NC. Im Mittel befanden sich bei der Zelllinie SKOV3 c-Fos #1 doppelt so viele Zellen und bei der Zelllinie SKOV3 c-Fos #6 4,6-fach so viele Zellen in der Apoptose wie bei der Kontrollzelllinie. Der beobachtete Unterschied zwischen der Negativkontrolle und dem Klon SKOV3 c-Fos #6 war statistisch signifikant ($p = 0,002$). Die unterschiedlich hohen Apoptoseraten der beiden Klone waren ebenfalls statistisch signifikant ($p = 0,015$).

Unter der Behandlung 1 (siehe Abbildung 21: A2 und C) zeigte sich ein deutlicherer Unterschied zwischen der Kontrollzelllinie und den beiden Klonen als ohne Behandlung. Im Vergleich mit der Kontrollzelllinie zeichnete sich sowohl für die Zelllinie SKOV3 c-Fos #1 ($p = 0,009$), mit einer durchschnittlich um mehr als das 7-fache erhöhten Apoptoserate, als auch für die Zelllinie SKOV3 c-Fos #6 ($p = 0,006$), mit einer um mehr als das 8,8-fache erhöhten Apoptoserate, ein statistisch signifikanter Unterschied ab.

Unter der Behandlung 2 (Abbildung 21: A3 und C) zeigte sich ebenfalls eine deutliche Steigerung der Apoptoserate bei den c-Fos-überexprimierenden Klonen im Vergleich mit der Kontrollzelllinie. Die Zahl der apoptotischen Zellen nahm im Vergleich mit der Negativkontrolle bei der Zelllinie SKOV3 c-Fos #1 ($p < 0,001$) um mehr als das 4,4-fache und bei der Zelllinie SKOV3 c-Fos #6 ($p = 0,01$) um mehr als das 8,8-fache signifikant zu. Der beobachtete Unterschied zwischen den Zelllinien SKOV3 NC und SKOV3 c-Fos #6 war auch nach einer Analyse der Ergebnisse mittels eines „linear mixed model“ statistisch signifikant ($p = 0,002$).

Vergleich man die unterschiedlichen Behandlungsarten für jede Zelllinie einzeln, so zeigten sich folgende Ergebnisse (Abbildung 21: B1-3 und C):

Bei allen drei Zelllinien zeigte sich der zytotoxische Effekt des CAMP durch Steigerung der Apoptoserate bei steigender CAMP-Konzentration. Dies war in den beiden Klonen SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 statistisch signifikant (siehe Abbildung 21: C).

Zusammenfassend betrachtet war sowohl die basale, als auch die zytotoxin-induzierte Apoptoserate in den c-Fos-überexprimierenden Klonen höher als in der Negativkontrolle.

3.2.5. C-Fos senkt die Expression der Selektin-Liganden Sialyl-Lewis X und Sialyl-Lewis A auf der Zelloberfläche von SKOV3-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Expressionsanalysen der SKOV3-Zellen mittels einer Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auf mögliche Expressionsunterschiede in der Zusammensetzung der Oberflächenstrukturen ALCAM, ICAM-1, CD44, CA19-9 und CD15s überprüft.

Alle vier untersuchten SKOV3-Zelllinien exprimierten weder ALCAM noch ICAM-1 (nicht abgebildet). Im Gegensatz dazu waren alle Zelllinien CD44-positiv (siehe Abbildung 22, C1-4). Zwischen den Zelllinien zeigte sich kein Unterschied in der CD44-Expressionsstärke.

Die Expression der Oberflächenmoleküle CA19-9 und CD15s wurde für die Zelllinien SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos#1 und SKOV3 c-Fos #6 als Histogramm in der Abbildung 22 (A1 - 4 und B1 - 4) dargestellt.

Es zeigte sich für CA19-9 (Sialyl-Lewis A) ein deutlicher Unterschied in der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (GeoMean = GM) zwischen der Negativkontrolle (GM = 112,73) bzw. der Ursprungszelllinie SKOV3 (GM = 133,48) und den beiden Klonen SKOV3 c-Fos #1 (GM = 8,73) und SKOV3 c-Fos #6 (GM = 9,13). Die GeoMean-Werte der beiden c-Fos-überexprimierenden Klone waren um mehr als das 12-fache niedriger als die der Negativkontrolle bzw. der Ursprungszelllinie SKOV3. Somit exprimierten beide c-Fos-überexprimierenden Klone deutlich weniger CA19-9 als die Negativkontrolle und die Ursprungszelllinie.

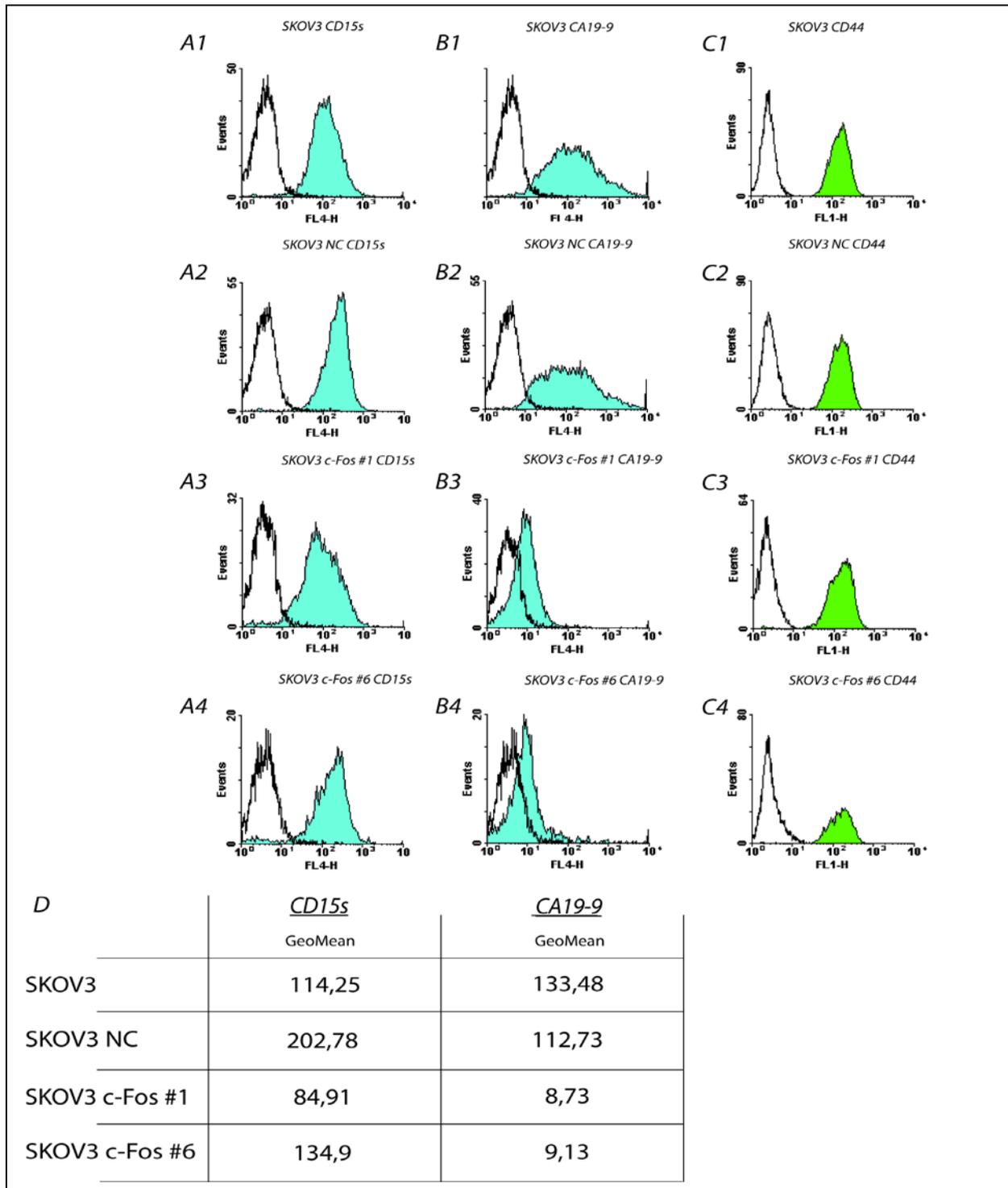


Abbildung 22: Expressionsanalysen der Oberflächenmoleküle CD15s, Ca19-9, und CD44. Dargestellt sind die Histogram-Plots von CD15s (A1-4), CA19-9 (B1-4) und CD44 (C1-4) einzeln für die Zelllinien SKOV3, SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6. Sie zeigen getrennt für jedes Oberflächenmolekül die Fluoreszenzintensitäten jeder Zelllinie im Vergleich mit der jeweiligen Isotypkontrolle. Die Tabelle zeigt für alle Zelllinien den geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten jeder Einzelzelle (GeoMean=GM) für die Oberflächenmoleküle CD15s und CA19-9 (D). Es zeigt sich, dass die c-Fos-überexprimierenden Zellklone eine schwächere CD15s-Expression und eine stark herunter regulierte Expression von CA19-9 im Vergleich mit der Kontrollzelllinie SKOV3 NC aufweisen.

Die GeoMean-Werte für CD15s (Sialyl-Lewis X) waren bei beiden Klonen niedriger als bei der Negativkontrolle (GM = 202,78). Im Vergleich zur Kontrollzelllinie zeigte der

Klon SKOV3 c-Fos #1 (GM = 84,91) eine auf weniger als die Hälfte erniedrigte und der Klon SKOV3 c-Fos #6 (GM = 134,9) eine um das 1,5-fach erniedrigte Fluoreszenzintensität. Zusätzlich zeigte sich ein Unterschied in den GeoMean-Werten zwischen der Ursprungszelllinie SKOV3 (GM = 114,25) und der Negativkontrolle. Diese Werte sprechen für eine geringere Expression von CD15s in den c-Fos-überexprimierenden Zellklonen und der Ursprungszelllinie gegenüber der Negativkontrolle.

3.2.6. Genexpressionsstudien

Durch die Isolierung der RNA aus bestimmten Zelllinien kann mittels eines c-DNA-Microarrays ein Expressionsprofil der jeweiligen Zelllinien ermittelt werden. Hierfür wurde der ARRAY HUMAN GENOME U133 PLUS 2.0 VON AFFYMETRIX verwendet.

Nach Auswertung (siehe Kapitel 2.2.3.2) der c-DNA-Microarray-Analyse konnte in den Proben der beiden Klone eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die sich möglicherweise durch eine erhöhte c-Fos-Expression verändert hatten. Um einen besseren Überblick über die betroffenen Gene zu erhalten, wurden diese nach den Annotationen des Affymetrixprogrammes in verschiedene Funktionsklassen sortiert. Da ein Gen an mehreren Funktionen beteiligt sein kann, tauchten einige Gene in dieser Auswertung mehrfach auf. Es wurden bestimmte Funktionskategorien, wie z. B. „Apoptose“, „Adhäsion“, „Transkriptionsregulation“ oder „Proliferation“ festgelegt, die unter Bezeichnung „bekannte Funktionen“ zusammengefasst wurden. Darüber hinaus gab es noch eine Kategorie „ohne bekannte Funktionen“, die all diejenigen Gene, deren Funktion bis jetzt noch unbekannt ist, zusammenfasst.

Insgesamt war das Expressionsmuster bei beiden Klonen bei 2035 Genen verändert. Es waren im Vergleich mit der Negativkontrolle 971 Gene herunter und 1064 Gene herauf reguliert (Tabelle 18). In beiden Gruppen gab es Gene, deren Funktion noch unbekannt („ohne bekannte Funktion“) ist.

Tabelle 18: Dargestellt ist die Anzahl der in den c-Fos-überexprimierten Klonen herunter bzw- hoch regulierten Gene sortiert nach den Funktionen.

Funktion	herunter regulierte Gene	hoch regulierte Gene
insgesamt	971	1064
bekannte Funktionen	732	790
ohne bekannte Funktion	239	274

Die Tabelle 19 zeigt, nach welchen Funktionsbereichen anhand der Annotationen von Affymetrix gesucht wurde und, wie viele Gene pro Funktionsbereich hoch bzw. herunter reguliert waren.

Tabelle 19: Dargestellt ist die Anzahl der in den c-Fos-überexprimierten Klone hoch bzw. herunter regulierten Gene aufgelistet nach verschiedenen Funktionen

untersuchte Funktionen	hoch regulierte Gene	herunter regulierte Gene
Angiogenese	8	28
Immunantwort	16	42
Strukturproteine	20	32
DNA-Replikation und -reparatur	21	21
Translation	24	24
RNA-Prozessierung	28	17
Proteolyse/Proteasen	29	25
Migration	29	44
Ubiquitylierung	38	15
Adhäsion	39	76
Zelldifferenzierung	48	73
Phosphorylierung	76	92
Apoptose	78	78
Signaltransduktion	95	139
Proliferation	131	131
Stoffwechsel	143	117
Transport	159	106
Transkriptionsregulation	189	117
andere/unbekannte Funktionen	358	330

Bei den hochregulierten Genen nahmen Gene, die eine Rolle in der *Transkriptionsregulation* spielen, mit 12 % den größten Anteil ein. Danach folgten auf dem zweiten und dritten Platz Gene für *Transport* und *Stoffwechsel* bzw. *Proliferation* mit 10 % bzw. 9 %. Die Plätze vier und fünf besetzten die Funktionsbereiche *Signaltransduktion* (6 %) und *Apoptose* bzw. *Phosphorylierung* (5 %). *Adhäsion* und *Migration* nahmen einen prozentualen Anteil von 3 % bzw. 2 % ein (Abbildung 23 A).

Bei den herunter regulierten Genen (Abbildung 23 B) nahmen Gene, die an der *Signaltransduktion* oder der *Proliferation* beteiligt sind, mit je 9 % den größten Anteil, dicht gefolgt von Genen mit den Funktionen *Transkriptionsregulation* und *Stoffwechsel* mit jeweils 8 %. Gene aus den Funktionsbereichen *Transport* und *Phosphorylierung* machten einen Anteil von 7 % bzw. 6 % aus. Es folgen dann die Gene mit Funktionen

bei der *Apoptose* und der *Adhäsion*, die jeweils einen Anteil von 5 % ausmachten. Ein Anteil von 3 % der herunter regulierten Gene spielen eine Rolle in der *Migration*. Gene, die Einfluss auf *Strukturproteine* haben, und Gene, die Einfluss auf die *Proteolyse* bzw. auf *Proteasen* haben, wurden zu einem Anteil von je 2 % herunterreguliert.

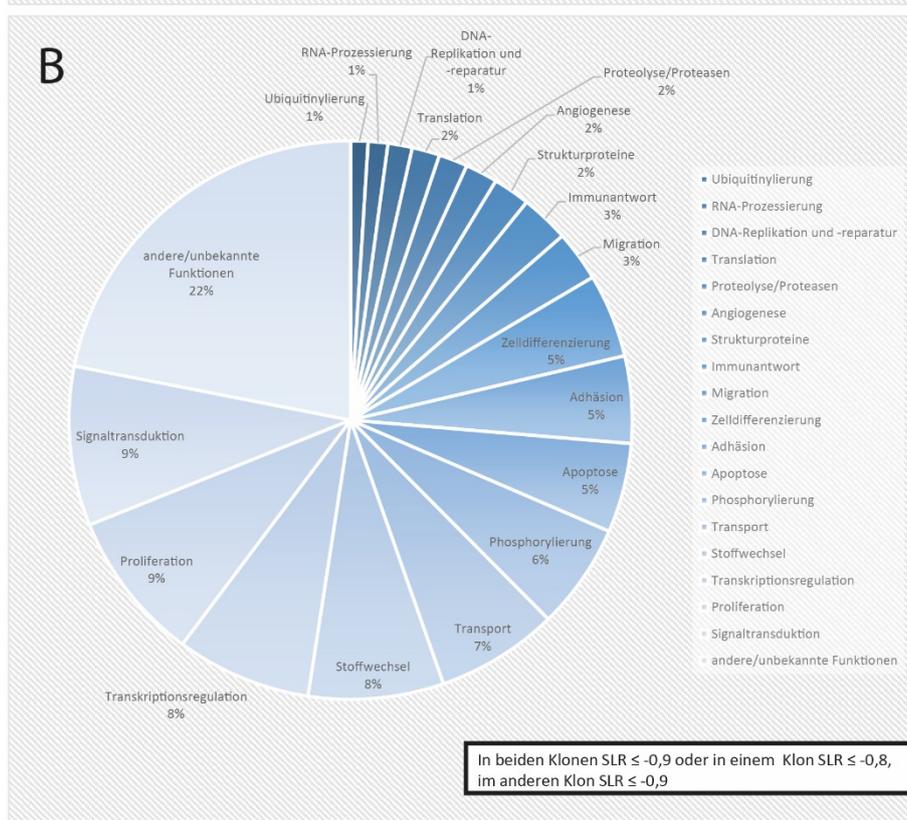
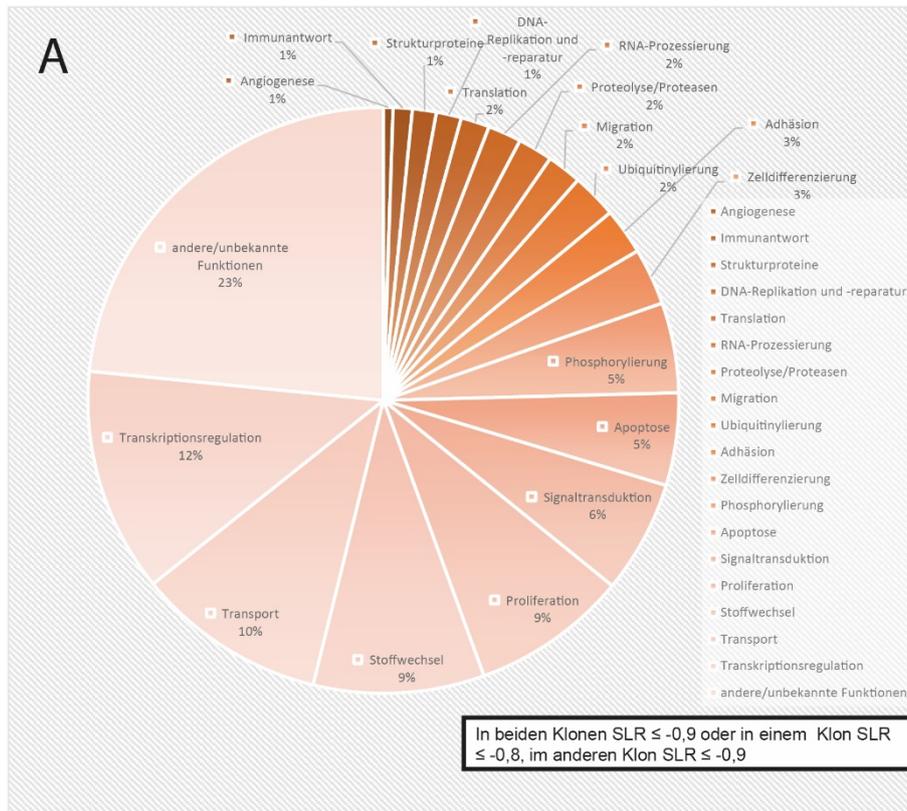


Abbildung 23: Dargestellt sind die prozentualen Anteile der in den *c-Fos*-Zellklonen regulierten Gene sortiert nach den einzelnen untersuchten Funktionsbereichen. A zeigt die Verteilung bei den hoch regulierten Genen. B zeigt die Verteilung bei den herunter regulierten Genen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, tumorsuppressive Funktionen des Transkriptionsfaktor c-Fos zu identifizieren. Daher wurden deregulierte Gene, die besonders relevant für Tumorwachstum und Metastasierung sind, näher untersucht. Tumorwachstum entsteht insbesondere durch ein Ungleichgewicht zwischen Zellteilung und Apoptose, weshalb Gene aus dem Funktionsbereich der Apoptose genauer untersucht wurden. Bei der Metastasierung sind u.a. Adhäsionsmoleküle und Zelloberflächenmoleküle (Funktionsbereich *Adhäsion*), die eine Rolle bei der Interaktion der Zellen untereinander und zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix spielen, wichtig. Proteasen, die es einer Tumorzelle ermöglichen, sich aus dem Zellverband zu lösen, haben ebenfalls einen großen Einfluss auf den Ablauf der Metastasierung (Funktionsbereich *Proteolyse*).

Die obengenannten Funktionsbereiche *Apoptose*, *Adhäsion* und *Proteolyse* wurden daher in dieser Arbeit näher untersucht. Eine Auswahl an Genen aus diesen Bereichen ist in den folgenden Tabellen 20-26 aufgelistet. Diese Gene wurden zusätzlich auf eine bereits beschriebene prognostische Relevanz in Ovarialkarzinomen oder andere Tumorentitäten hin untersucht (siehe Spalte: Referenzen).

Tabelle 20: Auswahl von Genen aus dem Funktionsbereich Apoptose, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert wurden und in den Zelllinien SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 eine verstärkte Genexpression im Vergleich mit der Kontrollzelllinie SKOV3 NC zeigten. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als SLR (Signal log ratio) angegeben.

Gensymbol	Gentitel	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #1)	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #6)	Referenzen
CLU	Clusterin	2,2	3,1	Ovarialkarzinom: (Park et al., 2008, Xie et al., 2005)
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	1,2	1,1	Ovarialkarzinom: (Cai et al., 2014, Wu et al., 2014)
PTEN//PTENP1	Phosphatase and tensin homolog//phosphatase and tensin homolog pseudogene 1	1,1	1,3	Ovarialkarzinom: (Cai et al., 2014, Wu et al., 2014)
BAG1	BCL2-associated athanogene	1	0,9	Mammakarzinom: (Kudoh et al., 2002)
BAG5	BCL2-associated athanogene 5	1,1	1	Prostatakarzinom: (Bruchmann et al., 2013)

Tabelle 21: Auswahl von Genen aus dem Funktionsbereich Apoptose, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert wurden und in den Zelllinien SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 eine verminderte Genexpression im Vergleich mit der Kontrollzelllinie SKOV3 NC zeigten. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als SLR (Signal log ratio) angegeben.

Gensymbol	Gentitel	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #1)	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #6)	Referenzen
MIF	Macrophage migration inhibitor factor	-0,8	-1	Ovarialkarzinom: (Tas et al., 2014, Agarwal et al., 2007)
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	-1	-1,2	Ovarialkarzinom: (Yang et al., 2014)
BCL2L13	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)	-1,1	-0,9	Glioblastom: (Jensen et al., 2014)
BID	BH3 interacting domain death agonist	-1,8	-2,3	Ovarialkarzinom: (Miyake et al., 2012)

Tabelle 22: Auswahl von Genen aus dem Funktionsbereich Adhäsion, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert wurden und in den Zelllinien SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 eine verstärkte Genexpression im Vergleich mit der Kontrollzelllinie SKOV3 NC zeigten. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als SLR (Signal log ratio) angegeben.

Gensymbol	Gentitel	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #1)	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #6)	Referenzen
CTNNB1	Catenin β 1	1,9	1,3	Ovarialkarzinom: (Bodnar et al., 2014, Rampias et al., 2013)
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule	1,8	2,5	Ovarialkarzinom: (Wu et al., 2012) Mammakarzinom: (Imbert et al., 2012)
ITGA4	Integrin α 4	1,5	1,5	Leukämie: (Liu et al., 2013)
CD 44	CD44 molecule	1,4	1,3	Ovarialkarzinom: (Du et al., 2013, Zou et al., 2014)
CLDN23	Claudin 23	1,4	0,9	Magenkarzinom: (Kato, 2003)
CLDN4	Claudin 4	2,8	2,5	Ovarialkarzinom: (Jacob et al., 2009, Yoshida et al., 2011)

DST	dystonin		0,9	1,6	Melanom: (Shimbo et al., 2010)
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule		2,2	2	Ovarialkarzinom: (Battista et al., 2014, Woopen et al., 2014)
FUT4	fucosyltransferase 4 (alpha fucosyltransferase,myeloidspecific)	(1,3)	1,2	1,3	Ovarialkarzinom: (Escrevente et al., 2006)
ST3GAL3	ST3 betagalactoside-alpha-2,3-sialyltransferase 3		0,9	0,9	Magenkarzinom: (Gretschel et al., 2003)
FUCA1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue		1,6	1,8	Mammakarzinom: (Milde-Langosch et al., 2014)

Tabelle 23: Auswahl von Genen aus dem Funktionsbereich Adhäsion, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert wurden und in den Zelllinien SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 eine verminderte Genexpression im Vergleich mit der Kontrollzelllinie SKOV3 NC zeigten. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als SLR (Signal log ratio) angegeben.

Gensymbol	Gentitel		SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #1)	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #6)	Referenzen
EZR	eZRin		-1,6	-1,6	Ovarialkarzinom: (Köbel et al., 2006) Osteosarkom: (Ferrari et al., 2008)
ITGB5	Integrin β5		-1	-1	Chondrosarkom: (Lin et al., 2013)
ITGB6	Integrin β6		-3,3	-3,9	Speicheldrüsentumor: (Westernoff et al., 2005)
ICAM3	Intercellular adhesion molecule 3		-1,2	-0,9	Zervixkarzinom: (Chung et al., 2005)
FUT11	fucosyltransferase 11 (1,3)fucosyltransferase)	(alpha	-1	-1,2	Nierenzellkarzinom (klarzellig): (Zodro et al., 2014)
FN1	Fibronectin 1		-2,1	-2,7	Ovarialkarzinom: (Gardi et al., 2014, Lou et al., 2013)
CLDN1	claudin 1		-2,1	-0,9	Ovarialkarzinom: (Kleinberg et al., 2008, Soini und Talvensaarimattila, 2006)

Gensymbol	Gentitel	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #1)	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #6)	Referenzen
CDH6	cadherin 6, type 2, K-cadherin(fetal kidney)	-4,4	-4,7	Nierenzellkarzinom:(Paul et al., 1997, Paul et al., 2004)
VCAN	versican	-6,3	-5,6	Ovariakarzinom: (Zhang et al., 2012)
SPP1/OPN	secret phosphoprotein 1	-8	-7,4	Ovariakarzinom: (Wang et al., 2014, Moszynski et al., 2013) Mammakarzinom: (Allan et al., 2006, Cook et al., 2005)
CHST11	Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11	-1	-0,7	Mammakarzinom: (Cooney et al., 2011)
CHST2	Carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2	-1,9	-1,7	Ovariakarzinom: (Kano et al., 2006)
CHST3	Carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3	-1,8	-1,1	Mammakarzinom: (Nordgard et al., 2008)
GCNT3	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	-2,6	-3,7	Kolonkarzinom: (González-Vallinas et al., 2015)
GALNT14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T14)	-7	-5,5	Mammakarzinom: (Huanna et al., 2014)

Tabelle 24: Auswahl von Genen aus dem Funktionsbereich Proteolyse, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert wurden und in den Zelllinien SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 eine verstärkte Genexpression im Vergleich mit der Kontrollzelllinie SKOV3 NC zeigten. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als SLR (Signal log ratio) angegeben.

Gensymbol	Gentitel	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #1)	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #6)	Referenzen
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	0,8	1,4	Ovariakarzinom: (Brun et al., 2008, Halori et al., 2012)
PRSS7	protease, serine, 7 (enterokinase)	4,1	7,1	
CTSA	cathepsin A	0,9	1	Magenkarzinom: (Buffart et al., 2009)
MGEA5	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	1	1,1	Mammakarzinom: (Krzeslak et al., 2012)

Tabelle 25: Auswahl von Genen aus dem Funktionsbereich Proteolyse, die anhand der cDNA-Microarray-Analyse identifiziert wurden und in den Zelllinien SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 eine verminderte Genexpression im Vergleich mit der Kontrollzelllinie SKOV3 NC zeigten. Die Veränderung der Expressionsstärke der einzelnen Gene ist als SLR (Signal log ratio) angegeben.

Gensymbol	Gentitel	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #1)	SLR (SKOV3 NC vs. SKOV3 c-Fos #6)	Referenzen
MMP1	Matrix metalloproteinase 1	-1,4	-1,6	Ovarialkarzinom: (Agarwal et al., 2010)
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	-3,9	-2,1	Ovarialkarzinom: (Wang et al., 2013)
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	-3	-2,8	Ovarialkarzinom: (Parker et al., 2009, Walker et al., 2007)
CTSB	cathepsin B	-1,1	-1,4	Ovarialkarzinom: (Parker et al., 2009, Ahn et al., 2010)
CTSC	cathepsin C	-1,6	-1,7	Ovarialkarzinom: (Ahn et al., 2010)
CTSH	cathepsin H	-1,2	-0,9	Kolorektales Karzinom: (Schweiger et al., 2004)

3.2.6.1. PLAU/uPA ist bei verstärkter c-Fos-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene herab reguliert

Tabelle 26: PLAU/uPA ist bei verstärkter c-Fos-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene herab reguliert. Dargestellt ist die Proteinmenge an uPA in ng/mg Gesamtprotein und die Expressionsstärke als Expressionssignal oder im Vergleich mit SKOV3 NC als Signal Log.

Zelllinie	Proteinebene Proteinmenge uPA pro Proteing Gesamtmenge (ng/mg)	RNA-Ebene	
		Expressionssignal cDNA- Microarray für PLAU	Signal Log Ratio (Logarithmus zur Basis 2)
SKOV3 NC	12,24	1932,3	
SKOV3 c-Fos #1	1,83	244,8	-3
SKOV3 c-Fos #6	2,69	366,4	-2,8

Die Tabelle 26 zeigt die Menge von PLAU/uPA auf RNA- und Proteinebene. Die Menge an PLAU bzw. uPA war auf beiden Ebenen im Vergleich mit der Negativkontrolle SKOV3 NC in den c-Fos-Klonen SKOV3 c-Fos #1 und SKOV3 c-Fos #6 deutlich verringert. Die Zellen von SKOV c-Fos #1 und #6 beinhalteten ca. 15 % bzw. 22 % der Proteinmenge, die sich in den Zellen von SKOV3 NC nachweisen lässt. Auf RNA-Ebene lag die PLAU-Menge bei ca. 13 % (SKOV3 c-Fos #1) bzw. 19 % (SKOV3 c-Fos #6) im Vergleich mit der der Negativkontrolle.

3.2.6.2. OPN ist bei verstärkter c-Fos-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene herab reguliert

Die Abbildung 24 zeigt die Menge von Osteopontin (OPN) auf RNA- (cDNA-Microarray) und Proteinebene (Western-Blot-Analyse mit Densitometerauswertung). Die Menge von OPN war auf beiden Ebenen im Vergleich mit der Negativkontrolle SKOV3 NC deutlich verringert. Beide c-Fos-Klone zeigten in der Auswertung des cDNA-Microarrays eine im Mittel um das 2^{7,4}- bis 2⁸-fache erniedrigte OPN-Expression im Vergleich mit der Negativkontrolle. Auch in der Western-Blot-Analyse war der Schwärzungsgrad der Banden der c-Fos überexprimierenden Zellklone geringer. Es zeigte sich ein um 78,62 % (SKOV3 c-Fos #1) bzw. 89,48 % (SKOV3 c-Fos#6) verringerter Schwärzungsgrad der beiden c-Fos verstärkt exprimierenden Zellklone im Vergleich mit der Negativkontrolle.

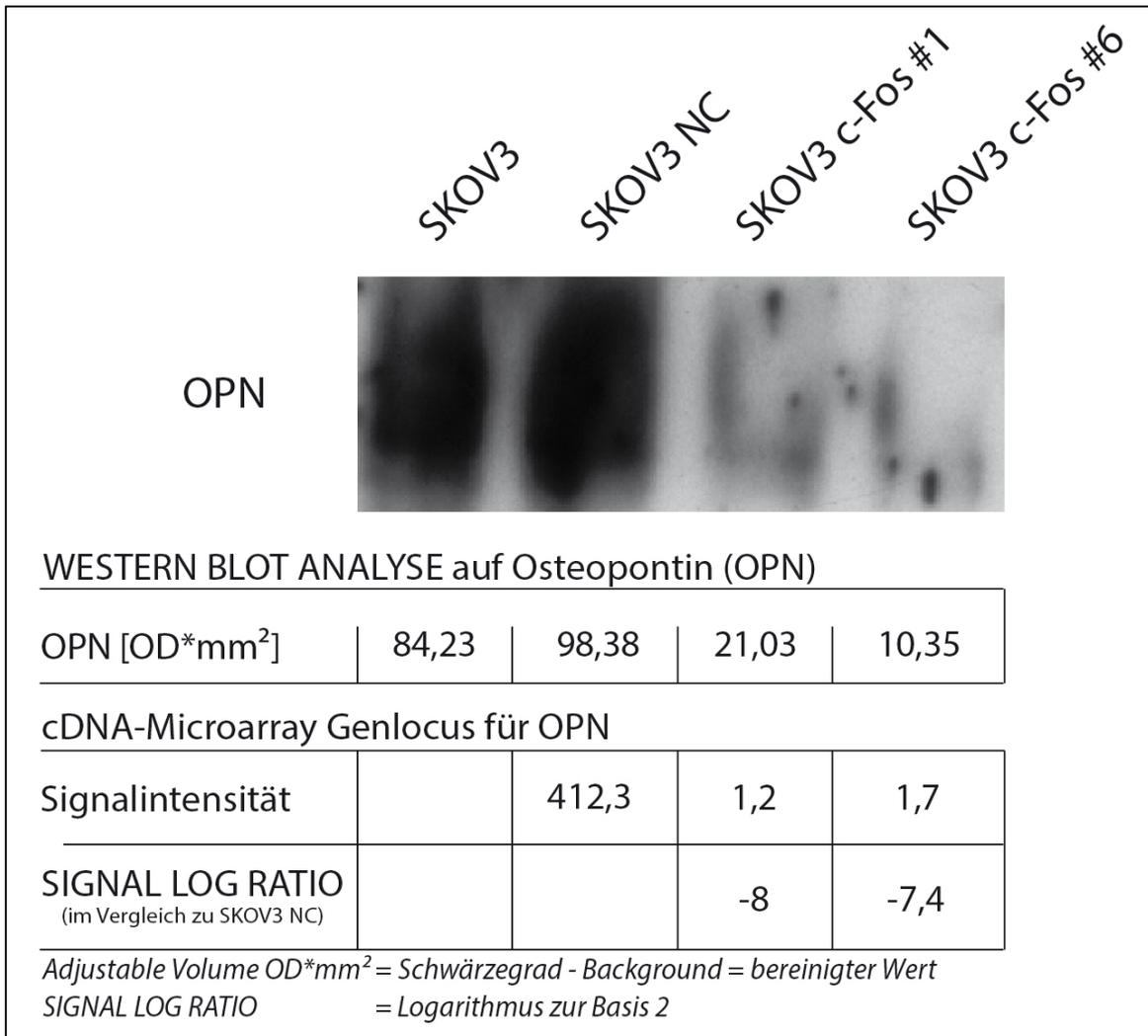


Abbildung 24: Osteopontinexpression (OPN) auf RNA- (cDNA-Microarray anhand der Signalintensität bzw. der signal log ratio) und Proteinebene (Western Blot Analyse anhand des Schwärzungsgrades quantifiziert mittels Densitometeranalyse) für die Zellen SKOV3 NC, SKOV3 c-Fos#1 und SKOV3 c-Fos#6.

4. Diskussion

Der Transkriptionsfaktor c-Fos, Bestandteil des activating-protein-1 (AP-1), war zunächst nur für seine onkogenen Funktionen bekannt. In jüngeren Studien jedoch zeigte sich, dass c-Fos auch einen tumorsuppressiven Einfluss haben kann: C-Fos inhibiert die Proliferation in neoplastischen Hepatozyten (Mikula et al., 2003) und ist herunter reguliert in Schilddrüsenkarzinomen (Liu et al., 1999). Darüber hinaus war eine geringere c-Fos-Expression in Magenkarzinomen mit einem positiven prognostischen Aussagewert assoziiert (Jin et al., 2007). Zudem spielt c-Fos eine Rolle in der Apoptose (Appierto et al., 2004).

Mahner und Kollegen (2008) entdeckten in einer retrospektiven Studie, dass c-Fos in Ovarialkarzinomen scheinbar eine protektive Funktion ausübt. Eine geringe c-Fos-Expression lag signifikant häufiger in den hochgradigen Ovarialkarzinomen (G3) vor. Daneben war eine reduzierte c-Fos-Expression mit einem signifikant kürzeren, progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert. Eine starke c-Fos-Expression stellte sich als ein günstiger prognostischer Marker heraus. In serösen Ovarialkarzinomen z.B. korrelierte ein gut differenzierter Phänotyp mit einer hohen c-Fos-Expression (Meinhold-Heerlein et al., 2005).

Bis heute ist unbekannt, wie der Transkriptionsfaktor c-Fos seinen tumorsuppressiven Einfluss in Ovarialkarzinomzellen ausübt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher, verschiedene beeinflussbare Bereiche der Tumorprogression, über die c-Fos seinen tumorsuppressiven Einfluss ausüben könnte, näher zu untersuchen.

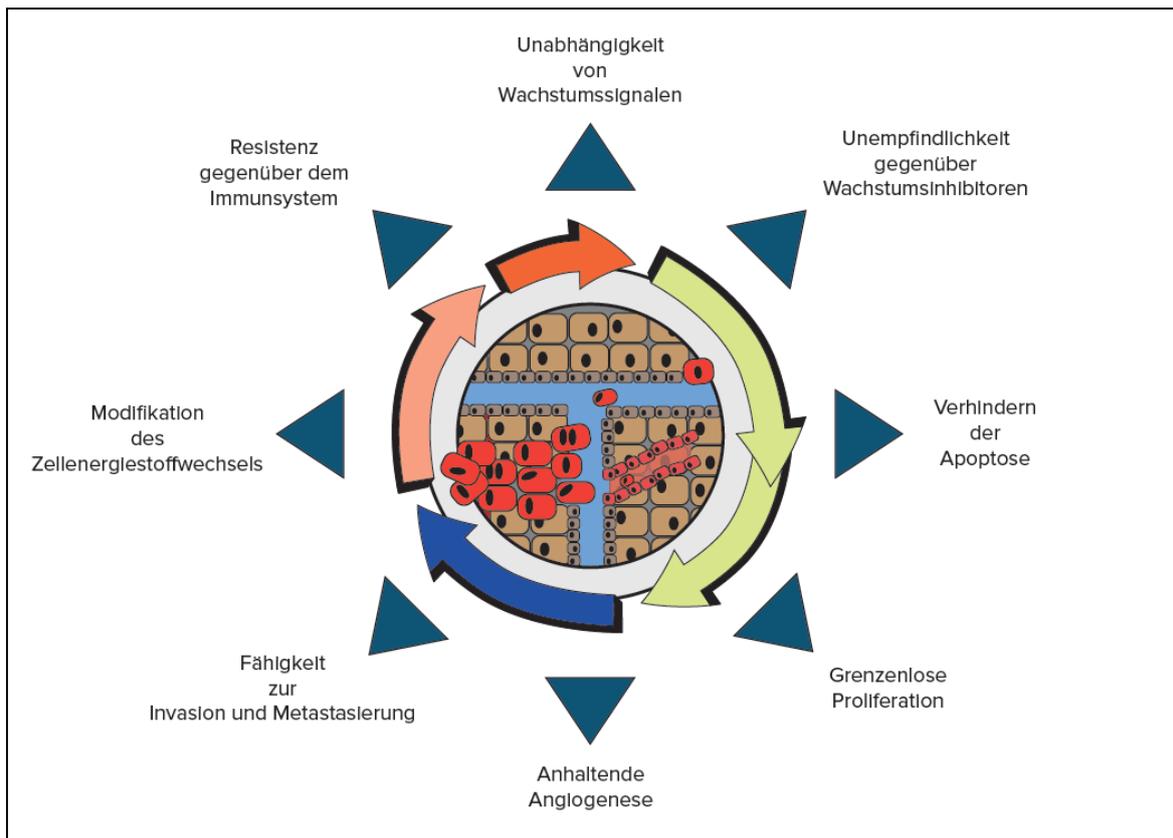


Abbildung 25: Kennzeichen der Tumorentstehung und Tumorprogression, modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2000 und 2011

Hanahan und Weinberg stellten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2000 sechs verschiedene Kennzeichen einer Tumorzelle vor, welche die Tumorentstehung und Tumorprogression beeinflussen. Natürlich kann der Prozess der Tumorprogression nicht nur auf diese sechs Möglichkeiten reduziert werden, sondern ist um ein Vielfaches komplexer, wie unter anderem das nachfolgende Review dieser Wissenschaftler HALLMARKS OF CANCER: THE NEXT GENERATION (Hanahan und Weinberg, 2011) genauer beschreibt (siehe Kapitel 1.3 und Abbildung 25). Die Wirkung auf jeden dieser genannten Aspekte kann sowohl onkogen, als auch tumorsuppressiv ausfallen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten mögliche Bereiche, über die der Transkriptionsfaktor c-Fos seine tumorsuppressive Aktivität ausüben könnte, näher charakterisiert werden. Untersucht wurden die Bereiche der Proliferation, der Invasion, der Migration, der Apoptose und der Oberflächeneigenschaften. Zudem wurden mögliche Zielgene von c-Fos identifiziert.

PROLIFERATION

Die Mitglieder der AP-1-Familie, zu denen c-Fos gehört, sind schon lange dafür bekannt, an der Regulation des Zellzyklus beteiligt zu sein und somit eine Rolle in der Zellproliferation zu spielen (Shaulian und Karin, 2001, Shaulian und Karin, 2002, Hess et al., 2004). Wie Milde-Langosch et al. (2000) publizierten, deutet der Umstand, dass der Cyclin-D1-Promotor eine AP1-Bindungsstelle (TRE) besitzt, darauf hin, dass jun/fos-Komplexe möglicherweise die Expression von zellzyklusaktivierenden Proteinen beeinflussen könnten. Auch Angel und Karin (1991) wiesen in ihrer Publikation auf einen Einfluss von c-Fos auf die Proliferation hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch ein möglicher Einfluss von c-Fos auf das Zellwachstum untersucht und führte dabei zu folgenden Ergebnissen: Die Proliferation der SKOV3-Zellen wird durch eine erhöhte c-Fos-Expression unter normalen, das heißt, vom Vertreiber empfohlenen Wachstumsbedingungen (10 % FCS) nicht signifikant verstärkt. Unter Nahrungskarenz (1 % FCS), die eher den Bedingungen in vivo entspricht, zeigt sich eine Abnahme der Proliferationsrate durch c-Fos im Vergleich mit der Negativkontrolle. Die Abnahme der Proliferation unter Nahrungskarenz konnte später auch in einer zweiten c-Fos-hochregulierten Zelllinie (OVCAR-8) in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, so dass dieses Ergebnis nicht durch eventuelle Besonderheiten der Ursprungszelllinie SKOV3 verursacht sein kann.

Eine mögliche Erklärung für den negativen Einfluss von c-Fos auf die Proliferation könnte die gleichzeitig durch c-Fos erhöhte Apoptoserate sein. C-Fos hat in SKOV3-Zellen einen signifikant positiven Einfluss sowohl auf die basale, als auch auf die durch CAMP induzierte Apoptoserate (siehe Kapitel 3.2.4). Die basale Apoptoserate lag bei der Negativkontrolle bei 0,9 ‰ (SKOV3 NC) und stieg durch eine verstärkte c-Fos-Expression auf 1,8 ‰ (SKOV3 c-Fos #1) bzw. auf 4,28 ‰ (SKOV3 c-Fos #6). Diese Steigerung ist jedoch nicht stark genug, als dass sich die geschwächte Proliferationsrate unter Nahrungskarenz vollständig durch eine verstärkte Apoptoserate erklären ließe.

Zellproliferation wird unter anderem durch Zellzyklusregulatoren, wie beispielsweise die proliferativ wirksamen Cycline oder die anti-proliferativ wirkenden Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren, reguliert. Eine veränderte Proliferation kann somit auch durch eine veränderte Expression der für die Proliferation zuständigen Gene

verursacht sein. Dies stellt eine weitere zu diskutierende Erklärung für den Einfluss von c-Fos auf die Proliferation (unter Nahrungskarenz) dar. Die Ergebnisse des cDNA-Microarrays zeigen keine Expressionsveränderungen durch c-Fos in normalem Wachstumsmedium (10 % FCS), die eindeutig in Richtung einer Stimulation oder Hemmung des Zellzyklus hindeuten. Generell sind wenige den Zellzyklus beeinflussende Faktoren reguliert. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen möglicher c-Fos Zielgene zeigte sich weder ein Schwerpunkt auf der proliferationssteigernden Seite der Cycline (Cyclin D1↓; Cyclin F↓; Cyclin A1↑), noch ein Schwerpunkt auf der proliferationsenkenden Seite der Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (CDKN1C↓; CDKN2C↑). Jedoch war PLAU, welches für das Protein uPA (urinary plasminogen activator) kodiert, um mehr als das 7-fache herunterreguliert. uPA ist bekannt dafür, eine Rolle in der Tumordinvasion und Metastasierung zu spielen (Astedt und Holmberg, 1976, Schmalfeldt et al., 1995, Kuhn et al., 1994, Jänicke et al., 1993). Fischer et al. (1998) stellten fest, dass eine verstärkte uPA-Konzentration zu einer erhöhten Proliferationsrate in Ovarialkarzinomzellen führt: Somit könnte die verstärkte c-Fos-Expression dazu beitragen, dass die PLAU-Expression und damit auch die uPA-Konzentration vermindert ist und, daraus resultierend, die Proliferationsrate unter Nahrungskarenz sinkt. Warum die Proliferationsrate ausschließlich unter Nahrungskarenz sinkt, bleibt jedoch auch hiermit unerklärt.

INVASION

Ein weiterer pathophysiologischer Mechanismus in der Tumordiversion ist die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000, Hanahan und Weinberg, 2011). Hein et al. (2009) stellten in einer Untersuchung an 56 humanen Ovarialkarzinomen (inklusive 13 Metastasen) fest, dass c-Fos in Ovarialkarzinomen eine protektive Funktion ausübt. Sie konnten nachweisen, dass die c-Fos-Expression in den Metastasen signifikant niedriger war als in den entsprechenden Primärtumoren. Wie Fidler und Kollegen (2003) beschrieben, müssen die Zellen eines Primärtumors eine Reihe von Metastasierungsschritten durchlaufen, bevor sich Metastasen etablieren können. Ein wichtiger Schritt ist hierbei die Invasion (siehe Abbildung 25). Da Hein und Kollegen eine geringere c-Fos-Expression in den metastasierten Zellen vorfanden, könnte dies im Umkehrschluss auf eine die Metastasierung hemmende Funktion von c-Fos in Ovarialkarzinomzellen hinweisen.

Somit könnte man eine geringere Invasivität der c-Fos-überexprimierenden Zellklone im Vergleich zur Negativkontrolle erwarten. Jedoch zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit eine durch c-Fos verstärkte Invasion von SKOV3-Ovarialkarzinomzellen durch Matrigel®-Membranen. Dieses Ergebnis scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen von Hein et al. (2009) zu stehen. Beim verwendeten Invasionsassay handelt es sich um ein artifizielles Testsystem, was nur eine sehr eingeschränkte, realistische Nachbildung der Bedingungen *in vivo* darstellt. Die Zellen müssen, anders als *in vivo* (Friedl und Gilmour, 2009), in diesem Versuch einzeln die künstliche Basalmembran (Matrigel®) degradieren, um sie anschließend durchwandern zu können. *In vivo* invadiert jedoch häufig nicht nur eine einzelne Zelle, sondern ein ganzer Zellverband. In einer weiteren durch unsere Arbeitsgruppe untersuchten Zelllinie (OVCAR-8) zeigte sich hingegen eine signifikant schwächere Invasivität der c-Fos-hochregulierten Zellklone. Somit könnte diese in SKOV3-Zellen durch c-Fos verstärkte Invasivität unter anderem durch eine noch unbekannte Eigenheit der SKOV3-Zelllinie bedingt sein.

Die Ergebnisse des cDNA-Microarrays liefern ebenfalls keine Erklärung für die verstärkte Invasion *in vitro*. Im Gegenteil dazu sind die meisten Proteasen bzw. deren Inhibitoren, die für die Invasivität einer Zelle bekannt sind, im entgegengesetzten Sinne reguliert: MMP1↓, MMP2↓, PLAU/uPA↓ bzw. TIMP2↑. Vor allem die erniedrigte Expression von PLAU, die zu einer geringeren Konzentration von uPA führt (siehe Kapitel 3.2.6.1) steht in einem Widerspruch zu der bei der Arbeit mit der SKOV3-Zelllinie beobachteten verstärkten Invasivität. In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine geringere Konzentration von uPA zu einer geringeren Aggressivität, ausgedrückt in geringerer Invasivität und Metastasierung, führt (Schmalfeldt et al., 1995, Kuhn et al., 1994, Jänicke et al., 1993). Somit kann der Einfluss von c-Fos auf die Invasivität nicht abschließend geklärt werden.

MIGRATION

Der Prozess der Migration wurde in der hier vorliegenden Arbeit durch zwei unterschiedliche Methoden näher untersucht: Zum einen durch die Ergebnisse der Kontrollinserts des Matrigel-Invasionsassays (Migrationsassay) und zum anderen durch den Wundheilungs-Assay. Die beiden experimentellen Ansätze ergaben widersprüchliche Ergebnisse. In dem kommerziell erhältlichen Migrationsassay (siehe Kapitel 3.2.3) zeigt sich eine durch c-Fos signifikant verstärkte Migration. Im

Wundheilungs-Assay hingegen ist die Migration in den verstärkt c-Fos exprimierenden SKOV3-Zellen geschwächt. Beide Experimente untersuchen die Migration auf unterschiedliche Art und Weise. Der Migrationsassay ist, genauso wie der Invasionsassay, ein artifizielles Testsystem. Hier müssen die Zellen einzeln, anhand eines Nährstoffgradienten (aus Medium mit 1 % FCS in Medium mit 2 % FCS), vorgefertigte Poren durchwandern. Dieser experimentelle Ansatz wird sowohl stark durch die Zellgröße und -form als auch durch die Fähigkeit der untersuchten Zellen zur Chemotaxis beeinflusst. Somit ist dieser Versuch als reiner Migrationstest nur bedingt geeignet. Im Gegensatz zum Migrationsassay erfasst der Wundheilungs-Assay auch die Migration im Zellverband. Diese entspricht viel eher der Migration im Rahmen der Metastasierung *in vivo*. Bei dieser muss sich eine Zelle oder ein Zellverband aus dem Primärtumor lösen, um ein „neues Gebiet“ zu erschließen. Zusätzlich befinden sich die Zellen konstant in einem Nährmedium mit 10 % FCS, während beim Migrationsassay ein Nährstoffgradient aufgebaut wurde.

Grundsätzlich besteht vor allem bei Untersuchungen der Migration und Invasion das Problem, diese möglichst realistisch darzustellen. Hanahan und Weinberg (2011) publizierten in ihrer Arbeit HALLMARKS OF CANCER: THE NEXT GENERATION folgendes: *„During the ensuing decade this notion has been solidified and extended, revealing that the biology of tumors can no longer be understood simply by enumerating the traits of the cancer cells but instead must encompass the contributions of the “tumor microenvironment” to tumorigenesis.“* Somit spielen nicht nur die eigentlichen transformierten Zellen eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression, sondern auch das „Tumormikromilieu“, das u.a. aus Stromazellen, extrazellulärer Matrix und Wachstumsfaktoren besteht. Dieses komplexe Zusammenspiel kann kaum nachgestellt werden. Somit lassen alle hier durchgeführten Untersuchungen zu Invasion und Migration einen nur sehr eingeschränkten Blick auf die wirklichen Umstände der Tumorprogression des Ovarialkarzinoms im Menschen zu.

APOPTOSE

Der Widerstand gegen den Eintritt in die Apoptose ist ein weiterer Mechanismus der Tumorprogression von transformierten Zellen. Frühere Studien zeigten, dass eine erhöhte c-Fos-Expression zu einer gleichzeitigen Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplexes führt (Schadendorf et al., 1996, Schaerli und Jaggi,

1998). Auch wenn die AP-1 Aktivität hauptsächlich mit Zellproliferation und Tumorprogression im Zusammenhang zu stehen scheint, so gibt es dennoch starke Hinweise, dass AP-1 auch eine wichtige Funktion im Zelltod hat (Shaulian und Karin, 2001). Schon frühere Untersuchungen weisen auf einen proapoptotischen Einfluss von c-Fos hin, unter anderem auch in Ovarialkarzinomzellen (Appierto et al., 2004, Kalra und Kumar, 2004, Zhang et al., 2007). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass c-Fos auch ohne jeglichen weiteren Einfluss zu einer Erhöhung der Apoptoserate in SKOV3-Zellen führt. Dieser Effekt wird verstärkt, sobald die Zellen durch zytotoxische Behandlung mit Camptothecin (CAMP) beeinflusst werden. Dieses Ergebnis ist in vielerlei Hinsicht interessant: Zunächst stellt sich die Frage, ob dies eine Erklärung für die geringere Proliferation der c-Fos-Klone unter 1 % FCS liefern könnte. Diese Frage wurde zuvor schon verneint. Da sich die verstärkte Apoptoserate im Promillebereich bewegt, wird sie nicht der Hauptgrund für die geringere Proliferationsrate sein. Desweiteren stellt sich die Frage, ob die steigende Apoptoserate ein möglicher Grund für das signifikant längere Überleben von Ovarialkarzinom-Patientinnen mit hoher c-Fos-Expression sein kann (Mahner et al., 2008). Möglicherweise wurde durch die platinbasierte Erstlinienchemotherapie, die die Patientinnen erhielten, die Apoptose in den Tumorzellen mit viel c-Fos verstärkt. Diese erhöhte Chemosensitivität könnte den langsameren Progress der Tumorerkrankung in diesen Fällen erklären.

Nachdem sich eine Tumorzelle an einem neuen Ort angesiedelt hat, muss sie überleben, um einen klinisch relevanten Tumor bilden zu können. Frühere Arbeiten auf diesem Gebiet stellten fest, dass der Widerstand einer Tumorzelle gegen die Apoptose nach einem erneuten Einnisten ein kritisches Ereignis im Prozess der Metastasierung sein kann. Cairns et al. (2003) postulierten, dass ein starker Zusammenhang zwischen der Metastasierungseffizienz einer Zelllinie und ihrer Fähigkeit, der Apoptose zu widerstehen, besteht. Hein et al. (2009) publizierten, dass die Expression von c-Fos in den Metastasen eines Ovarialkarzinoms geringer war als im Primärtumor. Die erhöhte Apoptoseneigung durch den Einfluss von c-Fos könnte eine Erklärung für diese Beobachtung bieten. Auch Wong et al. (2001) zeigten in ihrer Arbeit an Mäusen, dass die Effizienz der Metastasierung durch die Apoptose beeinflusst wird und stark metastatische Zelllinien eine geringere Apoptoseneigung aufweisen als schwach metastasierende Zelllinien. Desweiteren konnten sie zeigen, dass eine Bcl-2-Überexpression sowohl zu einer Inhibierung der Apoptose *in vitro* als auch zu einem

Widerstand gegen Apoptose *in vivo* führte. Darüber hinaus zeigte sich, dass diese „Apoptoseinhibition“ deutlich mehr Makrometastasen verursachte. Daraus schlossen Wong et al., dass starke Apoptose *in vivo* mit einer geringeren Metastasierung assoziiert ist.

Durch die Daten von Wong et al. (2001), Mahner et al. (2008), Hein et al. (2009) und die Ergebnisse dieser Arbeit erhärtet sich folgende Vermutung: Ein verstärkter Einfluss des Transkriptionsfaktors c-Fos führt unter anderem über eine verstärkte Apoptoserate zu einer verminderten Metastasierung. Dies wiederum ermöglicht ein längeres Überleben von Patientinnen mit einem stark c-Fos exprimierenden Ovarialkarzinom. Diese Vermutung bestätigen auch die Ergebnisse von Fidler (2003). Er publizierte, dass die meisten durch Krebs verursachten Todesfälle den Metastasen, die resistent gegen die konventionelle Therapie sind, zugeschrieben werden können. Wäre es möglich, durch neue Therapien die Zahl der Metastasen zu verringern oder ihre Entstehung zu verzögern, so könnte man das Leben dieser Patientinnen verlängern.

In unterschiedlichen Tumorarten konnten mögliche Wege der apoptotischen Wirkung von c-Fos auf Tumorzellen identifiziert werden. Kalra und Kumar (2004) beobachteten, dass in humanen hepatozellulären Karzinomzellen c-Fos ein Vermittler des c-myc-induzierten Zelltodes ist und die Apoptose durch den p38 MAP-Kinase-Weg induziert werden könnte. Ein weiterer, durch c-Fos induzierter Apoptosemechanismus könnte, wie in humanen T-Zell-Leukämie-Zelllinien beobachtet, durch den FAS-Liganden (FASL) und den „tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand“ (TNFSF10 oder TRAIL) vermittelt werden (Siegmond et al., 2001). Aber auch durch eine direkte Regulation von BRCA1, der als ein etablierter genetischer Faktor in hereditärem Brust- oder Eierstockkrebs gilt, könnte c-Fos an einer Tumorsuppression mitwirken (Graves et al., 2007). In ihrer Studie konnten Appierto und Kollegen (2004) zeigen, dass eine Fenretinide-induzierte Apoptose sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene von einer Erhöhung der c-Fos-Expression begleitet war. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten cDNA-Microarray-Analysen wurden untersucht auf durch eine starke c-Fos-Expression deregulierte Gene, die an der Apoptose beteiligt sind. Jedoch konnten in dieser Arbeit keine Expressionsveränderungen nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt), die eindeutig in Richtung einer pro- oder antiapoptotischen Stimulation durch c-Fos weisen. Es zeigte sich kein positiver oder negativer Einfluss auf folgende Gene durch eine erhöhte c-fos-Expression: MYC (c-

myc), CD95L (FASL), TNFSF10 (TRAIL) oder BRCA1 (BRCA1 Protein). Darüber hinaus war z.B. FAS in beiden c-Fos-Klonen herunterreguliert, was eher in Richtung einer antiapoptotischen Wirkung weist. Ebenso ist keine Herunterregulation von Bcl-2 festzustellen, wie man aufgrund der Daten von Wong et al. (2001) hätte vermuten können. Somit muss weiter nach dem molekularbiologischen Mechanismus gesucht werden, über den c-Fos die Apoptose verstärkt.

POTENTIELLE C-FOS-ZIELGENE

In der Untersuchung der Ergebnisse der cDNA-Microarray-Analysen erscheinen unter anderem die nachfolgenden zwei Gene als interessant: zum einen SSP1, das das Protein Osteopontin (OPN) kodiert, zum anderen PLAU, welches das Protein uPA (urinary plasminogen activator) kodiert. OPN ist während einer verstärkten c-Fos-Expression sehr stark herunterreguliert (SKOV3 c-Fos #1: 265-fach, SKOV3 c-Fos #6: 168,9-fach). Es ist ein matrizelluläres Protein, das an eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, wie unter anderem an Integrine und CD44, bindet (Anborgh et al., 2011). OPN ist in vielen Geweben exprimiert und ist in Körperflüssigkeiten ebenfalls messbar. Bekannte physiologische Aufgaben übernimmt OPN im Knochenumbau, bei der Immunantwort und während der Inflammation. Besonders interessant für diese Arbeit ist jedoch seine Expression in einer Vielzahl von unterschiedlichen Krebsarten, unter anderem auch in Karzinomen der Mamma und des Ovars, sowie seine Assoziation mit Tumorprogression, Tumordinvasion und Tumormetastasierung. Allan et al. (2006) und Cook et al. (2005) konnten an Brustkrebszellen zeigen, dass die Zugabe von OPN (rekombinant oder transfiziert) zu einer verstärkten Adhäsion und Migration der Zellen *in vitro* führte. Passend zu diesen Ergebnissen fanden Shevde und Kollegen (2006) heraus, dass ein „knockdown“ von OPN in der stark metastasierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 zu einer signifikant geringeren Invasivität, Migration und Kolonisationsfähigkeit führte. Auch im Ovarialkarzinom zeigte sich in der Arbeit von Bao et al. (2007), dass eine Zunahme von OPN mit einer extrem schlechten Prognose assoziiert war. Sie stellten die Vermutung auf, dass OPN möglicherweise mit peritonealer Metastasierung assoziiert ist. Die Menge an OPN in Metastasen könnte ihrer Meinung nach eine prognostische Rolle beim Ovarialkarzinom spielen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit unterstützen ihre Hypothese. Ein Anstieg der c-Fos-Expression führt zu einem starken Abfall der SPP1-Expression, was eine Verminderung der OPN-Konzentration

verursacht. Somit kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die erhöhte c-Fos-Expression *in vivo* über eine stark verminderte OPN-Konzentration zu weniger Metastasierung und einem längeren Gesamtüberleben der Patientinnen führt. Dies könnte ein Hinweis auf einen der protektiven Wirkungsmechanismen von c-Fos sein.

Ein ebenso interessantes Protein ist uPA. PLAU ist durch den Einfluss von c-Fos in beiden Probesets im cDNA-Microarray stark herunter reguliert, und zwar um einen Faktor von 7 bis 8. Astedt und Holmberg waren 1976 die ersten, die Hinweise auf eine Rolle des uPA-Systems bei der Tumorinvasion und Metastasierung entdeckten. Sie konnten eine hohe Freisetzung von uPA aus Ovarialkarzinom-Geweben in Kultur nachweisen (Astedt und Holmberg, 1976). Das Protein uPA wird von (Tumor-)Zellen als inaktives Proenzym (pro-uPA) synthetisiert und sezerniert. Dieses bindet an spezielle Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Nach der Bindung an den Rezeptor wird pro-uPA durch die Proteasen Plasmin und Cathepsin B aktiviert und verwandelt daraufhin Plasminogen zur Protease Plasmin. Plasmin selbst bindet ebenfalls an unterschiedliche Rezeptoren der Tumorzelloberfläche und kann daraufhin Bestandteile des Tumorstromas, wie unter anderem Fibrin, Fibronectin, Proteoglycan oder Laminin, degradieren. Darüber hinaus aktiviert es möglicherweise auch Kollagenasen, die u.a. Kollagen IV degradieren, welches ein essentieller Bestandteil der Basalmembran ist (Schmalfeldt et al., 1995, Kuhn et al., 1994, Jänicke et al., 1993, Plow et al., 1995). Somit unterstützt uPA die Zersetzung der Tumormatrix und der Basalmembran, was Invasion und Metastasierung fördert.

Im nodal-negativen Mammakarzinom gelten uPA und PAI-1 mittlerweile als prognostische Marker, die bei der Therapieentscheidung helfen. Somit können Hochrisikopatientinnen von Niedrigrisikopatientinnen unterschieden werden und Letzteren kann eine belastende Therapie erspart werden (Jänicke et al., 2001). Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologischer Onkologie (AGO) empfiehlt die Prognosefaktoren uPA und PAI-1 auf höchstem Evidenzniveau LoE 1a zur Therapieentscheidung beim nodal-negativen Mammakarzinom seit 2002. Auch die aktuelle S3-Leitlinie zur „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau“ der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) empfiehlt die Bestimmung der uPA- und PAI-Level aus dem Tumorgewebe zur weiteren Therapieentscheidung bei nodal-negativem Mammakarzinom (Kreienberg et al., 2012).

Nachdem zuvor erhöhte uPA-Konzentrationen in Ovarialkarzinom-Geweben festgestellt wurden (Pujade-Lauraine et al., 1993), zeigten Kuhn und Kollegen (1994), dass in Ovarialkarzinomen des Stadiums FIGO III die uPA- und PAI-1-Konzentrationen signifikant höher waren als in benignem Ovarialgewebe. Darüber hinaus machten sie folgende Beobachtung: Die Patientinnen, die ein geringes uPA- und PAI-1-Level im Tumorgewebe aufwiesen (uPA < 0,9ng/mg Protein und PAI-1 < 13,5ng/mg Protein), hatten eine signifikant bessere Prognose im Vergleich zu Patientinnen mit einem hohem uPA- und/oder hohem PAI-1-Level ($p = 0,01$). Schmalfeldt et al. (1995) publizierten etwas später, dass bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom in Metastasen des Omentums die uPA-Konzentration um das Vierfache und die PAI-1-Konzentration um das Doppelte stärker war als im Primärtumor. Daher stellten sie die Vermutung auf, dass erhöhte Spiegel von Bestandteilen des fibrinolytischen Systems am Ort der Metastasierung zu einem aggressiveren Potential der Krebszellen führen, indem Reimplantation und/oder die Bildung eines neuen Tumors begünstigt werden. Aktuell gibt es noch keine klinischen Studien, in denen uPA-Konzentrationen im Ovarialkarzinomgewebe zur Entscheidung zwischen verschiedenen Therapieoptionen verlässlich beitragen, wie es im nodal-negativem Mammakarzinom schon länger genutzt wird. Jedoch unterstützen die in den zuvor beschriebenen Arbeiten erhobenen Daten folgende Hypothese: Eine c-Fos-Überexpression führt zu einer verminderten Expression von PLAU und einer erniedrigten Konzentration von uPA auf Proteinebene (siehe Kapitel 3.2.6.1). Die geringere Metastasierungsrate bei einer höheren c-Fos-Expression (Mahner et al., 2008, Hein et al., 2009) lässt sich daher unter anderem auch durch eine geringere uPA-Konzentration erklären, aus der wiederum eine geringere Tumoraggressivität resultieren kann (Kuhn et al., 1994). Die in dieser Arbeit festgestellte verstärkte Invasivität im Matrigel-Invasionsassay kann jedoch nichts zur Unterstützung dieser Hypothese beitragen.

ADHÄSIONSEIGENSCHAFTEN

Eine Veränderung der Adhäsionseigenschaften kann eine weitere Erklärung für eine verringerte Metastasierung von stark c-Fos-exprimierenden Ovarialkarzinomen *in vivo* liefern. In den Ergebnissen der cDNA-Microarray-Analysen waren viele an der Adhäsion und Glykosylierung beteiligte Gene (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23), wie beispielsweise FUCA 1 (\uparrow), FUT 11 (\downarrow), GCNT3 (\downarrow) und GALNT14 (\downarrow), reguliert. FUCA1

baut u.a. Fucose-enthaltende Glykoproteine ab, die während der Adhäsion benötigt werden. FUT 11, GCNT3 und GALNT14 unterstützen die O-Glykosylierung und sind beteiligt an der Synthese von Lewis-Antigenen. Dies ist ein Hinweis auf möglicherweise durch c-Fos negativ beeinflusste Adhäsionseigenschaften. Die Anhaftung an Endothelzellen ist ein wichtiger Schritt bei der Extravasation von Tumorzellen. Daher wurde eine Durchflusszytometrie (FACS) für zwei Selektin-Liganden, die die Bindung von Tumorzellen an das Endothel sowie eventuell auch am Mesothel vermitteln können, durchgeführt. Dabei handelt es sich um Kohlenhydratstrukturen, die auch als Sialyl-Lewis X (CD15s) und Sialyl-Lewis A (CA19-9) bezeichnet werden. Die Durchflusszytometrie zeigte, dass vor allem Sialyl-Lewis A und, im geringeren Maße, auch Sialyl-Lewis X in den c-Fos-transfizierten Zellklonen herunter reguliert war. Sowohl die Ergebnisse der cDNA-Microarray-Analysen, als auch die der Durchflusszytometrie liefern Hinweise auf einen negativen Einfluss von c-Fos auf die Adhäsionsfähigkeit von Ovarialkarzinomzellen. Ist die Adhäsion an Endothelzellen geschwächt, so wird die Extravasation und damit die Ansiedlung einer Tumorzelle in einem fremden Gewebe deutlich erschwert. Auch die durch c-Fos verringerte OPN-Konzentration in den SKOV3-Zellen unterstützt die Theorie einer durch c-Fos verringerten Adhäsionsfähigkeit und einer daraus resultierenden schwächeren Metastasierungsfähigkeit. In Brustkrebszellen konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von OPN zu einer verstärkten Adhäsionsfähigkeit führt (Allan et al., 2006, Cook et al., 2005). Somit scheint die Beeinflussung der Adhäsion durch c-Fos eine der vielversprechendsten Erklärungsmöglichkeiten für die protektive Wirkung von c-Fos zu sein. Daher sollten in zukünftigen Studien, die Auswirkungen von c-Fos auf die Adhäsion auf unterschiedliche Arten in statischen und dynamischen Adhäsionsassays untersucht werden.

AUSBLICK

Die hier vorgestellten Forschungsergebnisse liefern erste Hinweise für mögliche zukünftige individualisierte Therapieregime bei Ovarialkarzinom-Patientinnen: Beispielsweise könnte durch eine medikamentös induzierte Steigerung der c-Fos-Konzentration in den Tumorzellen mit einer sich anschließenden Chemotherapie eine deutliche Reduktion der Tumormasse und ein Hinauszögern der Metastasierung

erreicht werden. Gelänge dies, so könnte dadurch eventuell ein deutlich längeres Überleben, als es derzeit der Fall ist, erreicht werden.

Fidler setzte sich mit den Vorgängen und Voraussetzungen der erfolgreichen und aggressiven Metastasierung auseinander (2003). Er postulierte, dass die Veränderung eines einzelnen Teilschrittes nicht ausreicht. Stattdessen müssten die transformierten Zellen mehrere bis alle Schritte der Metastasierung zu ihrem Vorteil verändern. „*Second, the process of metastasis is selective for cells that succeed in invasion, embolization, survival in the circulation, arrest in a distant capillary bed, and extravasation into and multiplication within the organ parenchyma. The successful metastatic cell (the 'seed') has been likened to a decathlon champion who must be proficient in all ten events, rather than just a few.*“ (Fidler, 2003). Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass die Veränderung nur einiger Schritte der Metastasierung durch c-Fos möglicherweise ausreicht, um große negative Auswirkungen auf die Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen zu erreichen. Beispielsweise scheint die durch c-Fos verstärkte Invasivität im Widerspruch zur durch c-Fos geschwächten Migration im Wundheilungs-Assay zu stehen. Dieser scheinbare Widerspruch könnte unter Berücksichtigung der *in vivo*-Daten in Hein et al. (2009) und Mahner et al. (2008), darauf hinweisen, dass c-Fos nicht alle, aber einige wichtige Schritte der Tumorprogression so beeinflusst, dass Patientinnen mit einem c-Fos hochexprimierenden Ovarialkarzinom länger überleben.

Die vorliegenden Forschungsergebnisse weisen auf folgende Einflussmöglichkeiten des Transkriptionsfaktor c-Fos auf die Metastasierung von Ovarialkarzinomen hin: Die Proliferation wird durch c-Fos unter normalem Nährstoffangebot nicht, jedoch unter Nahrungskarenz, die den Bedingungen *in vitro* eher entspricht, negativ beeinflusst. Invasion und Apoptose werden durch c-Fos verstärkt. Die Migration der SKOV3-Zellen wird durch c-Fos, je nach Umständen, positiv bzw. negativ beeinflusst. cDNA-Mikroarray-Analysen und Durchflusszytometrien liefern Hinweise, dass c-Fos die Adhäsionseigenschaften der SKOV3-Zellen negativ beeinflusst. Dennoch ist die Wirkung von c-Fos auf einige andere Schritte der Metastasierung immer noch unbekannt. Somit sollten in einer nachfolgenden Arbeit folgende eventuell durch c-Fos beeinflusste Bereiche näher untersucht werden:

- die Adhäsion der Zellen an Kollagenen, Endothel und Mesothel

- die mögliche Veränderung der Extravasation aus dem Gefäßsystem
- die Einnistung, das Überleben und die Proliferation in „fremdem“ Gewebe

Neben einer durch c-Fos verstärkten Apoptose und Hinweisen auf eine geschwächte Adhäsion *in vitro*, lassen sich mit einer stark herunter regulierten Expression der Gene für OPN und uPA, die beide mit verstärkter Invasivität und Metastasierungsfähigkeit assoziiert sind, weitere Gründe für veränderte Tumoreigenschaften aufdecken, die mit einer verstärkten c-Fos-Expression assoziiert sind. Neben weiteren Untersuchungen zu den durch c-Fos-Einfluss veränderten Adhäsionseigenschaften (siehe oben), sollten Studien zum Einfluss auf die Angiogenese, sowie auf die möglicherweise durch c-Fos veränderte Immunmodulation, durchgeführt werden. Die Angiogenese ist ein in Tumoren typischerweise veränderter Prozess, wie Hanahan und Weinberg (2000, 2011) beschrieben. Mehrere der daran beteiligten Gene zeigten in den cDNA-Microarray-Analysen eine Veränderung ihrer Expression in den c-Fos-überexprimierenden Zellklonen.

Zusätzlich sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mindestens in einer weiteren Ovarialkarzinomzelllinie mit erniedrigter oder erhöhter c-Fos-Expression durchgeführt werden, um so auszuschließen, dass die Ergebnisse eine „Besonderheit“ der SKOV3-Zelllinie darstellen. Ebenfalls sollte die Auswirkung einer künstlich erhöhten c-Fos-Expression auch *in vivo* im Mausmodell getestet werden: Durch Injektion der in dieser Arbeit etablierten c-Fos-transfizierten Zellklone sowie der Kontrolltransfektanten in Mäuse könnte der Einfluss von c-Fos auf das Überleben auch *in vivo* bestätigt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden einige der Mechanismen, über die der Transkriptionsfaktor c-Fos seine protektive Funktion in Ovarialkarzinomzellen ausübt, näher charakterisiert. Zusätzlich liefert diese Arbeit Hinweise, wie die weitere Forschung in diesem Bereich aussehen könnte. Wie Hanahan und Weinberg (2000, 2011) postulieren, stellt das genaue Verständnis der Progressionsvorgänge jeder einzelnen Tumorart auf molekularer Ebene die Grundlage für eine individualisierte Antikrebstherapie dar.

5. Zusammenfassung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Einfluss des Transkriptionsfaktors *c-Fos*, welcher ein Bestandteil des *activating-protein1 (AP-1)* ist, auf einige unterschiedliche Bereiche der Tumorprogression, d.h., die Proliferation, Invasion, Migration, Apoptose und Adhäsion, in der Ovarialkarzinom-Zelllinie *SKOV3* zu untersuchen. Frühere Studien konnten neben einer zuvor scheinbar nur tumorprogressiven Funktion auch eine tumorsuppressive Funktion nachweisen: In hochgradigen Ovarialkarzinomen bzw. in den metastatischen Zweittumoren lag signifikant weniger *c-Fos* vor, als in den niedrigmalignen Tumoren bzw. Primärtumoren. Zudem war eine reduzierte *c-Fos*-Expression mit einem signifikant verkürzten progressionsfreien und Gesamtüberleben assoziiert.

Nach erfolgreicher Etablierung einer stabil transfizierten *c-Fos*-überexprimierenden Zelllinie *SKOV3 c-Fos 1MK* erfolgte anschließend die Züchtung von Zellklonen, sowie die Etablierung einer stabil transfizierten Negativkontrolle *SKOV3 NC*. Mit den in dieser Arbeit näher beschriebenen Methoden wurde dann der mögliche Einfluss von *c-Fos* auf die oben aufgelisteten Bereiche der Tumorprogression in Ovarialkarzinomzellen weiter untersucht. Zusätzlich sollte ein möglicher Einfluss von *c-Fos* auf- RNA-Ebene mittels eines c-DNA-Microarrays untersucht werden, um eventuelle Zielgene von *c-Fos* auf Proteinebene mittels Western-Blot- oder ELISA-Verfahren zu validieren.

Ergebnisse dieser Arbeit waren eine signifikant geringere Proliferation von *SKOV3*-Zellen unter Nahrungskarenz bei einer verstärkten *c-Fos*-Expression. Die Invasivität der *c-Fos*-überexprimierenden Klone war um das 4- bis 6-fache signifikant verstärkt im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Untersuchungen zur Beeinflussung der Migration durch *c-Fos* ergaben unterschiedliche Ergebnisse: Die Migrationsfähigkeit einzelner *SKOV3*-Zellen war bei *c-Fos*-Überexpression signifikant verstärkt. Gegensätzlich dazu war die Migrationsfähigkeit von *SKOV3*-Zellen im Zellverband bei den *c-Fos*-Klonen signifikant abgeschwächt. Die Untersuchungen zum Apoptoseverhalten ergab eine erhöhte basale und zytotoxin-induzierte Apoptoserate bei den *c-Fos*-überexprimierenden Zellklonen im Vergleich mit der Negativkontrolle. Dies könnte somit auf eine durch *c-Fos* verstärkte Chemosensitivität hinweisen. Bei den Untersuchungen von bei der Adhäsion wichtigen Oberflächenstrukturen (*ALCAM*, *ICAM-1*, *CD44*, *CA19-9* und *CD15s*) zeigte sich keine Expression von *ALCAM* und

ICAM-1 in den Ursprungs-, Kontroll- und *c-Fos*-überexprimierenden Zellen. Die Expression von *CD44* war in allen Zellen gleichermaßen stark ausgeprägt. Hingegen war die Expression der Selektin-Liganden *CA19-9* und *CD15s* bei den *c-Fos*-überexprimierenden Zellklonen vermindert. Es zeigten sich somit Hinweise für eine geschwächte Adhäsion an Endothelzellen bei Zellen mit verstärkter *c-Fos*-Expression. Mit Hilfe der durchgeführten Genexpressionsstudie konnten die bei einer erhöhten *c-Fos*-Expression veränderten Gene identifiziert und auf einen möglichen Zusammenhang bezüglich der verbesserten Überlebenswahrscheinlichkeit bei Ovarialkarzinompatientinnen untersucht werden. Neben regulierten Genen aus den Bereichen Apoptose und Proteolyse konnten auch verschiedene regulierte Gene aus dem Bereich der Adhäsion und speziell der Glykosylierung identifiziert werden. Die potentiellen Zielgene *PLAU* (codiert für uPA / urinary plasminogen activator) und *SSP1* (codiert für *OPN* / *Osteopontin*) wurden auch auf Proteinebene untersucht und ergaben beide auf RNA- und Proteinebene eine Herabregulation bei den Zellen mit verstärkter *c-Fos*-Expression. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass eine verstärktes Vorkommen von *OPN* oder *uPA* mit einer schlechteren Prognose für Ovarialkarzinom-Patientinnen assoziiert ist: Somit könnten *OPN* und *uPA* protektive Wirkmechanismen von *c-Fos* sein, über die *c-Fos* seine tumorsuppressive Funktion ausübt.

Die hier vorliegenden Forschungsergebnisse zeigen Mechanismen auf, über die der Transkriptionsfaktor *c-Fos* in Ovarialkarzinomzellen seine protektive Funktion ausüben könnte. Darüber hinaus liefert diese Arbeit auch erste Hinweise auf zukünftige, individualisierte Therapieregime bei Ovarialkarzinom-Patientinnen und beschreibt, wie weitere mögliche Forschungsansätze in diesem Bereich aussehen könnten.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm	µl	Mikroliter
µm	Mikrometer	1/min	1 Umdrehung pro Minute
A.	Arteria	AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule/siehe www.genecards.org	AP-1	activating-protein-1
APC	Allophycocyanin	APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata	AT	Österreich
ATCC	American Type Culture Collection	ATF	siehe www.genecards.org
ATF-3/LRF	siehe www.genecards.org	AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
Bak	Apoptose-förderndes Mitglieder der BCL-1-Genfamilie/siehe www.genecards.org	Bax	Bcl-2-associated X protein/siehe www.genecards.org
Bcl-2	B-cell leukemia 2/siehe www.genecards.org	BE	Belgien
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor	Bid	BH3 interacting domain death agonist/siehe www.genecards.org
BRCA-1/BRCA-2	Breast Cancer 1/ Breast Cancer 2, siehe www.genecards.org	BSA	Albumin Fraktion V (bovine)
bZIP	Basic region leucine zipper	CA-125	Cancer Antigen 125
CA-15-3	Cancer Antigen 15-3	CA19-9	Sialyl-Lewis A = Carbohydrate- Antigen 19-9
CA-19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9	CA-50	Cancer Antigen 50
CA-72-4	Cancer Antigen 72-4	CAMP	Camptothecin
CD15s	Sialyl-Lewis X	CD44	Adhäsionsmolekül
Cdc25-Phosphatase	siehe www.genecards.org	CDK	Zyclin-abhängigen Kinasen /siehe www.genecards.org

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
CDKN1C	siehe www.genecards.org	CDKN2C	siehe www.genecards.org
c-Fos	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog/siehe www.genecards.org	CH	Schweiz
c-Jun, JunB, JunD	siehe www.genecards.org	CKI	CDK-Inhibitorproteine
cm	Zentimeter	CMV	Cytomegalievirus
CRE	cAMP-responsive-elements	CYFRA21-1	Cytokeratin-21-Fragment
DE	Deutschland	DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-H ₂ O
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI/siehe www.genecards.org	DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	dnmt1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1/siehe www.genecards.org
ECM	Extrazelluläre Matrix	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ErbB-2	Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2)/siehe www.genecards.org	FACS	Fluorescence activated cell sorting,
Fas	Todesrezeptor Fas = CD95 = APO-1/siehe www.genecards.org	FASL	CD95L = Fas-Ligand/siehe www.genecards.org
FBJ-MSV	Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma virus	FCS	Fetal Bovine Serum Gold
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique	FITC	Isotypkontrollen
FosB	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog B/siehe www.genecards.org	FR	Frankrch
Fra-1, Fra-2	FOS-like antigen-1, Fos-related antigen 1/siehe www.genecards.org	FUCA 1	Fucosidase, Alpha-L-1, Tissue/siehe www.genecards.org
FUT 11	fucosyltransferase 11 (alpha (1,3)fucosyltransferase)/siehe www.genecards.org	g	Gramm

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
GALNT14	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14/siehe www.genecards.org	GB	Großbritannien
GCNT3	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type/siehe www.genecards.org	GM	Geomean
h	heure	HCL	Chlorwasserstoff
HE4	Human epididymis protein 4	HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
IAP	Inhibitors of Apoptosis Proteins	ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1/siehe www.genecards.org
Ig-CAM	superfamily of cell adhesion molecules	IL-8	Interleukin 8
JDP1, JDP2	siehe www.genecards.org	JP	Japan
kDa	Kilo-Dalton	LMP-Tumoren	Low-malignant-Potency-Tumoren
mA	Milliampere	Maf	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog/siehe www.genecards.org
MAP	Mitogen-Activated Protein	MAPK11	Mitogen-activated protein kinases 11/siehe www.genecards.org
min	Minute	MK	Massenkultur
ml	Milliliter	MLH1	mutL homolog 1, siehe www.genecards.org
mm	Millimeter	MMP	Matrixmetalloproteinase/siehe www.genecards.org
MMP1	siehe www.genecards.org	MMP2	siehe www.genecards.org
MMP-9	Matrixmetalloproteinase 9 / siehe www.genecards.org	MSH2	MutS Homolog 2, siehe www.genecards.org
MUC1	siehe www.genecards.org	MYC	c-myc = Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog/siehe www.genecards.org
NGF	siehe www.genecards.org	nm	Nanometer
nm	Nanometer	OD	optical density

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
OPN	Osteopontin/siehe www.genecards.org	OT	Objektträger
OVX1	Ovarian cancer antigen X1	p	p-Wert = Signifikanzwert
P15 INK4A	siehe www.genecards.org	p16	siehe www.genecards.org
P16 INK4A	siehe www.genecards.org	P18 INK4A	siehe www.genecards.org
P19 INK4A	siehe www.genecards.org	p21 CIP	siehe www.genecards.org
p27 KIP	siehe www.genecards.org	p38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen/siehe www.genecards.org
p57 KIP	siehe www.genecards.org	PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 /siehe www.genecards.org
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin/Streptomycin	PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PLAU	plasminogen activator, urokinase/siehe www.genecards.org	PMS1/PMS2	postmeiotic segregation increased (S. Cerevisiae) 1/ Postmeiotic Segregation Increased (S. Cerevisiae) 2, siehe www.genecards.org
PSA	Prostata-spezifisches Antigen	pTNM-Klassifikation	pathologisches TNM-Stadium
PVDF	Polyvinylidenfluorid	Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure	RNasen	Ribonukleasen
RT	Raumtemperatur	s	Sekunde
Scr	kurz für Sarcoma/ proto-oncogenic tyrosine kinase	SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel	SLR	Signal Log Ratio
Smac	Second-mitochondria derived activator of caspases	SSP1	secret phosphoprotein 1/siehe www.genecards.org
STAT3	siehe www.genecards.org	Std.	Stunde
T25er	T25cm ² -Zellkulturflaschen	T75er	T75cm ² -Zellkulturflaschen
TAD	transaktivierende Domäne	TEMED	Tetramethylethyldiamine

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1/siehe www.genecards.org	TIMP2	siehe www.genecards.org
TNFR-1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor -1/siehe www.genecards.org	TNFSF10	siehe www.genecards.org
TNM-System	Tumor Nodes Metastasen -System	TP53	Tumor Protein p53, siehe www.genecards.org
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	TRE	TPA-responsive-elements
UICC	Union Internationale Contre le Cancer	UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
uPA	PLAU/Plasminogenaktivators vom Urokinase-Typ/siehe www.genecards.org	uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPA	Urokinase-type plasminogen activator /siehe www.genecards.org	USA	United States of America
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung	V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, siehe www.genecards.org	WHO	World Health Organisation

7. Literaturverzeichnis

- AGARWAL, A., TRESSEL, S. L., KAIMAL, R., BALLA, M., LAM, F. H., COVIC, L. & KULIOPULOS, A. 2010. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Res*, 70, 5880-90.
- AGARWAL, R., WHANG, D. H., ALVERO, A. B., VISINTIN, I., LAI, Y., SEGAL, E. A., SCHWARTZ, P., WARD, D., RUTHERFORD, T. & MOR, G. 2007. Macrophage migration inhibitory factor expression in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 196, 348.e1-5.
- AHN, S. E., CHOI, J. W., RENGARAJ, D., SEO, H. W., LIM, W., HAN, J. Y. & SONG, G. 2010. Increased expression of cysteine cathepsins in ovarian tissue from chickens with ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 100.
- ALBANESE, C., D'AMICO, M., REUTENS, A. T., FU, M., WATANABE, G., LEE, R. J., KITSIS, R. N., HENGLEIN, B., AVANTAGGIATI, M., SOMASUNDARAM, K., THIMMAPAYA, B. & PESTELL, R. G. 1999. Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J Biol Chem*, 274, 34186-95.
- ALBINI, A., IWAMOTO, Y., KLEINMAN, H. K., MARTIN, G. R., AARONSON, S. A., KOZLOWSKI, J. M. & MCEWAN, R. N. 1987. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*, 47, 3239-45.
- ALLAN, A. L., GEORGE, R., VANTYGHEM, S. A., LEE, M. W., HODGSON, N. C., ENGEL, C. J., HOLLIDAY, R. L., GIRVAN, D. P., SCOTT, L. A., POSTENKA, C. O., AL-KATIB, W., STITT, L. W., UEDE, T., CHAMBERS, A. F. & TUCK, A. B. 2006. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer. *Am J Pathol*, 169, 233-46.
- ANBORGH, P. H., MUTRIE, J. C., TUCK, A. B. & CHAMBERS, A. F. 2011. Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal*, 5, 111-22.
- ANGEL, P., IMAGAWA, M., CHIU, R., STEIN, B., IMBRA, R. J., RAHMSDORF, H. J., JONAT, C., HERRLICH, P. & KARIN, M. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, 49, 729-39.
- ANGEL, P. & KARIN, M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072, 129-57.
- APLIN, A. E., HOWE, A., ALAHARI, S. K. & JULIANO, R. L. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, 50, 197-263.
- APPIERTO, V., VILLANI, M. G., CAVADINI, E., LOTAN, R., VINSON, C. & FORMELLI, F. 2004. Involvement of c-Fos in fenretinide-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Cell Death Differ*, 11, 270-9.
- ASTEDT, B. & HOLMBERG, L. 1976. Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature*, 261, 595-7.

- BAKIN, A. V. & CURRAN, T. 1999. Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science*, 283, 387-90.
- BAKIRI, L., LALLEMAND, D., BOSSY-WETZEL, E. & YANIV, M. 2000. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J*, 19, 2056-68.
- 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, 545-50.
- BAO, L. H., SAKAGUCHI, H., FUJIMOTO, J. & TAMAYA, T. 2007. Osteopontin in metastatic lesions as a prognostic marker in ovarian cancers. *J Biomed Sci*, 14, 373-81.
- BARTHEL, S. R., GAVINO, J. D., DESCHENY, L. & DIMITROFF, C. J. 2007. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 11, 1473-91.
- BAST, R. C. 2003. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol*, 21, 200s-205s.
- BAST, R. C., BREWER, M., ZOU, C., HERNANDEZ, M. A., DALEY, M., OZOLS, R., LU, K., LU, Z., BADGWELL, D., MILLS, G. B., SKATES, S., ZHANG, Z., CHAN, D., LOKSHIN, A. & YU, Y. 2007. Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? *Recent Results Cancer Res*, 174, 91-100.
- BATTISTA, M. J., COTARELO, C., JAKOBI, S., STEETSKAMP, J., MAKRIS, G., SICKING, I., WEYER, V. & SCHMIDT, M. 2014. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule protein is associated with favorable prognosis in an unselected cohort of ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140, 1097-102.
- BODNAR, L., STANCZAK, A., CIERNIAK, S., SMOTER, M., CICHOWICZ, M., KOZŁOWSKI, W., SZCZYLIK, C., WIECZOREK, M. & LAMPARSKA-PRZYBYSZ, M. 2014. Wnt/ β -catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 7, 16.
- BOECKER, W., HEITZ, P. U., AGUZZI, A., DENK, H. & MOCH, H. 2008. *Pathologie*, Elsevier, Urban & Fischer.
- BOGENRIEDER, T. & HERLYN, M. 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*, 22, 6524-36.
- BRAICU, E. I., FOTOPOULOU, C., VAN GORP, T., RICHTER, R., CHEKEROV, R., HALL, C., BUTZ, H., CASTILLO-TONG, D. C., MAHNER, S., ZEILLINGER, R., CONCIN, N., VERGOTE, I. & SEHOULI, J. 2012. Preoperative HE4 expression in plasma predicts surgical outcome in primary ovarian cancer patients: Results from the OVCAD study. *Gynecol Oncol*.
- BRUCHMANN, A., ROLLER, C., WALTHER, T. V., SCHÄFER, G., LEHMUSVAARA, S., VISAKORPI, T., KLOCKER, H., CATO, A. C. & MADDALO, D. 2013. Bcl-2 associated athanogene 5 (Bag5) is overexpressed in prostate cancer and inhibits ER-stress induced apoptosis. *BMC Cancer*, 13, 96.

- BRUN, J. L., CORTEZ, A., COMMO, F., UZAN, S., ROUZIER, R. & DARAÏ, E. 2008. Serous and mucinous ovarian tumors express different profiles of MMP-2, -7, -9, MT1-MMP, and TIMP-1 and -2. *Int J Oncol*, 33, 1239-46.
- BUFFART, T. E., TIJSSEN, M., EL-BCHIRI, J., DUVAL, A., VAN DE WIEL, M. A., YLSTRA, B., MEIJER, G. A. & CARVALHO, B. 2009. NMD inhibition fails to identify tumour suppressor genes in microsatellite stable gastric cancer cell lines. *BMC Med Genomics*, 2, 39.
- BÜHLING, K. J., LEPENIES, J., WITT, K. & SEIFFERT, K. 2004. *Allgemeine und spezielle Pathologie*, München, Bühling, Kai Joachim, Lepenies, Julia, Witt, Karsten.
- CADRON, I., VAN GORP, T., TIMMERMAN, D., AMANT, F., WAELKENS, E. & VERGOTE, I. 2009. Application of proteomics in ovarian cancer: which sample should be used? *Gynecol Oncol*, 115, 497-503.
- CAI, J., XU, L., TANG, H., YANG, Q., YI, X., FANG, Y., ZHU, Y. & WANG, Z. 2014. The Role of the PTEN/PI3K/Akt Pathway on Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *Oncologist*, 19, 528-35.
- CAIRNS, R. A., KHOKHA, R. & HILL, R. P. 2003. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med*, 3, 659-71.
- CAVALLARO, U. & CHRISTOFORI, G. 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta*, 1552, 39-45.
- CHAMBERS, A. F. & MATRISIAN, L. M. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1260-70.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1, 581-5.
- CHUNG, Y. M., KIM, B. G., PARK, C. S., HUH, S. J., KIM, J., PARK, J. K., CHO, S. M., KIM, B. S., KIM, J. S., YOO, Y. D. & BAE, D. S. 2005. Increased expression of ICAM-3 is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Int J Cancer*, 117, 194-201.
- COOK, A. C., TUCK, A. B., MCCARTHY, S., TURNER, J. G., IRBY, R. B., BLOOM, G. C., YEATMAN, T. J. & CHAMBERS, A. F. 2005. Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six "hallmarks of cancer" in a model of breast cancer progression. *Mol Carcinog*, 43, 225-36.
- COONEY, C. A., JOUSHEGHANY, F., YAO-BORENGASSER, A., PHANAVANH, B., GOMES, T., KIEBER-EMMONS, A. M., SIEGEL, E. R., SUVA, L. J., FERRONE, S., KIEBER-EMMONS, T. & MONZAVI-KARBASSI, B. 2011. Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: a role for CSPG4 and CHST11 gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 13, R58.
- COUSSENS, L. M. & WERB, Z. 1996. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*, 3, 895-904.
- CROWE, D. L. & BROWN, T. N. 1999. Transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activity by a c-fos/estrogen receptor fusion

- protein is mediated by the proximal AP-1 site of the MMP-9 promoter and correlates with reduced tumor cell invasion. *Neoplasia*, 1, 368-72.
- CURRAN, T. & TEICH, N. M. 1982. Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-dalton phosphoprotein. *J Virol*, 42, 114-22.
- DEMBO AJ, D. M., STENWIG A, BERLE EJ, BUSH RS, KJORSTAD K 1990. Prognostic Factors in Patients With Stage I Epithelial Ovarian Cancer. *Obstetrics & Gynecology*.
- DORN, J., HARBECK, N., KATES, R., MAGDOLEN, V., GRASS, L., SOOSAIPIILLAI, A., SCHMALFELDT, B., DIAMANDIS, E. P. & SCHMITT, M. 2006. Disease processes may be reflected by correlations among tissue kallikrein proteases but not with proteolytic factors uPA and PAI-1 in primary ovarian carcinoma. *Biol Chem*, 387, 1121-8.
- DU BOIS, A., REUSS, A., HARTER, P., PUJADE-LAURINE, E., RAY-COQUARD, I., PFISTERER, J., OVARIALKARZINOM, A. G. O. S. & OVARIENS, G. D. I. N. P. L. E. D. C. 2010. Potential role of lymphadenectomy in advanced ovarian cancer: a combined exploratory analysis of three prospectively randomized phase III multicenter trials. *J Clin Oncol*, 28, 1733-9.
- DU BOIS, A., REUSS, A., PUJADE-LAURINE, E., HARTER, P., RAY-COQUARD, I. & PFISTERER, J. 2009a. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115, 1234-44.
- DU BOIS, A., REUSS, A., PUJADE-LAURINE, E., HARTER, P., RAY-COQUARD, I. & PFISTERER, J. 2009b. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115, 1234-44.
- DU, Y. R., CHEN, Y., GAO, Y., NIU, X. L., LI, Y. J. & DENG, W. M. 2013. Effects and mechanisms of anti-CD44 monoclonal antibody A3D8 on proliferation and apoptosis of sphere-forming cells with stemness from human ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 23, 1367-75.
- DUFFY, M. J. 1996. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res*, 2, 613-8.
- ENGEL, J., ECKEL, R., SCHUBERT-FRITSCHLE, G., KERR, J., KUHN, W., DIEBOLD, J., KIMMIG, R., REHBOCK, J. & HÖLZEL, D. 2002. Moderate progress for ovarian cancer in the last 20 years: prolongation of survival, but no improvement in the cure rate. *Eur J Cancer*, 38, 2435-45.
- ESCREVENTE, C., MACHADO, E., BRITO, C., REIS, C. A., STOECK, A., RUNZ, S., MARMÉ, A., ALTEVOGT, P. & COSTA, J. 2006. Different expression levels of

- alpha3/4 fucosyltransferases and Lewis determinants in ovarian carcinoma tissues and cell lines. *Int J Oncol*, 29, 557-66.
- FEDI, P., TRONICK, S. & AARONSON, S. 1997. Growth factors. *In*: HOLLAND, J., BAST, R., MORTON, D., FREI, E., KUFE, D. & WEICHSELBAUM, R. (eds.) *Cancer Medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- FERRARI, S., ZANELLA, L., ALBERGHINI, M., PALMERINI, E., STAALS, E. & BACCHINI, P. 2008. Prognostic significance of immunohistochemical expression of ezrin in non-metastatic high-grade osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 50, 752-6.
- FIALKA, I., SCHWARZ, H., REICHMANN, E., OFT, M., BUSSLINGER, M. & BEUG, H. 1996. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol*, 132, 1115-32.
- FIDLER, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-8.
- FINKEL, M. P., BISKIS, B. O. & JINKINS, P. B. 1966. Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science*, 151, 698-701.
- FISCHER, K., LUTZ, V., WILHELM, O., SCHMITT, M., GRAEFF, H., HEISS, P., NISHIGUCHI, T., HARBECK, N., KESSLER, H., LUTHER, T., MAGDOLEN, V. & REUNING, U. 1998. Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett*, 438, 101-5.
- FLEISCHMANN, A., JOCHUM, W., EFERL, R., WITOWSKY, J. & WAGNER, E. F. 2003. Rhabdomyosarcoma development in mice lacking Trp53 and Fos: tumor suppression by the Fos protooncogene. *Cancer Cell*, 4, 477-82.
- FRIEDL, P. & GILMOUR, D. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 445-57.
- GAMBERI, G., BENASSI, M. S., BOHLING, T., RAGAZZINI, P., MOLENDINI, L., SOLLAZZO, M. R., POMPETTI, F., MERLI, M., MAGAGNOLI, G., BALLADELLI, A. & PICCI, P. 1998. C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression. *Oncology*, 55, 556-63.
- GARDI, N. L., DESHPANDE, T. U., KAMBLE, S. C., BUDHE, S. R. & BAPAT, S. A. 2014. Discrete molecular classes of ovarian cancer suggestive of unique mechanisms of transformation and metastases. *Clin Cancer Res*, 20, 87-99.
- GEBAUER, F., WICKLEIN, D., STÜBKE, K., NEHMANN, N., SCHMIDT, A., SALAMON, J., PELDSCHUS, K., NENTWICH, M. F., ADAM, G., TOLSTONOG, G., BOCKHORN, M., IZBICKI, J. R., WAGENER, C. & SCHUMACHER, U. 2013. Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp--/rag2-- mice. *Gut*, 62, 741-50.
- GONZÁLEZ-VALLINAS, M., VARGAS, T., MORENO-RUBIO, J., MOLINA, S., HERRANZ, J., CEJAS, P., BURGOS, E., AGUAYO, C., CUSTODIO, A., REGLERO, G., FELIU, J. & RAMÍREZ DE MOLINA, A. 2015. Clinical relevance of the differential expression of the glycosyltransferase gene GCNT3 in colon cancer. *Eur J Cancer*, 51, 1-8.

- GRAVES, M. L., ZHOU, L., MACDONALD, G., MUELLER, C. R. & ROSKELLEY, C. D. 2007. Regulation of the BRCA1 promoter in ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinoma cells. *FEBS Lett*, 581, 1825-33.
- GRETSCHHEL, S., HAENSCH, W., SCHLAG, P. M. & KEMMNER, W. 2003. Clinical relevance of sialyltransferases ST6GAL-I and ST3GAL-III in gastric cancer. *Oncology*, 65, 139-45.
- GUM, R., LENGYEL, E., JUAREZ, J., CHEN, J. H., SATO, H., SEIKI, M. & BOYD, D. 1996. Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem*, 271, 10672-80.
- HAI, T. & CURRAN, T. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3720-4.
- HAŁOŃ, A., NOWAK-MARKWITZ, E., DONIZY, P., MATKOWSKI, R., MACIEJCZYK, A., GANSUKH, T., GYÖRFFY, B., SPACZYŃSKI, M., ZABEL, M., LAGE, H. & SUROWIAK, P. 2012. Enhanced immunoreactivity of TIMP-2 in the stromal compartment of tumor as a marker of favorable prognosis in ovarian cancer patients. *J Histochem Cytochem*, 60, 491-501.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HASHIMOTO, F., HORIGOME, T., KANBAYASHI, M., YOSHIDA, K. & SUGANO, H. 1983. An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal Biochem*, 129, 192-9.
- HEIN, S., MAHNER, S., KANOWSKI, C., LÖNING, T., JÄNICKE, F. & MILDE-LANGOSCH, K. 2009. Expression of Jun and Fos proteins in ovarian tumors of different malignant potential and in ovarian cancer cell lines. *Oncol Rep*, 22, 177-83.
- HENGERER, B., LINDHOLM, D., HEUMANN, R., RÜTHER, U., WAGNER, E. F. & THOENEN, H. 1990. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 3899-903.
- HESS, J., ANGEL, P. & SCHORPP-KISTNER, M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 117, 5965-73.
- HOLSCHNEIDER, C. H. & BEREK, J. S. 2000. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*, 19, 3-10.
- HU, E., MUELLER, E., OLIVIERO, S., PAPAIOANNOU, V. E., JOHNSON, R. & SPIEGELMAN, B. M. 1994. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J*, 13, 3094-103.
- HUANNA, T., TAO, Z., XIANGFEI, W., LONGFEI, A., YUANYUAN, X., JIANHUA, W., CUIFANG, Z., MANJING, J., WENJING, C., SHAOCHUAN, Q., FEIFEI, X.,

- NAIKANG, L., JINCHAO, Z. & CHEN, W. 2014. GALNT14 mediates tumor invasion and migration in breast cancer cell MCF-7. *Mol Carcinog*.
- IMBERT, A. M., GARULLI, C., CHOQUET, E., KOUBI, M., AURRAND-LIONS, M. & CHABANNON, C. 2012. CD146 expression in human breast cancer cell lines induces phenotypic and functional changes observed in Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS One*, 7, e43752.
- JACOB, F., GOLDSTEIN, D. R., FINK, D. & HEINZELMANN-SCHWARZ, V. 2009. Proteogenomic studies in epithelial ovarian cancer: established knowledge and future needs. *Biomark Med*, 3, 743-56.
- JÄNICKE, F., HÖLSCHER, M., KUHN, W., VON HUGO, R., PACHE, L., SIEWERT, J. R. & GRAEFF, H. 1992. Radical surgical procedure improves survival time in patients with recurrent ovarian cancer. *Cancer*, 70, 2129-36.
- JÄNICKE, F., PACHE, L., SCHMITT, M., ULM, K., THOMSEN, C., PRECHTL, A. & GRAEFF, H. 1994. Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. *Cancer Res*, 54, 2527-30.
- JÄNICKE, F., PRECHTL, A., THOMSEN, C., HARBECK, N., MEISNER, C., UNTCH, M., SWEEP, C. G., SELBMANN, H. K., GRAEFF, H., SCHMITT, M. & GROUP, G. N. S. 2001. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst*, 93, 913-20.
- JÄNICKE, F., SCHMITT, M., PACHE, L., ULM, K., HARBECK, N., HÖFLER, H. & GRAEFF, H. 1993. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 24, 195-208.
- JENSEN, S. A., CALVERT, A. E., VOLPERT, G., KOURI, F. M., HURLEY, L. A., LUCIANO, J. P., WU, Y., CHALASTANIS, A., FUTERMAN, A. H. & STEGH, A. H. 2014. Bcl2L13 is a ceramide synthase inhibitor in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 5682-7.
- JIN, S. P., KIM, J. H., KIM, M. A., YANG, H. K., LEE, H. E., LEE, H. S. & KIM, W. H. 2007. Prognostic significance of loss of c-fos protein in gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 13, 284-9.
- JOCHUM, W., PASSEGUÉ, E. & WAGNER, E. F. 2001. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, 20, 2401-12.
- KALRA, N. & KUMAR, V. 2004. c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 279, 25313-9.
- KANO, A., SEKO, A., IDEO, H., YOSHIDA, M., NOMOTO, M., YONEZAWA, S., SAKAMOTO, M., KANNAGI, R. & YAMASHITA, K. 2006. Ectopic expression of N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase 2 in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinomas. *Glycoconj J*, 23, 453-60.
- KARIN, M., LIU, Z. & ZANDI, E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 240-6.

- KASIBHATLA, S., BRUNNER, T., GENESTIER, L., ECHEVERRI, F., MAHBOUBI, A. & GREEN, D. R. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell*, 1, 543-51.
- KATOH, M. 2003. CLDN23 gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of CLAUDIN gene family. *Int J Mol Med*, 11, 683-9.
- KERR, L. D., HOLT, J. T. & MATRISIAN, L. M. 1988. Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science*, 242, 1424-7.
- KIRCHHOFF, C., HABBEN, I., IVELL, R. & KRULL, N. 1991. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod*, 45, 350-7.
- KLEINBERG, L., HOLTH, A., TROPE, C. G., REICH, R. & DAVIDSON, B. 2008. Claudin upregulation in ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival. *Hum Pathol*, 39, 747-57.
- KÖBEL, M., GRADHAND, E., ZENG, K., SCHMITT, W. D., KRIESE, K., LANTZSCH, T., WOLTERS, M., DITTMER, J., STRAUSS, H. G., THOMSEN, C. & HAUPTMANN, S. 2006. Ezrin promotes ovarian carcinoma cell invasion and its retained expression predicts poor prognosis in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 25, 121-30.
- KOLBUS, A., HERR, I., SCHREIBER, M., DEBATIN, K. M., WAGNER, E. F. & ANGEL, P. 2000. c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol Cell Biol*, 20, 575-82.
- KREIENBERG, R., ALBERT, U.-S., FOLLMANN, M., KOPP, I., KUHN, T., WOCKE, L. & ZEMMLER, T. 2012. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms; Langversion 3.0, Aktualisierung 2012* [Online]. AWMF online; Das Portal der wissenschaftlichen Medizin: Deutsche Krebsgesellschaft (DKG) Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). Available: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-045OL.html> [Accessed 02.07.2012 2012].
- KRZEŚLAK, A., FORMA, E., BERNACIAK, M., ROMANOWICZ, H. & BRYŚ, M. 2012. Gene expression of O-GlcNAc cycling enzymes in human breast cancers. *Clin Exp Med*, 12, 61-5.
- KUDOH, M., KNEE, D. A., TAKAYAMA, S. & REED, J. C. 2002. Bag1 proteins regulate growth and survival of ZR-75-1 human breast cancer cells. *Cancer Res*, 62, 1904-9.
- KUHN, W., PACHE, L., SCHMALFELDT, B., DETTMAR, P., SCHMITT, M., JÄNICKE, F. & GRAEFF, H. 1994. Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol*, 55, 401-9.
- KUHN, W., SCHMALFELDT, B., REUNING, U., PACHE, L., BERGER, U., ULM, K., HARBECK, N., SPÄTHE, K., DETTMAR, P., HÖFLER, H., JÄNICKE, F., SCHMITT, M. & GRAEFF, H. 1999. Prognostic significance of urokinase (uPA)

- and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer*, 79, 1746-51.
- 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, 7095-105.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LANDSCHULZ, W. H., JOHNSON, P. F. & MCKNIGHT, S. L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240, 1759-64.
- LAUWAET, T., OLIVEIRA, M. J., MAREEL, M. & LEROY, A. 2000. Molecular mechanisms of invasion by cancer cells, leukocytes and microorganisms. *Microbes Infect*, 2, 923-31.
- LE-NICULESCU, H., BONFOCO, E., KASUYA, Y., CLARET, F. X., GREEN, D. R. & KARIN, M. 1999. Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol*, 19, 751-63.
- LENGYEL, E., SCHMALFELDT, B., KONIK, E., SPÄTHE, K., HÄRTING, K., FENN, A., BERGER, U., FRIDMAN, R., SCHMITT, M., PRECHTEL, D. & KUHN, W. 2001. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 82, 291-8.
- LEPPÄ, S., SAFFRICH, R., ANSORGE, W. & BOHMANN, D. 1998. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J*, 17, 4404-13.
- LEVIN, W. J., PRESS, M. F., GAYNOR, R. B., SUKHATME, V. P., BOONE, T. C., REISSMANN, P. T., FIGLIN, R. A., HOLMES, E. C., SOUZA, L. M. & SLAMON, D. J. 1995. Expression patterns of immediate early transcription factors in human non-small cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene*, 11, 1261-9.
- LIN, C. Y., CHEN, H. J., LI, T. M., FONG, Y. C., LIU, S. C., CHEN, P. C. & TANG, C. H. 2013. $\beta 5$ integrin up-regulation in brain-derived neurotrophic factor promotes cell motility in human chondrosarcoma. *PLoS One*, 8, e67990.
- LIU, C. C., LECLAIR, P., YAP, S. Q. & LIM, C. J. 2013. The membrane-proximal KXGFFKR motif of α -integrin mediates chemoresistance. *Mol Cell Biol*, 33, 4334-45.
- LIU, G., TAKANO, T., MATSUZUKA, F., HIGASHIYAMA, T., KUMA, K. & AMINO, N. 1999. Screening of specific changes in mRNAs in thyroid tumors by sequence specific differential display: decreased expression of c-fos mRNA in papillary carcinoma. *Endocr J*, 46, 459-66.
- LÓPEZ-OTÍN, C. & MATRISIAN, L. M. 2007. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 7, 800-8.
- LOU, X., HAN, X., JIN, C., TIAN, W., YU, W., DING, D., CHENG, L., HUANG, B., JIANG, H. & LIN, B. 2013. SOX2 targets fibronectin 1 to promote cell migration

- and invasion in ovarian cancer: new molecular leads for therapeutic intervention. *OMICS*, 17, 510-8.
- LUNDBERG, A. S. & WEINBERG, R. A. 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*, 35, 1886-94.
- MAHNER, S., BAASCH, C., SCHWARZ, J., HEIN, S., WÖLBER, L., JÄNICKE, F. & MILDE-LANGOSCH, K. 2008. C-Fos expression is a molecular predictor of progression and survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, 99, 1269-75.
- MAHNER, S., WOELBER, L., EULENBURG, C., SCHWARZ, J., CARNEY, W., JAENICKE, F., MILDE-LANGOSCH, K. & MUELLER, V. 2010. TIMP-1 and VEGF-165 serum concentration during first-line therapy of ovarian cancer patients. *BMC Cancer*, 10, 139.
- MEINHOLD-HEERLEIN, I., BAUERSCHLAG, D., HILPERT, F., DIMITROV, P., SAPINOSO, L. M., ORLOWSKA-VOLK, M., BAUKNECHT, T., PARK, T. W., JONAT, W., JACOBSEN, A., SEHOULI, J., LUTTGES, 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, 1053-65.
- MIKULA, M., GOTZMANN, J., FISCHER, A. N., WOLSCHEK, M. F., THALLINGER, C., SCHULTE-HERMANN, R., BEUG, H. & MIKULITS, W. 2003. The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis. *Oncogene*, 22, 6725-38.
- MILDE-LANGOSCH, K. 2005. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur J Cancer*, 41, 2449-61.
- MILDE-LANGOSCH, K., BAMBERGER, A. M., METHNER, C., RIECK, G. & LÖNING, T. 2000. Expression of cell cycle-regulatory proteins rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members. *Int J Cancer*, 87, 468-72.
- MILDE-LANGOSCH, K., KARN, T., SCHMIDT, M., ZU EULENBURG, C., OLIVEIRA-FERRER, L., WIRTZ, R. M., SCHUMACHER, U., WITZEL, I., SCHÜTZE, D. & MÜLLER, V. 2014. Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 145, 295-305.
- MILDE-LANGOSCH, K. & RIETHDORF, S. 2003. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. *J Cell Physiol*, 196, 224-44.
- MIYAKE, K., BEKISZ, J., ZHAO, T., CLARK, C. R. & ZOON, K. C. 2012. Apoptosis-inducing factor (AIF) is targeted in IFN- α 2a-induced Bid-mediated apoptosis through Bak activation in ovarian cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 1378-88.
- MOSZYNSKI, R., SZUBERT, S., SZPUREK, D., MICHALAK, S. & SAJDAK, S. 2013. Role of osteopontin in differential diagnosis of ovarian tumors. *J Obstet Gynaecol Res*, 39, 1518-25.
- NERLOV, C., RØRTH, P., BLASI, F. & JOHNSEN, M. 1991. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene*, 6, 1583-92.

- NETZKER, R. 2006a. Der Zellzyklus. *In: ROSSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. (eds.) Duale Reihe Biochemie.* 1 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- NETZKER, R. 2006b. Die Apoptose. *In: RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. (eds.) Duale Reihe Biochemie.* 1 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- NG, D. C., SHAFARAE, S., LEE, D. & BIKLE, D. D. 2000. Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem*, 275, 24080-8.
- NORDGARD, S. H., JOHANSEN, F. E., ALNAES, G. I., BUCHER, E., SYVÄNEN, A. C., NAUME, B., BØRRESEN-DALE, A. L. & KRISTENSEN, V. N. 2008. Genome-wide analysis identifies 16q deletion associated with survival, molecular subtypes, mRNA expression, and germline haplotypes in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*, 47, 680-96.
- OSHIMA, R. G., ABRAMS, L. & KULESH, D. 1990. Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev*, 4, 835-48.
- 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.
- PANKOV, R., NEZNANOV, N., UMEZAWA, A. & OSHIMA, R. G. 1994. AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid-dependent induction of keratin 18 in embryonic cells. *Mol Cell Biol*, 14, 7744-57.
- PARK, D. C., YEO, S. G., WILSON, M. R., YERBURY, J. J., KWONG, J., WELCH, W. R., CHOI, Y. K., BIRRER, M. J., MOK, S. C. & WONG, K. K. 2008. Clusterin interacts with Paclitaxel and confer Paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Neoplasia*, 10, 964-72.
- PARKER, L. P., TAYLOR, D. D., KESTERSON, S. & GERCEL-TAYLOR, C. 2009. Gene expression profiling in response to estradiol and genistein in ovarian cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics*, 6, 189-94.
- PASSEGUÉ, E. & WAGNER, E. F. 2000. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J*, 19, 2969-79.
- PAUL, R., EWING, C. M., ROBINSON, J. C., MARSHALL, F. F., JOHNSON, K. R., WHEELLOCK, M. J. & ISAACS, W. B. 1997. Cadherin-6, a cell adhesion molecule specifically expressed in the proximal renal tubule and renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 57, 2741-8.
- PAUL, R., NECKNIG, U., BUSCH, R., EWING, C. M., HARTUNG, R. & ISAACS, W. B. 2004. Cadherin-6: a new prognostic marker for renal cell carcinoma. *J Urol*, 171, 97-101.
- PFISTERER, J. 2007. Anatomie des weiblichen Geschlechtsorgane. *In: KIECHLE, M. (ed.) Gynäkologie und Geburtshilfe.* 1 ed. München: Elsevier GmbH.
- PLOW, E. F., HERREN, T., REDLITZ, A., MILES, L. A. & HOOVER-PLOW, J. L. 1995. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J*, 9, 939-45.

- PRUSTY, B. K. & DAS, B. C. 2005. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer*, 113, 951-60.
- PUJADE-LAURINE, E., LU, H., MIRSHAHI, S., SORIA, J., SORIA, C., BERNADOU, A., KRUIHOF, E. K., LIJNEN, H. R. & BURTIN, P. 1993. The plasminogen-activation system in ovarian tumors. *Int J Cancer*, 55, 27-31.
- RAMPIAS, T., PECTASIDES, E., PRASAD, M., SASAKI, C., GOUVERIS, P., DIMOU, A., KOUNTOURAKIS, P., PERISANIDIS, C., BURTNES, B., ZARAMBOUKAS, T., RIMM, D., FOUNTZILAS, G. & PSYRRI, A. 2013. Molecular profile of head and neck squamous cell carcinomas bearing p16 high phenotype. *Ann Oncol*, 24, 2124-31.
- RHODES, K. & OSHIMA, R. G. 1998. A regulatory element of the human keratin 18 gene with AP-1-dependent promoter activity. *J Biol Chem*, 273, 26534-42.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin: Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der eopidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- RÖHLKE, P., MILDE-LANGOSCH, K., WEYLAND, C., PICHLMEIER, U., JONAT, W. & LÖNING, T. 1997. p53 is a persistent and predictive marker in advanced ovarian carcinomas: multivariate analysis including comparison with Ki67 immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol*, 123, 496-501.
- ROSEN, D. G., WANG, L., ATKINSON, J. N., YU, Y., LU, K. H., DIAMANDIS, E. P., HELLSTROM, I., MOK, S. C., LIU, J. & BAST, R. C. 2005. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 99, 267-77.
- SABBAH, M., COURILLEAU, D., MESTER, J. & REDEUILH, G. 1999. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11217-22.
- SCHADENDORF, D., KERN, M. A., ARTUC, M., PAHL, H. L., ROSENBAACH, T., FICHTNER, I., NÜRNBERG, W., STÜTING, S., VON STEBUT, E., WORM, M., MAKKI, A., JURGOVSKY, K., KOLDE, G. & HENZ, B. M. 1996. Treatment of melanoma cells with the synthetic retinoid CD437 induces apoptosis via activation of AP-1 in vitro, and causes growth inhibition in xenografts in vivo. *J Cell Biol*, 135, 1889-98.
- SCHAERLI, P. & JAGGI, R. 1998. EGF-induced programmed cell death of human mammary carcinoma MDA-MB-468 cells is preceded by activation AP-1. *Cell Mol Life Sci*, 54, 129-38.
- SCHMALFELDT, B. 2007. Veränderungen und Tumoren des Ovars. In: KIECHLE, M. (ed.) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1 ed. München: Elsevier GmbH.
- SCHMALFELDT, B., KUHN, W., REUNING, U., PACHE, L., DETTMAR, P., SCHMITT, M., JÄNICKE, F., HÖFLER, H. & GRAEFF, H. 1995. Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and 2. *Cancer Res*, 55, 3958-63.

- SCHMALFELDT, B. & PFISTERER, J. 2007. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe; Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. *In: ONLINE, A. (ed.). AWMF online: AWMF online.*
- SCHREIBER, M., KOLBUS, A., PIU, F., SZABOWSKI, A., MÖHLE-STEINLEIN, U., TIAN, J., KARIN, M., ANGEL, P. & WAGNER, E. F. 1999. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*, 13, 607-19.
- SCHRÖDER, C. 2009. *Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors Fra-2 in der Invasivität und Progression des humanen Mammakarzinoms.* doctor, Universität Hamburg.
- SCHUMMER, M., NG, W. V., BUMGARNER, R. E., NELSON, P. S., SCHUMMER, B., BEDNARSKI, D. W., HASSELL, L., BALDWIN, R. L., KARLAN, B. Y. & HOOD, L. 1999. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene*, 238, 375-85.
- SCHWEIGER, A., CHRISTENSEN, I. J., NIELSEN, H. J., SØRENSEN, S., BRÜNNER, N. & KOS, J. 2004. Serum cathepsin H as a potential prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers*, 19, 289-94.
- SEHOULI, J. & BRAICU, E. I. 2010a. Diagnostische Anstätze beim Ovarialkarzinom. Europäisches Kompetenzzentrum für Eierstockkrebs, Klinik für Gynäkologie; Charite/Campus Virchow-Klinikum ed. Mannheim: Europäisches Kompetenzzentrum für Eierstockkrebs, Klinik für Gynäkologie; Charite/Campus Virchow-Klinikum.
- SEHOULI, J. & BRAICU, E. I. 2010b. *Diagnostische Anstätze beim Ovarialkarzinom.* Mannheim: Europäisches Kompetenzzentrum für Eierstockkrebs, Klinik für Gynäkologie; Charite/Campus Virchow-Klinikum.
- SHAULIAN, E. & KARIN, M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20, 2390-400.
- SHAULIAN, E. & KARIN, M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4, E131-6.
- SHEVDE, L. A., SAMANT, R. S., PAIK, J. C., METGE, B. J., CHAMBERS, A. F., CASEY, G., FROST, A. R. & WELCH, D. R. 2006. Osteopontin knockdown suppresses tumorigenicity of human metastatic breast carcinoma, MDA-MB-435. *Clin Exp Metastasis*, 23, 123-33.
- SHIMBO, T., TANEMURA, A., YAMAZAKI, T., TAMAI, K., KATAYAMA, I. & KANEDA, Y. 2010. Serum anti-BPAG1 auto-antibody is a novel marker for human melanoma. *PLoS One*, 5, e10566.
- SIEGMUND, D., MAURI, D., PETERS, N., JUO, P., THOME, M., REICHWEIN, M., BLENIS, J., SCHEURICH, P., TSCHOPP, J. & WAJANT, H. 2001. Fas-associated death domain protein (FADD) and caspase-8 mediate up-regulation of c-Fos by Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) via a FLICE inhibitory protein (FLIP)-regulated pathway. *J Biol Chem*, 276, 32585-90.
- SINGH, A., TONG, A., OGNOSKIE, N., MEYER, W. & NEMUNAITIS, J. 1998. Improved survival in patients with advanced colorectal carcinoma failing 5-

- fluorouracil who received irinotecan hydrochloride and have high intratumor C-fos expression. *Am J Clin Oncol*, 21, 466-9.
- SOINI, Y. & TALVENSAARI-MATTILA, A. 2006. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 in ovarian tumors of diverse types. *Int J Gynecol Pathol*, 25, 330-5.
- TAS, F., KARABULUT, S., SERILMEZ, M., CIFTICI, R. & DURANYILDIZ, D. 2014. Serum levels of macrophage migration-inhibitory factor (MIF) have diagnostic, predictive and prognostic roles in epithelial ovarian cancer patients. *Tumour Biol*, 35, 3327-31.
- TENG, C. S. 2000. Protooncogenes as mediators of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 197, 137-202.
- VAN STRAATEN, F., MÜLLER, R., CURRAN, T., VAN BEVEREN, C. & VERMA, I. M. 1983. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3183-7.
- VOGT, P. K. & BOS, T. J. 1990. jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res*, 55, 1-35.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2010a. Die Tumorzelle. In: WAGENER, C. & MÜLLER, O. (eds.) *Molekulare Onkologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2010b. Maligne Progression: molekulare Grundlagen und klinische Bedeutung. In: WAGENER, C. & MÜLLER, O. (eds.) *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2010c. Mechanismen der malignen Progression. In: WAGENER, C. & MÜLLER, O. (eds.) *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2010d. Mechanismen der Tumorentstehung. In: WAGENER, C. & MÜLLER, O. (eds.) *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2010e. Signalwege der Tumorentstehung. In: WAGENER, C. & MÜLLER, O. (eds.) *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2010f. Transkription. In: WAGENER, C. & MÜLLER, O. (eds.) *Molekulare Onkologie - Tumorentstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2010g. Ursachen der Tumorentstehung. In: WAGENER, C. & MÜLLER, O. (eds.) *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, Klinische Aspekte*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- WALKER, G., MACLEOD, K., WILLIAMS, A. R., CAMERON, D. A., SMYTH, J. F. & LANGDON, S. P. 2007. Estrogen-regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 106, 461-8.
- WANG, L., JIN, X., LIN, D., LIU, Z., ZHANG, X., LU, Y., LIU, Y., WANG, M., YANG, M., LI, J. & QUAN, C. 2013. Clinicopathologic significance of claudin-6,

- occludin, and matrix metalloproteinases -2 expression in ovarian carcinoma. *Diagn Pathol*, 8, 190.
- WANG, Y. D., CHEN, H., LIU, H. Q. & HAO, M. 2014. Correlation between ovarian neoplasm and serum levels of osteopontin: a meta-analysis. *Tumour Biol*.
- WATSON, P. & LYNCH, H. T. 1993. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*, 71, 677-85.
- WELSCH, U. & DELLER, T. 2010. *Lehrbuch Histologie*, München, Elsevier GmbH; Urban und Fischer Verlag.
- WELSH, J. B., ZARRINKAR, P. P., SAPINOSO, L. M., KERN, S. G., BEHLING, C. A., MONK, B. J., LOCKHART, D. J., BURGER, R. A. & HAMPTON, G. M. 2001. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1176-81.
- WERB, Z. 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, 91, 439-42.
- WESTERNOFF, T. H., JORDAN, R. C., REGEZI, J. A., RAMOS, D. M. & SCHMIDT, B. L. 2005. Beta-6 Integrin, tenascin-C, and MMP-1 expression in salivary gland neoplasms. *Oral Oncol*, 41, 170-4.
- WONG, C. W., LEE, A., SHIENTAG, L., YU, J., DONG, Y., KAO, G., AL-MEHDI, A. B., BERNHARD, E. J. & MUSCHEL, R. J. 2001. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res*, 61, 333-8.
- WOOPEN, H., PIETZNER, K., RICHTER, R., FOTOPOULOU, C., JOENS, T., BRAICU, E. I., MELLSTEDT, H., MAHNER, S., LINDHOFER, H., DARB-ESFAHANI, S., DENKERT, C. & SEHOULI, J. 2014. Overexpression of the epithelial cell adhesion molecule is associated with a more favorable prognosis and response to platinum-based chemotherapy in ovarian cancer. *J Gynecol Oncol*, 25, 221-8.
- WU, H., WANG, K., LIU, W. & HAO, Q. 2014. PTEN overexpression improves cisplatin-resistance of human ovarian cancer cells through upregulating KRT10 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 444, 141-6.
- WU, Z., LI, J., YANG, X., WANG, Y., YU, Y., YE, J., XU, C., QIN, W. & ZHANG, Z. 2012. MCAM is a novel metastasis marker and regulates spreading, apoptosis and invasion of ovarian cancer cells. *Tumour Biol*, 33, 1619-28.
- XIE, D., LAU, S. H., SHAM, J. S., WU, Q. L., FANG, Y., LIANG, L. Z., CHE, L. H., ZENG, Y. X. & GUAN, X. Y. 2005. Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma. *Cancer*, 103, 277-83.
- YANG, F., LONG, W., XUECHUAN, H., XUEQIN, L., HONGYUN, M. & YONGHUI, D. 2014. Upregulation of Fas in epithelial ovarian cancer reverses the development of resistance to Cisplatin. *BMB Rep*.
- YOSHIDA, H., SUMI, T., ZHI, X., YASUI, T., HONDA, K. & ISHIKO, O. 2011. Claudin-4: a potential therapeutic target in chemotherapy-resistant ovarian cancer. *Anticancer Res*, 31, 1271-7.
- ZHANG, X., ZHANG, L., YANG, H., HUANG, X., OTU, H., LIBERMANN, T. A., DEWOLF, W. C., KHOSRAVI-FAR, R. & OLUMI, A. F. 2007. c-Fos as a

- proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 67, 9425-34.
- ZHANG, Y., XU, B., LIU, Y., YAO, H., LU, N., LI, B., GAO, J., GUO, S., HAN, N., QI, J., ZHANG, K., CHENG, S., WANG, H., ZHANG, X., XIAO, T., WU, L. & GAO, Y. 2012. The ovarian cancer-derived secretory/releasing proteome: A repertoire of tumor markers. *Proteomics*, 12, 1883-91.
- ZODRO, E., JAROSZEWSKI, M., IDA, A., WRZESIŃSKI, T., KWIAS, Z., BLUYSEN, H. & WESOLY, J. 2014. FUT11 as a potential biomarker of clear cell renal cell carcinoma progression based on meta-analysis of gene expression data. *Tumour Biol*, 35, 2607-17.
- ZOU, L., YI, T., SONG, X., LI, S., WEI, Y. & ZHAO, X. 2014. Efficient inhibition of intraperitoneal human ovarian cancer growth by short hairpin RNA targeting CD44. *Neoplasma*, 61, 274-82.

8. Danksagung

Mit der Fertigstellung meiner Doktorarbeit ist es an der Zeit sich für die vielfache fachliche und moralische Unterstützung während dieser Zeit zu bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei meiner „Doktormutter“ Frau Dr. rer. nat. habil Karin Milde-Langosch für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas, sowie für eine stetige engagierte und warmherzige Betreuung mit wertvollen Anregungen und Kritik, sowie für immer wieder motivierende Worte und der Möglichkeit, jederzeit mit Fragen und Problemen zu ihr kommen zu dürfen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Fritz Jänicke danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten des gynäkologischen Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Frau Dr. rer. nat. Sibyll Hein danke ich für viele wertvolle Tipps bei Laborarbeit und Themenerarbeitung, sowie ein stets offenes Ohr bei Fragen jeglicher Art und eine immer sehr motivierende Zusammenarbeit.

Genauso möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Leticia Oliveira-Ferrer für ihre Unterstützung, insbesondere im Bereich der FACS-Analyse, bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Frau Dr. rer. nat. Christine Schröder und Dr. rer. nat. Daniel Wicklein möchte ich für die Unterstützung bei der Vorbereitung, Durchführung und Analyse der FACS-Analyse danken.

Dem Institut für Klinische Chemie und Zentrallaboratorien des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf und insbesondere Kristin Klätschke danke ich für die Durchführung des cDNA-Microarrays.

Frau Dr. rer. nat. Martina Vetter aus dem Universitätsklinikum Halle (Saale) danke ich für die Durchführung der quantitativen Bestimmung von uPA durch eine ELISA-Analyse.

Dem Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, insbesondere Dr. rer. nat. Volker Assmann, danke ich für die Bereitstellung des Plasmides pIRES-P.

Bei Frau Dr. Christine Gräfin zu Eulenburg aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie möchte ich mich für die Unterstützung in der korrekten statistischen Auswertung der gesammelten Daten bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem ganzen Laborteam der gynäkologischen Forschung: Maila Rossberg, Kati Beck und Kathrin Eylmann. Vielen Dank für viele sehr wertvolle Tipps, beruhigende Worte in kniffligen Momenten und für eine immer sehr freundliche und lustige Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie. Vielen Dank für eure motivierende Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund und der Liebe meines Lebens Christian-Alexander Behrendt bedanken, der mich in allen Phasen meiner Forschungsarbeit, trotz eigener großer Arbeitsbelastung, immer großartig unterstützt hat.

Vielen Dank!

10. Eidesstattliche Erklärung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: