

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Untersuchung einer Splicevariante des Tumorsuppressor KAI1 (CD82)
im Ovarialkarzinom**

Stephanie Constanze Schlaugk

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Alfons Meindl
2. apl. Prof. Dr. Gisela Keller

Die Dissertation wurde am 11.12.2020 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2021
angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren	1
1.1.3 Früherkennung und Diagnostik	3
1.1.4 Tumormarker	3
1.1.5 Histologie	4
1.1.6 Stadien	7
1.1.7 Therapie	9
1.1.8 Mortalität und Prognose	15
1.2 Karzinogenese	17
1.2.1 Metastasierung	17
1.3 KAI1	19
1.3.1 Transmembran 4 Superfamily (TM4SF)	19
1.3.2 Wildtyp KAI1	20
1.3.3 Spleiß-Isoformen von KAI1	25
2. Fragestellung	28
3. Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Firmen und Reagenzien	29
3.1.2 Patientinnenkollektiv	30
3.2 Methoden	34
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
3.2.2 Agarose Gelelektrophorese	38
3.2.3 RNA Extraktion	40
3.2.4 Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	41
3.2.5 Verdau mit dem Restriktionsenzym Pst1	44
3.2.6 Konstruktion der Plasmide „KAI1- Δ ex7“ bzw. „KAI1 full length“ und Transformation in XL-1 blue Zellen	45
3.2.7 Mutagenese	54

3.2.8	DNA-Sequenzierung	57
3.2.9	Nanodrop, Messung der DNA/RNA Konzentrationen	61
3.2.10	DHPLC	62
3.2.11	KM-Plotter	66
3.2.12	Berechnung Cut off Wert des KAI1- Δ ex7	67
4.	Ergebnisse	68
4.1	RT-PCR zur Darstellung von KAI- Δ ex7	68
4.2	Quantitativer Vergleich mit HPRT Primern	68
4.3	Darstellung und Quantifizierung der KAI- Δ ex7- Spleißvariante mittels DHPLC	69
4.4	Nachweis der Spleißisoform KAI- Δ ex7 über Pst1-Verdau	74
4.5	Herstellung von Expressionsplasmiden mit KAI1 „full length“ und KAI1- Δ ex7	75
4.6	Überprüfen der DNA-Sequenz der klonierten Spleißvariante KAI- Δ ex7	77
4.7	In vitro-Mutagenese	81
4.8	Korrelation der KAI1 Expression mit klinischen Daten	82
4.9	Einfluss des KAI1 beim Mammakarzinom	90
5.	Diskussion	93
6.	Ausblick	99
7.	Zusammenfassung	101
8.	Literaturverzeichnis	103
9.	Abbildungsverzeichnis	112
10.	Tabellenverzeichnis	115
11.	Anhang	116
11.1	Hind/Xba-Verdau	116
11.2	WHO Klassifikation der Tumoren des Ovar, Tube und Peritoneum	117

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
ATX	Autotaxin
bp	basepair, Basenpaare
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2 Gen
BRIP1	BRCA1 Interacting Helicase 1
CA125	Cancer Antigen 125
CA19-9	Cancer Antigen 19-9
CA72-4	Cancer Antigen 72-4
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CRP	C-reactive protein
DARC	Duffy antigen/receptor for chemokines
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotiden
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor-Receptor
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GOG	Gynecologic Oncology Group
HBOC	Hereditary Breast and Ovarian Cancer, familiäres Brust- und Eierstockssyndrom
HE4	humanes Epididymis-Protein 4
Her2-neu	human epidermal growth factor receptor 2
HGSC	High-grade seröses Karzinom
HIPEC	hypertherme intraperitoneale Chemotherapie

HNPCC	Hereditäres Nicht-Polypöses Colorektales Carcinom, Lynch Syndrom
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IL-6	Interleukin 6
IP-RP-HPLC	Ion-pair reversed Phase high-pressure liquid Chromatography
KAI1	CD82, C33, Kangai
KAI1-WT	KAI1 Wildtyp
KAI1- Δ ex7	Splicevariante des KAI1 mit Verlust des Exon 7, Spliced KAI1
KITENIN	KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin
LGSC	Low-grade seröse Karzinom
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerasen
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasenkettenreaktion
PD-L1-Inhibitor	programmed cell death ligand1 Inhibitor
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROC Kurve	Receiver-Operating-Characteristics
ROIs	Reactive oxygen intermediates
ROMA-Index	Risk of Ovarian Malignancy Algorithm
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion
SAA	Serum amyloid A
siRNA	small interfering RNA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TM4SF	Transmembran 4 Superfamily
uPA	Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator
uPAR	Rezeptor Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT1	Wilms-Tumorsuppressorgen

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist der fünfthäufigste maligne Tumor der Frau (3,2%, nach dem Mammakarzinom, dem Colonkarzinom, dem Bronchialkarzinom und dem Korpuskarzinom) mit einer Neuerkrankungsrate von 7240 Frauen/Jahr in Deutschland (Stand 2014). Das Ovarialkarzinom steht bezüglich der tumorbedingten Todesursachen in Deutschland ebenfalls an 5. Stelle (5,3%) [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Den Erkrankungsgipfel erreicht das Ovarialkarzinom mit 75-80 Jahren [Tumorregister München, 2021], allerdings treten etwa 10% der Ovarialkarzinome bei Frauen unter 45 Jahren auf. Dabei handelt es sich dann jedoch zumeist um Keimzelltumoren oder um erblich bedingte Erkrankungen [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

1.1.2 Risikofaktoren

Die Entstehung eines Ovarialkarzinoms kann durch viele verschiedene Risikofaktoren begünstigt werden.

Hormonelle Einflüsse scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms zu spielen. So erhöht sich das Risiko, an einem malignen Ovarialtumor zu erkranken mit Kinderlosigkeit, fehlenden Stillzeiten, der Anwendung einer Hormontherapie, Umwelt- und Ernährungsfaktoren, Adipositas sowie einem hohen sozialen Status. Protektiv wirken hingegen Ovulationshemmer, eine Tubenligatur und Multiparität [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Auch eine Endometriose, die ca. 4-12% aller Frauen im reproduktiven Alter betrifft, geht mit einem erhöhten Risiko für ein Ovarialkarzinom einher. In einer Metaanalyse des Ovarian Cancer Association Consortiums (OCAC) wurden 23000 Frauen auf einen Zusammenhang zwischen einer Endometriose und einem Ovarialkarzinom hin untersucht. Es zeigte sich ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines klarzelligen,

endometrioiden und low-grade serösen Ovarialkarzinom. Besonders betroffen sind wohl Patientinnen mit einer ovariellen Endometriose [M.Mackelenbergh, 2015].

Eine Asbestexposition kann ein Ovarialkarzinom verursachen und zählt dann zu einer meldepflichtigen Berufskrankheit [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Ein Teil der Ovarialkarzinome ist allerdings genetisch bedingt. Die häufigste Ursache hierfür ist eine Mutation im BRCA1 Gen (Breast Cancer 1 Gen, 80%), gefolgt von einer Mutation im BRCA2 Gen (15%) (familiäres Brust- und Eierstockkrebssyndrom, HBOC). Das kumulative Risiko für Patienten, mit einer BRCA1 Mutation bis zum 69. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, liegt bei 39%, für eine BRCA2 Mutation bei 11-22% [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Bei BRCA2-Mutationen ist nicht nur das Risiko für Mamma- und Ovarialkarzinome erhöht, sondern es besteht auch ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen des Kolon und des Pankreas [Antoniou et al., 2003]. Weitere Risikogene beim familiären Brust- und Eierstockkrebssyndrom sind u.a. RAD51C, RAD51D und BRIP1. Diese sind jedoch seltener, sollten aber dennoch im Rahmen der genetischen Testung mit untersucht werden [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Das RAD51C-Gen und das RAD51D-Gen kodieren ein DNA Reperaturprotein. RAD51C ist für 1,5-4% aller Mamma- und Ovarialkarzinomerkrankungen verantwortlich [Alfons Meindl, 2011]. BRIP1 ist gemeinsam mit BRCA1 und anderen Proteinen für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wichtig. Mutationen führen zu einem erhöhten Risiko für Mamma- und insbesondere für Ovarialkarzinome [Rafnar et al, 2011].

Auch bei hereditären nichtpolypösen Darmkarzinomen (HNPCC, Lynch-Syndrom) ist das Risiko für ein Ovarialkarzinom erhöht. Es liegen hier Veränderungen in den Mismatch-Genen (MLH1, MSH2, MLH3, MSH6, PMS2) vor. Bei einer MSH2- oder MLH1 Mutation liegt das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, bis zum 40. Lebensjahr bei 1%, steigt aber bis zum 70. Lebensjahr auf 20% an [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Verschiedene erbliche Erkrankungen gehen mit einem allgemein erhöhten Karzinomrisiko einher. Ein erhöhtes Risiko für ein Ovarialkarzinom haben möglicherweise das Peutz-Jeghers Syndrom (Mutation des Tumorsuppressorgens

Serin-Threonin-Kinase STK11) und das Li-Fraumeni Syndrom (Mutation des Tumorsuppressorgens p53) [A.Meindl, 2014].

Häufig lassen sich aber in untersuchten Hochrisikofamilien keine der bisher bekannten Mutationen nachweisen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass noch viele der Genmutationen bisher unbekannt sind [A.Meindl, 2014].

1.1.3 Früherkennung und Diagnostik

Das Stadium, in dem ein Ovarialkarzinom diagnostiziert wird spielt eine wichtige Rolle für die Prognose der erkrankten Patientinnen. So haben Patientinnen mit einem Karzinom im lokalisierten Stadium eine Überlebensrate von 90%, während es im fortgeschrittenen Stadium nur noch 25% sind [Parker et al., 1996]. Der transvaginale Ultraschall wird häufig als Vorsorgemaßnahme durchgeführt. Für die Diagnostik des Ovarialkarzinoms spielt dieser jedoch keine Rolle. 78216 Frauen zwischen 55 und 74 Jahren wurden im Rahmen des *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening* in 2 Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe erhielt eine übliche gynäkologische Vorsorgeuntersuchung, die andere Gruppe zusätzlich eine vaginale Sonografie und eine CA125 Bestimmung. Ein Unterschied in Bezug auf die Mortalität (118 vs. 100) und das Auftreten eines Ovarialkarzinoms (212 vs. 176) konnte nicht gezeigt werden [Saundra S.Buys et al., 2011]. Von der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe wird daher kein generelles Screening empfohlen [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Auch für Frauen, die zur Risikopopulation für ein Ovarialkarzinom gehören, wird kein generelles Screening empfohlen [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

1.1.4 Tumormarker

Beim Ovarialkarzinom dienen die bisher bekannten Tumormarker nur als Parameter zur Verlaufsbeobachtung der Patientinnen, und nicht als Screeningverfahren, wie es zum Beispiel beim Prostatakarzinom der Fall ist. Der Tumormarker CA125 (Cancer Antigen 125) wird vor allem von dem serösen Ovarialkarzinom gebildet, und ist bei Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium um bis zu 80% erhöht. Im Frühstadium ist er nur in 50% der Fälle erhöht und eignet sich

deswegen, und auf Grund seiner geringen Spezifität, nicht als Screeningparameter [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. CA125 kann auch bei Pankreaskarzinomen oder anderen gynäkologischen Tumoren, sowie in der Schwangerschaft, oder bei benignen Erkrankungen wie einer Pankreatitis und einer Hepatitis erhöht sein [Hagemann, 2021]. Auch bei der Diagnostik eines Rezidivs hat eine frühzeitige Therapie auf Grund eines CA125 Anstiegs keinen Überlebensvorteil für die Patientin [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Weitere Tumormarker sind CA72-4 (Cancer Antigen 72-4) und CA19-9 (Cancer Antigen 19-9), welcher vor allem beim muzinösen Ovarialkarzinom erhöht ist.

Seit Oktober 2019 gibt es einen neuen zugelassenen Tumormarker für das Ovarialkarzinom: HE4 (humanes Epididymis-Protein 4). HE4 zeigt eine deutlich höhere Spezifität als CA125. Ursachen für eine HE4 Erhöhung können neben einem Ovarialkarzinom, ein Zervix- oder Endometriumkarzinom, gastrointestationale Tumoren, ein Blasenkarzinom, eine Herzinsuffizienz, Rauchen oder eine Niereninsuffizienz sein. Durch die Kombination von CA125 und HE4 im ROMA-Index (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) kann die beste Aussagekraft erreicht werden [Anastasi E, 2010].

Viele neue Tumormarker werden momentan untersucht in der Hoffnung, dass durch diese ein günstiges und effektives Screeningverfahren für das Ovarialkarzinom möglich wird. In einer Studie aus Australien konnte gezeigt werden, dass ein Ovarialkarzinom im Frühstadium mit Hilfe einer Summe von Markern (CA-125; C-reactive protein (CRP); Serum amyloid A (SAA); Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8)) effektiver diagnostiziert werden konnte als alleine mit CA125 [Edgell et al., 2010]. Bisher wird allerdings noch keiner dieser neuen Marker standardmäßig in den Kliniken verwendet.

1.1.5 Histologie

Es können verschiedene histologische Unterformen des Ovarialkarzinoms unterschieden werden [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Die histologische Differenzierung ist wichtig, um eine mögliche Aussage über die Prognose zu machen und die Patientin adäquat therapieren zu können.

- Seröses Karzinom
low-grade (LGSC) und high grade (HGSC)
- Muzinöses Karzinom
Sie entwickeln sich häufig aus einem benignen Tumor (Zystadenom) über die Zwischenstufe des Borderline Tumors zu einem invasiven Karzinom (vgl. Adenom-Karzinom Sequenz der kolorektalen Karzinome)
- Seromuzinöses Karzinom (1/3 mit einer atypischen Endometriose assoziiert)
- Endometrioides Karzinom (z.T. mit einer atypischen Endometriose assoziiert)
- Klarzelliges Karzinom (z.T. mit einer atypischen Endometriose assoziiert)
- Undifferenzierte Karzinome (meist im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert)
- Maligner Brenntumor
- Karzinosarkom (Maligner Müllerscher Mischttumor)

Diese Subtypen der Karzinome lassen sich wiederum in Typ-1 und Typ-2 Tumore differenzieren.

Zu den Typ-1 Karzinomen (ca. 25% der Ovarialkarzinome) zählen low-grade seröse Karzinome, endometrioides Karzinome, seromuzinöse Karzinome, muzinöse Karzinome, klarzellige Karzinome und maligne Brenntumoren. Diese werden häufig in einem frühen Tumorstadium diagnostiziert.

Die high-grade serösen Karzinome, die gemischten Karzinome mit Ausnahme des seromuzinösen Typs und Karzinosarkome zählen zu der Gruppe der Typ-2 Tumoren (ca. 75% der Ovarialkarzinome). Diese sind für ca. 90% der Mortalität des Ovarialkarzinoms ursächlich [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Als Vorstufe der high grade serösen Malignome werden seröse tubare intraepitheliale Karzinome angenommen. Somit entstehen diese in der Tube und breiten sich dann auf das Ovar oder Peritoneum aus [M.Mackelenbergh, 2015].

Um die verschiedenen Karzinomentitäten zu differenzieren können immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden (WT1, p53, Napsin A, Progesteronrezeptor) [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Eine histopathologische Einteilung der Karzinome erfolgt mit Hilfe des Grading wobei hier Architektur, Kernpleomorphie und die Mitosenzahl berücksichtigt werden.

Grading:

- GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- G1 gut differenziert
- G2 mäßig differenziert
- G3 schlecht differenziert
- G4 undifferenziert

Der prognostische Wert dieser Einteilung konnte an einem Münchner Kollektiv von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom bestätigt werden [Mayr and Diebold, 2000].

Das Ansprechen des Ovarialkarzinomgewebes auf eine Chemotherapie wird mit dem Regressionsgrad angegeben.

Regressionsgrad:

- 1 keines oder minimales Tumoransprechen
- 2 partiales Tumoransprechen
- 3 komplettes oder nahezu komplettes Tumoransprechen

Borderlinetumoren zeigen nicht invasiv wachsende Neoplasien mit Atypien, die mehr als 10% des Gesamtepithels ausmachen. Auch diese werden in Subtypen aufgeteilt (seröser- 50-55%, muzinöser- 40-45%, endometrioider-, klarzelliger-, seromuzinöser-, Brenner-Borderlinetumor) [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

1.1.6 Stadien

Die Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms erfolgt nach der FIGO-Klassifikation (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) und der darin integrierten TNM Klassifikation. Die Karzinome des Ovar, der Tube und des Peritoneums werden auf Grund der gemeinsamen Genese und Histomorphologie gemeinsam klassifiziert [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

TNM	FIGO	Ursprung
Tov	OV	Ovar
Tft	FT	Tube
Tp	P	Peritoneum
TX	X	kann nicht bestimmt werden

Tabelle 1: TNM und FIGO Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms, Teil 1 [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben begrenzt
T1a	IA	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
T1c1	IC1	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
T1c2	IC2	präoperative Kapsel (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beiden Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen \leq 10mm
N1b	IIIAii	Metastasen $>$ 10mm
T3a jedes N	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens $<$ 2cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens $>$ 2cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen, schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguß mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen des Leber und/oder Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschl. inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

Tabelle 2: TNM und FIGO Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms, Teil 2 [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]

1.1.7 Therapie

Durch eine radikale Operation und eine anschließende Chemotherapie konnte das Überleben der Patientinnen in den letzten Jahren deutlich verbessert werden.

Operative Therapie

Die operative Therapie stellt den wichtigsten Pfeiler in der Versorgung von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom dar. Eine Metaanalyse, bei der 53 Studien und insgesamt 6885 Patientinnen im FIGO Stadium III und IV untersucht wurden zeigte, dass die Größe des nach einer Operation verbliebenen Tumorrestes direkt proportional zum Überleben ist [Bristow et al., 2002].

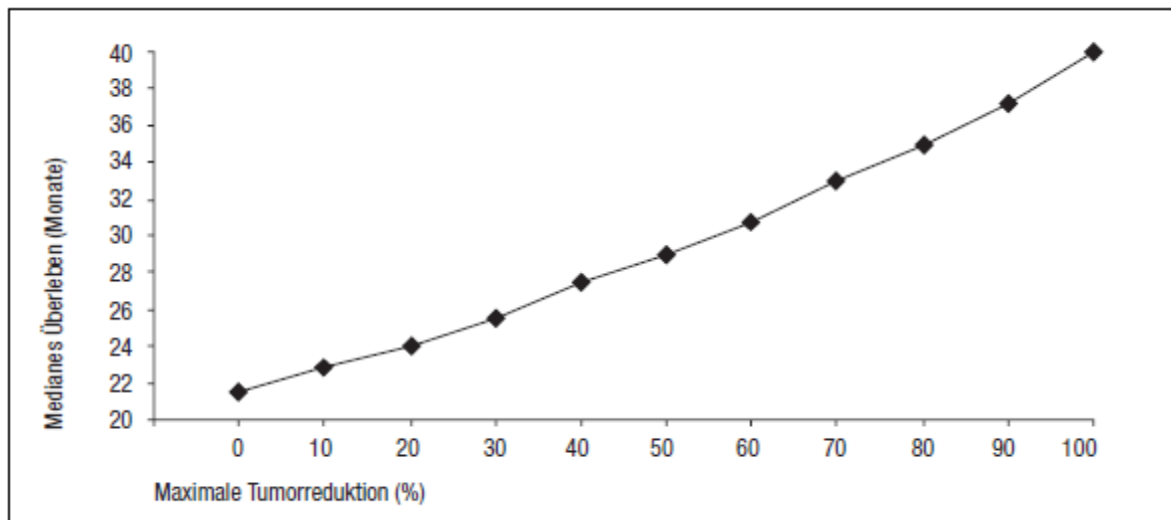


Abbildung 1: medianes Überleben in Abhängigkeit von der Tumorreduktion ($p < 0,001$) modifiziert nach [Bristow et al., 2002], [Prof.Dr.Barbara Schmalfeldt, 2007]

Ziel der Operation sollte somit immer eine möglichst komplette Resektion des Tumors mit einem Resttumor von unter 1cm sein. Eine optimale Tumorreduktion hat allerdings nicht nur einen Vorteil für die Dauer des rezidivfreien Überlebens, sondern beeinflusst auch die Lebensqualität der Patientinnen [Prof.Dr.Barbara Schmalfeldt, 2007].

Eine Operation beim Ovarialkarzinom muss folgende operative Schritte beinhalten: Längslaparotomie, Inspektion und Palpation der gesamten Abdominalhöhle, Zytologie, Biopsien aus allen auffälligen Stellen, Peritonealbiopsien aus unauffälligen Stellen, Adnexektomie bds., Hysterektomie, Appendektomie (bei muzinösem bzw. unklarem

Histologietyp), Omentektomie (mind. Infrakolisch) und die pelvine und paraaortale Lymphonodektomie [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Einzig beim unilateralem Ovarialkarzinom Stadium FIGO IA Grad 1 (ggf. Grad 2) kann eine fertilitätserhaltende Operation durchgeführt werden [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)], das bedeutet die alleinige Entfernung des erkrankten Ovars unter Belassung des Uterus mit dem kontralateralen Ovar. Im fortgeschrittenen Tumorstadium ist bei makroskopisch kompletter Resektion sowie klinisch und bildgebend unauffälligen Lymphknoten die Lymphonodektomie nicht sinnvoll [Barbara Schmalfeldt, 2018].

Systemische Therapie

Die Chemotherapie stellt einen weiteren wichtigen Pfeiler in der Therapie des Ovarialkarzinoms dar. Hierbei wird in der Regel in der *first line* Therapie Carboplatin mit einem Taxan (Paclitaxel) kombiniert. Diese Kombination erzielt die besten progressionsfreien Überlebenszeiten beim Ovarialkarzinom. Cisplatin wird auf Grund seiner starken Nebenwirkungen heute eher nicht mehr verwendet und kann durch Carboplatin ersetzt werden [Prof.Dr.Barbara Schmalfeldt, 2007].

Treatment agent	Alopecia	Taste changes	Depression/mood changes	Weight changes	Sexual dysfunction	Ototoxicity	Constipation	Fatigue (weakness)	Flu-like syndrome	Peripheral neuropathy	Neutropenia	Anemia	Thrombocytopenia	Diarrhea	Mucositis/stomatitis	Moderate nausea +/- vomiting	Severe nausea +/- vomiting	Hand-Foot syndrome	Headache	Nephrotoxicity	Anorexia	Shortness of breath	Edema	Hot flashes
Carboplatin ^b	—	x	—	—	—	—	—	X	—	x	X	X	X	—	—	X	—	—	—	x	—	—	—	—
Cisplatin ^b	x	x	—	—	—	x	x	x	x	x	X	X	X	—	—	—	X	—	—	X	x	—	—	—
Paclitaxel ^b	X	x	—	—	—	—	—	—	—	X	X	X	X	X	X	X	—	—	—	—	—	—	x	—

Abbildung 2: Nebenwirkungen der *first line* Chemotherapie beim Ovarialkarzinom im Vergleich zu Carboplatin (modifiziert nach [Sun CC, 2007])

In 70 – 90% der Fälle findet sich ein Ansprechen auf die Polychemotherapie, in 40% sogar eine Vollremission [K.Goerke, 2008]. Einzig im Stadium IA G1 (Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, keine malignen Zellen in Aszites und Peritonealflüssigkeit) kann auf eine Chemotherapie verzichtet werden. Im Stadium I-IIA (außer Stadium IA G1) benötigen die Patientinnen eine platinhaltige Chemotherapie (Carboplatin Mono, 6

Zyklen). Durch diese systemische Therapie kann das Risiko für ein Rezidiv minimiert und eine Verlängerung des Gesamtüberlebens erzielt werden. In Tumorstadien ab FIGO IIB wird eine kombinierte Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel für 6 Zyklen empfohlen. Eine Dosissteigerung oder die Gabe von zusätzlichen Zytostatika wird außerhalb klinischer Studien nicht empfohlen.

Das Ansprechen einer Chemotherapie ist besser, wenn eine BRCA-Mutation vorliegt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen einer BRCA1- und BRCA2-Mutation [R.K.Schmutzler, 2014].

Eine neoadjuvante Chemotherapie wird, auch nach den aktuellen Daten der AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie), nicht als Standardtherapie empfohlen [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Das Ovarialkarzinom breitet sich häufig entlang des Peritoneums aus, so dass eine intraperitoneal applizierte Chemotherapie, eine seit vielen Jahren untersuchte Therapie, ist. Durch eine intraperitoneale Gabe steigt die Konzentration des Chemotherapeutikums an seinem Wirkungsort deutlich an, verglichen mit der iv Gabe [Daniel Böhm, 2012]. Analysen nach Cochrane zeigten, dass mittels einer zusätzlichen intraperitonealen Applikation des Chemotherapeutikums eine gesteigerte Wirksamkeit erreicht werden kann [Daniel Böhm, 2012]. Entscheidender Nachteil der lokal applizierten Chemotherapie ist die deutlich steigende Toxizität und damit eine Abnahme der Lebensqualität der therapierten Patientinnen. Die AGO empfiehlt auch deshalb eine intraperitoneale Applikation bisher nur im Rahmen von klinischen Studien [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Die gleiche Empfehlung betrifft auch die HIPEC (hypertherme intraperitoneale Chemotherapie). Bei dieser wird intraoperativ nach erfolgter Tumorresektion der Bauchraum mit chemotherapiehaltiger 42°C warmer Lösung gespült [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Neue Therapiemöglichkeiten des Ovarialkarzinoms

Ziel der Tumorforschung ist es, die komplexen Vorgänge, welche zur Entstehung eines Karzinoms führen, zu verstehen und daraus neue Therapeutika zu entwickeln. Monoklonale Antikörper erlangen hierbei immer mehr Bedeutung.

2 große Phase III Studien (AGO-OVAR 11 und GOG-218) mit 3400 Patientinnen haben erstmals seit 10 Jahren eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens in der First line Therapie gezeigt [S.Mahner, 2010]. In beiden Studien wurde die Wirkung von Bevacizumab in der *First line* Therapie untersucht. Bevacizumab ist ein rekombinanter Antikörper gegen den Wachstumsfaktor VEGF (Vascular endothelial growth factor). VEGF stimuliert die Tumorangiogenese, einen wichtigen Faktor für das Wachstum des Tumors, ist für den Übergang von benignen zu malignen Tumoren mitverantwortlich, steigert die Permeabilität von Arterien und Venen und erhöht das Risiko für Peritonealmetastasen und Ascites [Burger RA, 2007]. Die Bevacizumabgabe parallel zur Chemotherapie und als Erhaltungstherapie für 12 bzw. 15 Monate brachte ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben [Perren et al., 2011], und ein in Subgruppen verlängertes Gesamtüberleben [Oza and et al, 2015].

Auf Grund dieser Daten wurde Bevacizumab (15 mg/kg) in Kombination mit einer Chemotherapie für die Therapie des Ovarialkarzinoms im FIGO Stadium IIIB, IIIC und IV im Dezember 2011 zugelassen. Seit Oktober 2012 ist Bevacizumab auch für die Rezidivtherapie eines platinsensiblen Ovarialkarzinoms zugelassen. Grundlage für diese Zulassungserweiterung war die OCEANS Studie [Koczorek Michael, 2012].

Rezidivtherapie

Bei einem Rezidiv wurde bisher zwischen einem platinrefraktärem (Rezidiv innerhalb von 6 Monaten nach Abschluss der Primärtherapie) und einem platinsensiblen Ovarialkarzinom (Rezidiv länger als 6 Monaten nach Abschluss der Primärtherapie) differenziert. Inzwischen wird die Art der Rezidivbehandlung an Hand klinischer, zytologischer und radiologischer Befunde festgelegt und nicht mehr allein an Hand des Zeitintervalls bis zum Auftreten eines Rezidivs.

Bei einem platinresistenten Rezidiv, bzw. einem Rezidiv, bei dem eine platinhaltige Therapie nicht sinnvoll ist, sollte vor allem der Erhalt der Lebensqualität eine wichtige Rolle spielen. Möglich ist zusätzlich die Monotherapie mit pegyliertem liposomalem Doxorubicin, Gemcitabin, Paclitaxel oder Topotecan, die letzten beiden bei nicht Taxan vorbehandelten Patientinnen. Die Kombinationstherapie bringt keinen Vorteil. Die zusätzliche Gabe von Bevacizumab ist bei nicht vorbehandelten

Patientinnen möglich. Endokrine Therapieansätze (GnRH Analoga, Tamoxifen) sind einer Monochemotherapie unterlegen und lediglich dann sinnvoll, wenn eine Chemotherapie nicht möglich ist, oder von der Patientin nicht gewünscht wird [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Beim platinsensiblen Rezidiv, bzw. einem Rezidiv bei dem eine platinhaltige Therapie sinnvoll ist, ist allerdings die platinhaltige Kombinationstherapie der Monotherapie überlegen (Carboplatin/Gemcitabin+/-Bevacizumab, Carboplatin/peglyiertes liposomales Doxorubicin, Carboplatin/Paclitaxel+/-Bevacizumab). Das progressionsfreie Überleben und die Ansprechrate auf die Chemotherapie konnte durch die Zugabe von Bevacizumab verbessert werden [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Eine neue Therapie mit PARP-Inhibitoren konnte das progressionsfreie Überleben der Patientinnen nach einem Rezidiv verlängern. PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerasen) sind für die DNA Reparatur von Einzelsträngen zuständig und schützen so die DNA vor dem Abbau. Werden diese Polymerasen durch die Inhibitoren gehemmt, so kann der DNA Schaden der Tumorzelle nicht repariert werden und es kommt zur Apoptose. Der PARP-Inhibitor Olaparib (Lynparza) wurde zunächst bei BRCA mutierten Patientinnen zur Erhaltungstherapie bei einem platinsensiblen Rezidiv nach Gabe der 2. Chemotherapie zugelassen. In BRCA mutierten Zellen können Doppelstrangbrüche nicht repariert werden. Durch Gabe eines PARP-Inhibitors kommt es zur fehlenden Einzelstrangreparatur und so zu einem Doppelstrangbruch in der replizierten Zelle, welcher durch die BRCA Mutation nicht behoben werden kann, und so zur Apoptose der Zelle führt [TESARO Bio Germany GmbH, 2018]. Seit 1. Juni 2018 ist Lynparza für alle Patientinnen mit einem platinsensitiven Rezidiv zugelassen, unabhängig vom BRCA Status [Astra Zeneca GmbH, 2018]. Ein weiterer PARP Inhibitor Niraparib (Zejula) kann auch unabhängig von einer BRCA Mutation beim Rezidiv des platinsensiblen Ovarialkarzinoms als Erhaltungstherapie gegeben werden. In der NOVA-Studie zeigte sich ein verlängertes progressionsfreies Überleben durch die Gabe von Niraparib [TESARO Bio Germany GmbH, 2018]. Rucaparib kann bei mindestens zweifach platinhaltig vortherapierten Patientinnen mit platinsensitivem, high-grade Ovarialkarzinom angewandt werden und verlängert das progressionsfreie Überleben unabhängig vom BRCA Status [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)].

Vor allem in der Rezidivtherapie ist es wichtig, auf die substanzspezifischen Nebenwirkungen und auch die individuellen Wünsche der Patientin einzugehen.

Substanz	Nebenwirkungen
Carboplatin	Myelosuppression, Emesis, allergische Reaktionen, Hautreaktionen, Alopezie
Gemcitabine	Myelosuppression
Paclitaxel	Myelosuppression, Alopezie, allergische Reaktionen, Kardiotoxizität, Emesis
Pegyliertes liposomales Doxorubicin	Hautreaktion, Mukositis, Myelosuppression
Topotecan	Myelosuppression, Emesis, Alopezie

Tabelle 3: Nebenwirkungen der Chemotherapeutika (modifiziert nach [Karow T., 2012])

Weitere Therapieansätze

Die Strahlentherapie hat in der Therapie des Ovarialkarzinoms keine Bedeutung mehr und wurde weitgehend von der Chemotherapie verdrängt. In einer Metaanalyse von Winter-Roach et al. [Winter-Roach et al., 2003] konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer Chemotherapie, und einer Bestrahlung in Bezug auf das rezidivfreie Überleben, sowie das Gesamtüberleben gezeigt werden.

Viele Untersuchungen laufen momentan zur Erforschung immunonkologischer Therapieansätze mit Checkpointinhibitoren, um die Therapie des Ovarialkarzinoms weiter zu entwickeln. Diese werden momentan im mehreren Phase-III Studien untersucht. So wird in der DUO-O Studie der PD-L1-Inhibitor (programmed cell death ligand1 Inhibitor) Durvalumab in Kombination mit einer Chemotherapie und Bevacizumab untersucht. Ergebnisse werden 2025 erwartet [Harter P., 2019].

Ein weiterer Therapieansatz ist der adoptive Zelltransfer, bei dem Lymphozyten der Patientin gewonnen werden und dann im Labor gegen Tumorzellen sensibilisiert werden. Diese werden anschließend der Patientin reinfundiert. Untersucht wird diese Therapieform momentan in Phase I/II Studien [Pedersen M, 2018].

80% der Ovarialkarzinome exprimieren auf der Zelloberfläche Folatrezeptoren. Somit kann Vintafolid (bestehend aus Folsäure, einem Linkermolekül und dem Vinca-Alkaloid Desacetylvinblastin) über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden und dort zytotoxisch wirken. In der Phase-II- Studie PRECEDENT konnte ein verlängertes progressionsfreies Überleben bei Kombination von Vintafolid mit Doxorubicin im

Vergleich zur Monotherapie mit Doxorubicin beim platinresistenten Ovarialkarzinom gezeigt werden [MSD Sharp & Dohme GmbH, 2013].

1.1.8 Mortalität und Prognose

Die Mortalität des Ovarialkarzinoms nimmt seit 1980 kontinuierlich ab, obwohl die Inzidenz nahezu gleich bleibt. Das 5-Jahres-Überleben liegt für alle Stadien bei ca. 43% [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Ein Großteil der Karzinome wird aber erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, was eine der Ursachen für die hohe Mortalität ist.

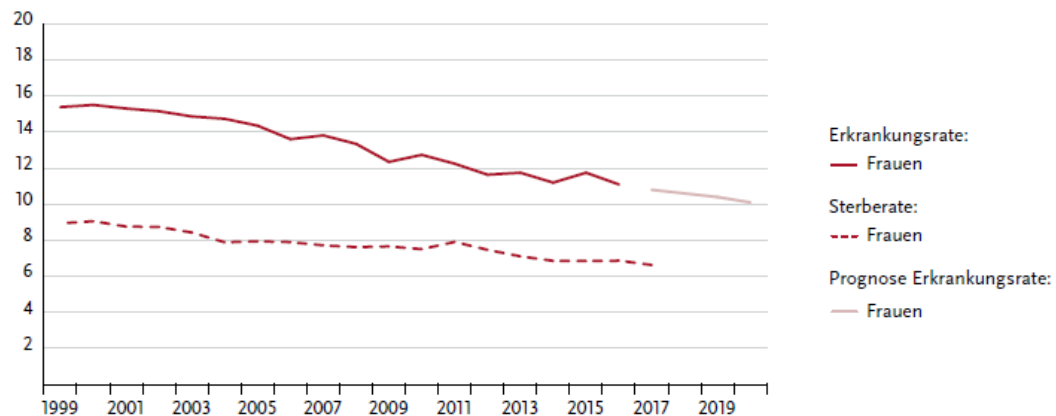


Abbildung 3: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten in Deutschland 1999-2019, Prognose (Inzidenz) bis 2020; Fälle pro 100.000 [Robert Koch Institut, 2021]

Die Prognose des Ovarialkarzinoms wird vor allem durch klinische Parameter, wie dem Alter der Patientin bei Erstdiagnose und dem Allgemeinzustand der Patientin präoperativ beeinflusst. Neben dem Prognosefaktor „postoperativer Tumorrest“ spielt die präoperative Tumorlast eine wichtige Rolle. Die Gynecologic Oncology Group (GOG) hat in einer retrospektiven Studie mit 2655 Patientinnen den Einfluss der präoperativen Tumorlast untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss der präoperativen Tumorausdehnung auf das Überleben der Patientin [Horowitz NS et al., 2015].

Auch nach bestmöglicher Primärtherapie erkranken 75% der Patientinnen mit einem bei Erstdiagnose fortgeschrittenem Tumorstadium an einem Rezidiv eines

Ovarialkarzinoms [I.Meinhold-Heerlein et al., 2011]. Wie bereits erwähnt gibt es große Unterschiede im Überleben, in Bezug auf die verschiedenen FIGO Stadien (FIGO I 5-Jahres-Überleben 90%, FIGO III 25%, FIGO IV 11%).

Ein wesentlicher Prognoseparameter im fortgeschrittenem Stadium ist allerdings der Tumorrest, welcher postoperativ verblieben ist [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)] (sh. auch Abbildung 1, Seite 9).

Der Tumormarker CA125 erlaubt Rückschlüsse auf das postoperative Ansprechen auf die Chemotherapie und den weiteren Verlauf der Erkrankung [Gadducci et al., 2004]. Ein postoperatives Nadir des CA125 unterhalb von 10 U/ml wurde mit einem längeren Überleben assoziiert, als ein Wert zwischen 10 U/ml und 20 U/ml [Crawford and Peace, 2005]. Aber auch weitere Parameter erlauben Rückschlüsse auf das postoperative Überleben, wie zum Beispiel der Hämoglobinwert, der nicht nur einen Einfluss auf die Lebensqualität hat, sondern auch auf das Überleben [Munstedt et al., 2003].

Bei vielen der Ovarialkarzinome konnten somatische genetische Veränderungen (z.B. Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens p53) festgestellt werden, die zum Teil die Dauer des rezidivfreien Überlebens sowie das Gesamtüberleben vorhersagen konnten [Prof.Dr.Barbara Schmalfeldt, 2007]. Weitere Parameter, die beim Ovarialkarzinom untersucht werden sind zum Beispiel Her2-neu (human epidermal growth factor receptor 2), EGFR (Epidermal Growth Factor-Receptor) und der Steroidhormonstatus. Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob diesen Faktoren eine prognostische Bedeutung zukommt [Prof.Dr.Barbara Schmalfeldt, 2007]. Bisher werden diese Marker nur im Rahmen von Studien bestimmt. Diese Studien dienen nicht nur dazu, neue Therapieansätze zu ermöglichen, sondern auch die Prognose der Patientinnen besser abschätzen zu können. So könnten dann die Patienten in Hoch- und Niedrig-Risiko Gruppen eingeteilt werden, und so die Therapien besser individuell auf jede Patientin abgestimmt werden.

1.2 Karzinogenese

Ein Karzinom ist eine Gewebeneubildung, die ohne Koordination mit dem normalen Gewebe und auch unabhängig von dem auslösendem Faktor wächst [Grundmann, 2004]. Karzinome entstehen durch eine Veränderung in der Kontrolle der Zellproliferation und der Interaktion mit der Umgebung der Zelle, was zu invasivem Wachstum und Metastasierung führen kann. Eine Gruppe bestimmter Gene spielt bei der Entstehung eines malignen Tumors eine Rolle.

Protoonkogene, wie zum Beispiel EGF und Thyrosin-Kinasen, haben eine Bedeutung bei der Regulation der Zellproliferation. Durch Mutationen werden diese Regulatorgene zu Onkogenen, welche ein unkontrolliertes Wachstum des Tumors als Folge haben kann.

1.2.1 Metastasierung

Durch die oben erwähnten Mutationen, die auch die Zellproliferation beeinflussen, erlangen die Tumorzellen die Fähigkeit zur Metastasierung.

Metastasen sind die führende Todesursache bei Karzinompatienten, obwohl nur ein sehr geringer Teil der zirkulierenden Zellen (weniger als 0,05%) es schafft, an einer anderen Stelle im Körper eine Metastase zu bilden [Woodhouse et al., 1997]. Das Ovarialkarzinom kann sich per continuitatem durch die Peritonealflüssigkeit im Bauchraum, dem kleinen Becken und dem Zwerchfell ausbreiten. Lymphogen metastasiert das Ovarialkarzinom in die pelvinen, paraaortalen und paracavalen Lymphknoten. Eine hämatogene Metastasierung ist selten [Kiechle, 2007]. Durch das Verstehen der molekularen Schritte bei der Metastasierung können neue Therapien und diagnostische Verfahren entwickelt werden.

Obwohl die verschiedenen Tumorentitäten sich sehr stark unterscheiden, laufen dennoch für die Metastasierung die gleichen Schritte ab. Die Neoangiogenese ist einer der initialen Schritte der Metastasierung. Die neugebildeten Gefäße sind einerseits wichtig für das Wachstum des Primärtumors, sie erhöhen andererseits aber auch die Chance der Tumorzellen, Anschluss an die Blutzirkulation zu bekommen. Es ist möglich, dass diese neugebildeten Gefäße poröser sind als normale Blutgefäße, und so

das Eindringen der Tumorzellen erleichtert wird [Denijn and Ruiter, 1993]. Zusätzlich fördern Wachstumsfaktoren wie VEGF diese Gefäßneubildung.

Eine wichtige Rolle bei der Invasion der Tumorzellen spielen Zell-Zell- und Zell-Stroma-Interaktionen. Integrine und Cadherine stabilisieren die Gewebeintegrität. Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die kalziumabhängig Zell-Zell Kontakte bewirken. E-Cadherin ist ein Tumorsuppressor. Ein Verlust von E-Cadherin im Ovariakarzinom ist mit einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte assoziiert, und führt so zu einer erhöhten Zellmobilität, sowie einem erhöhtem Metastasierungspotential der Karzinomzellen [Hoffman et al., 1993].

Die Invasion der Tumorzellen in das umliegende Gewebe benötigt die Proteolyse. Diese Invasion läuft unter ähnlichen Bedingungen ab, wie sie auch nicht maligne Zellen unter physiologischen Bedingungen anwenden. Die Einnistung des Trophoblasten im Rahmen der Embryogenese/Plazentaentwicklung und auch die Angiogenese sind Beispiele für eine solche physiologische Invasion [Woodhouse et al., 1997]. Der Unterschied zur Invasion maligner Tumorzellen ist, dass die physiologische Invasion reguliert abläuft und stoppt, sobald der Stimulus nicht mehr vorhanden ist. Eine erhöhte Sekretion proteolytischer Enzyme führt zu einer Zerstörung des umliegenden Gewebes [Grundmann, 2004]. Matrixmetalloproteinasen sind Proenzyme, die die Spaltung der extrazellulären Matrix bewirken, und deren Expressionslevel mit der Aggressivität des Tumors korrelieren [Ray and Stetler-Stevenson, 1994]. Diese spielen somit eine große Rolle bei der Metastasierung eines Karzinoms und stellen einen der möglichen therapeutischen Eingriffspunkte in der Entwicklung von Metastasen dar.

Nicht nur das Zerstören der extrazellulären Matrix, sondern auch die Beweglichkeit der Zellen ist zur Invasion der Tumorzellen nötig. Drei verschiedene Faktoren sind hierbei wichtig: Einerseits gibt es autokrine Faktoren wie Autotaxin (ATX), die die Motilität der Zellen steigern [Stracke et al., 1992]. Zu der zweiten Gruppe gehören Matrixproteine, die die Beweglichkeit der Zellen induzieren. Zu diesen gehört unter anderem Vitronectin, das die Motilität über Integrin-Rezeptoren stimuliert [Ruseva et al., 2009]. Als dritter Faktor spielen parakrine Faktoren wie Interleukin-8 oder Insulin-like-growth factor eine Rolle, die die Tumorzellen zu den sie produzierenden Organen hinziehen (Homing) [Woodhouse et al., 1997].

Metastasierungssuppressorproteine wie z.B. KAI1 wirken diesen Faktoren entgegen und können so die Invasivität einer Zelle beeinflussen.

1.3 KAI1

KAI1 (CD82, C33 oder Kangai) ist ein transmembranöses Glykoprotein aus der Gruppe der *Transmembran 4 Superfamily* (TM4SF) und kann funktionell der Gruppe der Tumorsuppressorproteine zugeordnet werden.

1.3.1 Transmebran 4 Superfiliy (TM4SF)

KAI1 gehört zu der großen Gruppe der transmembranären Glykoproteine, den sogenannten Tetraspaninen (TM4SF). Tetraspanine sind an einer Reihe von biologischen Ereignissen wie der Immunantwort, Spermium-Ei Fusion und dem Auswachsen von Nerven beteiligt. Allgemein regulieren sie die Adhäsion, Proliferation, Differenzierung, Zellaktivierung und Motilität von Zellen [Liu and Zhang, 2006] und sind so zum Teil auch bei der Entstehung von Pathologien wie Karzinomen beteiligt. TM4SF Mitglieder haben einen zytoplasmatischen N- und C-Terminus und durchqueren die Membran vier Mal, wobei sie einen großen und einen kleinen extrazellulären Loop formen [Liu and Zhang, 2006].

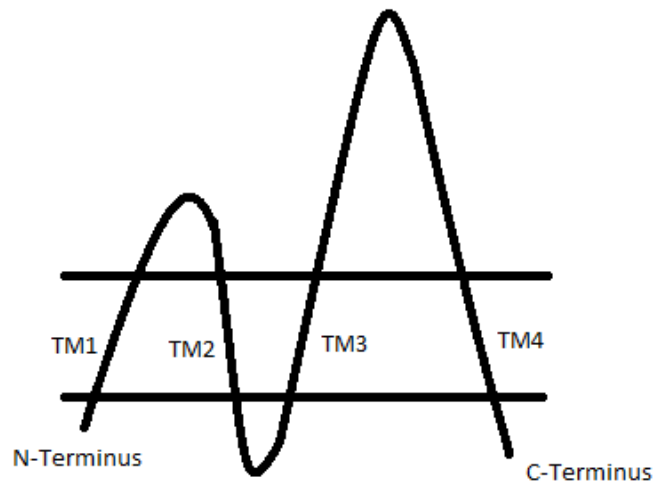


Abbildung 4: KAI1 als Tetraspanin (modifiziert nach [Jackson Paul, 2011])

1.3.2 Wildtyp KAI1

Das KAI1-Gen ist auf dem Chromosom 11 p11.2-13 lokalisiert und wurde erstmals beim Prostatakarzinom als ein Metastasierungssuppressorgen identifiziert [Dong et al., 1995]. In normalen Geweben ist KAI1 ubiquitär verbreitet, zeigt aber vor allem in der Milz und der Niere besonders hohe Konzentrationen [Nagira et al., 1994]. In soliden Karzinomen wie dem Prostatakarzinom [Dong et al., 1997], dem Blasenkarzinom [Ow et al., 2000] und dem nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom [Higashiyama et al., 1998] ist KAI1 mit einer besseren Prognose der Karzinompatienten assoziiert. Dahingegen korreliert eine Herunterregulierung oder ein Verlust von KAI1 direkt mit einer schlechteren Prognose in verschiedenen Karzinomen wie Prostata, Lunge, Pankreas, Brust und Ovar [Dong et al., 1996; Adachi et al., 1996; Guo et al., 1996; Huang et al., 1998; Liu et al., 2000].

Eine Überexpression von KAI1 hemmt nicht nur die Zellmigration in vitro, sondern unterdrückt im Tiermodell auch die Metastasierung des Karzinoms [Yang et al., 2001]. Durch die Interaktion mit verschiedenen anderen Proteinen hat KAI1 Einfluss auf die Zellaggregation [Jee et al., 2003], die Zelladhäsion [Takaoka A, 1998] sowie die Beweglichkeit und Invasivität einer Zelle [Takaoka et al., 1998]. Eine weitere Funktion von KAI1 ist die Induktion der Apoptose [Schoenfeld et al., 2004], was dazu führt, dass Zellen, die eine maligne Transformation durchgemacht haben, eliminiert werden und so der Entstehung eines Karzinoms entgegen gewirkt wird.

KAI1 Funktion als Metastasierungssuppressor

Der genaue Wirkmechanismus von KAI1 ist vielfach noch unverstanden. Wahrscheinlich erzielt der Metastasierungssuppressor seine Effekte unter anderem durch eine Interaktion mit anderen Proteinen aus dem Tetraspanin Verbund, dem sogenannten Tetraspanin-Web, wie z.B. mit den Immunorezeptoren MHC-I und MHC-II, mit Molekülen der Zelloberfläche (CD4, CD8, CD19, CD21), mit Integrinen und dem EGF Rezeptor [Tonoli and Barrett, 2005].

Die Interaktion, die KAI1 mit seinen Bindungspartnern eingeht, kann dabei auf unterschiedliche Weise passieren. Durch einen *touch and down* Mechanismus reguliert KAI1 die Funktion anderer Mitglieder des Tetraspanin-Web, indem es die Endozytose

der Proteine, mit denen es in Kontakt steht, bewirkt. KAI1 kann alternativ Einfluss nehmen auf Lokalisation und Interaktion seiner Bindungspartner (*physical hindrance* Mechanismus). So interagiert KAI1 direkt mit Integrinen und dem EGF-Rezeptor. Der EGF Rezeptor (Epidermal growth factor Rezeptor) ist direkt mit KAI1 assoziiert, und eine Überexpression von KAI1 führt zu einer supprimierten EGF-induzierten Zell-Migration [Odintsova et al., 2000].

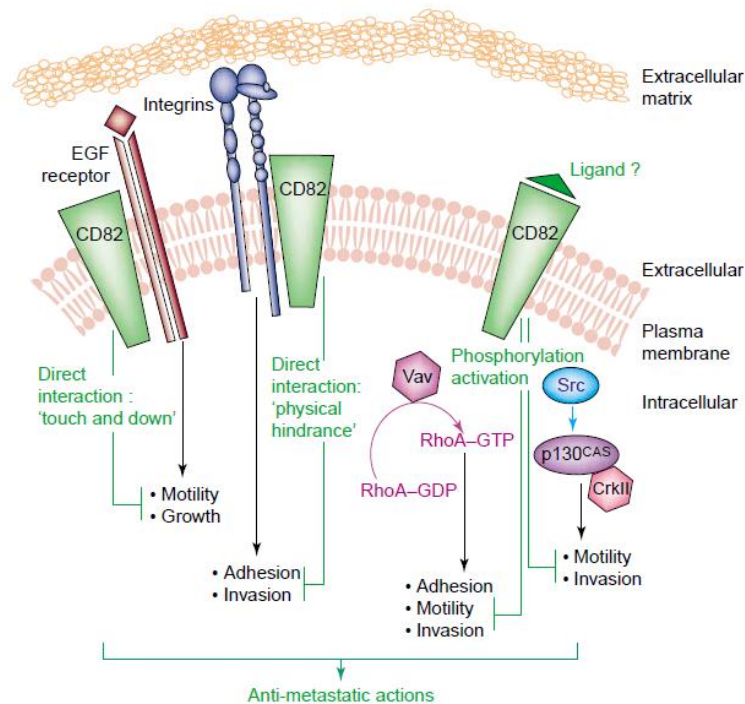


Abbildung 5: KAI1 (CD82) Einfluss auf Zellmotilität, Invasion, Adhäsion [Tonoli and Barrett, 2005]

Interaktion mit Integrinen

Integrine sind, wie auch die Cadherine, transmembranäre Glykoproteine, die bei der Adhäsion von Tumorzellen an der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen. Sie bestehen aus einer α -Kette und einer β -Kette, verbunden durch nicht kovalente Bindungen. Integrine binden Moleküle der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Kollagen, und sind so an der Signalübertragung über die Zellmembran in beide Richtungen beteiligt. Beim sog. *Inside-Out signaling* werden Informationen aus dem Zellinneren nach außen vermittelt. Über die Bindung von Proteinen an die intrazelluläre

Bindungsstelle der Integrine wird die Konformation des Intergrins so verändert, dass es zu einer stärkeren Bindung des extrazellulären Liganden kommt. Somit nehmen die Integrine Einfluss auf die Zelladhäsion und –migration. Bei der Signalübertragung extrazellulärer Reize, dem sog. *Outside-In signaling* führt die Bindung von Liganden an den Integrinen zu einer Clusterbildung der Integrine. Dies führt zu Veränderungen der Zellstruktur und hat Einfluss auf das Überleben und die Proliferation der Zelle [Sanford J.Shattil, 2010]. Sie sind so an jedem Schritt einer Metastasierung beteiligt und beeinflussen das Überleben der Tumorzellen sowie die Tumorzellmigration und Invasion [Felding-Habermann, 2003].

Aufgrund der Bedeutung der Integrine in der Zelladhäsion und Migration erscheint es sehr wahrscheinlich, dass zumindest einige Integrine an der Funktion von KAI1 als Metastasierungssuppressor beteiligt sein könnten. KAI1 beeinflusst dabei die Integrin-abhängige Adhäsion und Signalweitergabe. So wurde berichtet, dass KAI1 einerseits zu einer verstärkten Internalisierung von Integrinen führte, was in einer verringerten Expression an der Zelloberfläche, und so einer verminderten Zelladhäsion und Migration resultierte. Andererseits führte KAI1 auch zu einer direkten Veränderung der Integrin-abhängigen Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix [Liu and Zhang, 2006].

Lee et al. haben gezeigt, dass die aktive Form von $\beta 1$ -Intergrin an der Zelloberfläche durch eine KAI1 Expression vermindert wurde, was mit der durch KAI1 gesteuerten Reduktion der Zelladhäsion an Fibronectin korreliert [Lee et al., 2011a].

Eine besondere Rolle beim Ovarialkarzinom kommt dem Integrin $\alpha v \beta 3$ zu, indem es dort die Tumorzellmigration und –invasion beeinflusst. Eine $\alpha v \beta 3$ Expression auf zirkulierenden Tumorzellen führte zu einem erhöhten Risiko der Metastasenbildung und steigerte die Motilität der Zellen [Hapke et al., 2003]. Es konnte dargestellt werden, dass KAI1 und Integrin $\alpha v \beta 3$ auf der Zelloberfläche von Ovarialkarzinomzellen direkt oder indirekt miteinander interagieren. Zellen, die KAI1 forciert exprimierten, zeigten eine gesteigerte Zelladhäsion an Vitronectin, aber eine verminderte Motilität, verglichen mit Zellen, die nur Integrin $\alpha v \beta 3$ exprimierten. Hapke et al. vermuten, dass die Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen an Vitronectin hauptsächlich über das Integrin $\alpha v \beta 3$ gesteuert wird. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Interaktion von KAI1 mit Integrin $\alpha v \beta 3$ eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion und Migration von Ovarialkarzinomzellen spielt.

Einfluss von KAI1 auf die Zellmotilität und Invasion

In verschiedenen Karzinomentitäten konnte eine Hochregulierung der Serinprotease uPA (Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator) festgestellt werden [Andreasen et al., 1997; Bevan and Mala, 2008]. UPA führt zur Aktivierung der Fibrinolyse und spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, Invasion und Metastasierung verschiedener Tumorentitäten [Duffy, 1996].

In Anwesenheit von KAI1 konnten Bass et al. [Bass Rosemary et al., 2005] eine 50fach niedrigere Plasminogen Aktivierung zeigen, und somit eine schwächere Aktivierung der Fibrinolyse. Der Rezeptor für uPA (uPAR) war zwar weiterhin auf der Zelloberfläche exprimiert, konnte aber uPA nicht binden. KAI1 interagiert nicht direkt mit uPAR, führt aber zu einer Umverteilung von uPAR, der dann mit $\alpha 5\beta 1$ -Integrin interagiert. Durch diese Assoziation kann uPAR seinen Liganden uPA nicht binden, was zu einer verminderten Proteolyse der extrazellulären Matrix führt. Eine Hemmung der uPA-Aktivität führte im Tiermodell zu einer reduzierten Tumorprogression [Bass Rosemary et al., 2005]. Ein möglicher Mechanismus über den KAI1 seine Funktion als Metastasierungssuppressor ausübt, könnte also auch über eine verminderte Aktivität der Protease uPA funktionieren.

Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom führt eine Überexpression von KAI1 zu einer E-Cadherin abhängigen Zell-Zell-Adhäsion. KAI1 erreicht dies über eine Stabilisierung des E-Cadherin/ β -Catenin Komplexes, welcher die Dissemination von Tumorzellen verhindern kann [Tsai YC, 2011]. Durch eine Interaktion mit E-Cadherin kann KAI1 die E-Cadherin abhängige interzelluläre Bindung stabilisieren und so möglicherweise einen Einfluss auf das Metastasierungspotential einer Zelle nehmen [Abe et al., 2008].

Ein weiterer Mechanismus, über den KAI1 Einfluss auf die Zellmotilität und Invasion nimmt, ist über die Modulation von Rezeptorthyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor: KAI1 ist direkt mit dem EGF-Rezeptor (Epidermal-Growth-Factor-Receptor, EGFR) assoziiert, wie Odintsova et al. zeigen konnten [Odintsova et al., 2000]. Die Expression von KAI1 auf epithelialen Zellen verminderte die EGF induzierte Zellmigration. Die initiale Aktivierung des EGF-Rezeptors ist in Zellen, die KAI1 exprimieren, nicht verändert, sondern es kommt zu einer schnelleren Desensibilisierung von EGF induzierten Signalwegen, die mit einer steigenden Endozytose des Rezeptors

assoziiert ist. Der EGF-Rezeptor gehört zur Familie der ErbB-Familie, einer Gruppe von vier Rezeptor-Thyrosin-Kinasen, die in verschiedene Aspekte der embryonalen Entwicklung, der Gewebedifferenzierung und der Tumorprogression involviert sind. In einer folgenden Studie konnten Odintsova et al. zeigen, dass KAI1 ein Regulator der Kompartimentierung und Dimerisierung der ErbB Rezeptoren ist [Odintsova et al., 2003] und so seine Wirkung auf den EGF-Rezeptor ausübt.

Einfluss von KAI1 auf die Apoptose und Zellalterung

Ein wichtiger Schritt bei der Bildung von Metastasen ist das Überleben der Tumorzellen an der neuen Lokalisation. Fibrosarkomzellen, in denen hohe KAI1 Konzentrationen exprimiert wurden, zeigten eine gesteigerte Apoptoserate, nachdem sie in die Schwanzvene von Mäusen injiziert worden waren [Tsai YC, 2007].

Eine Möglichkeit wie KAI1 die Apoptose induziert, ist die Bildung von *Reactive oxygen intermediates* (ROIs), wie Schoenfeld et al. erforscht haben [Schoenfeld et al., 2004]. Normalerweise werden diese ROIs von der Atmungskette gebildet, können aber auch zum Beispiel von dem Endoplasmatischen Retikulum gebildet werden.

DARC (Duffy antigen/receptor for chemokines) ist ein Protein, das auf Erythrozyten und Endothelzellen exprimiert wird und mit KAI1 interagiert. Diese Interaktion führt zu einer Alterung der Karzinomzellen, die KAI1 exprimieren, während Zellen, die kein KAI1 exprimieren weiter proliferieren können, einem wichtigen Schritt der Karzinogenese [Iizumi M, 2007].

Wie es zu einer Herunterregulierung von KAI1 in invasiven Karzinomen kommt, ist nicht nur wichtig, um zu erfahren wie es zu der Invasivität von Karzinomzellen kommt, sondern auch um mögliche klinische Fortschritte in der Therapie der Karzinome zu erreichen. Durch Regulation der Transkription von KAI1 kann die Konzentration der KAI1 mRNA reguliert werden [Liu and Zhang, 2006]. Eine Methylierung des Promotors oder ein „Loss of Heterozygosity“ der KAI1 Region spielen wohl keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Herunterregulierung von KAI1 [Jackson Paul, 2011]. Dagegen kann das Entstehen alternativer Spleißvarianten eine weitere Möglichkeit sein, wie es zu einer Funktionseinschränkung von KAI1 kommen könnte.

1.3.3 Spleiß-Isoformen von KAI1

Spleiß-Isoform mit Deletion des Exon 7

Eine Spleißvariante des KAI1 wurde als erstes beim Magenkarzinom von Lee et al. 2003 entdeckt [Lee et al., 2003]. Bei dieser Spleißvariante fehlt das Exon 7, eine 84 Basenpaare lange Sequenz.

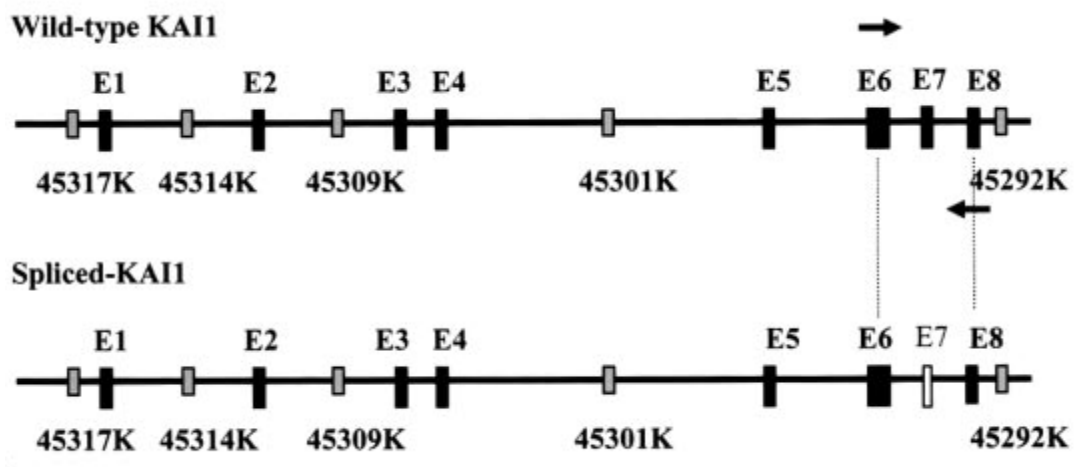


Abbildung 6: Genomische Organisation KAI1, Exon 7 fehlt bei Spleißisoform von KAI1, Exons ■, Introns ■ [Lee et al., 2003]

Das Exon 7 besteht aus 28 Aminosäuren, die sich vom distalen Part des zweiten extrazellulären Loops bis zur vierten transmembranären Domäne erstreckt. Somit unterscheidet sich KAI1- Δ ex7 von dem Wildtyp-KAI1 im zweiten extrazellulären Loop.

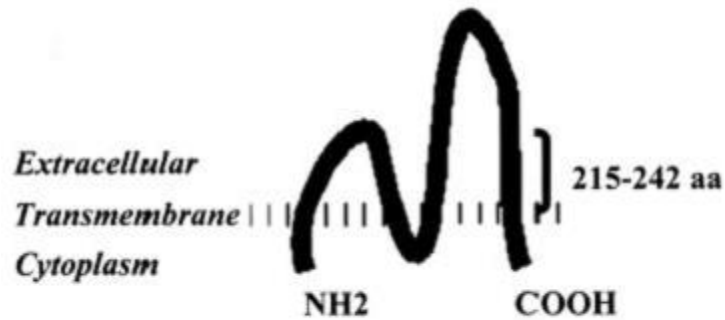


Abbildung 7: Schematische Darstellung des KAI1 Proteins, Wildtyp KAI1 hat 2 extrazelluläre Loops, 2 intrazelluläre Strecken und 4 Transmembrandomänen. KAI1- Δ ex7 fehlen 28 Aminosäuren (215-242 aa) [Lee et al., 2003]

Welchen Einfluss die Veränderung von KAI1 auf die Funktion in vivo hat versuchten Lee et al. zu zeigen, in dem sie Mäusen Wildtyp KAI1 und KAI1- Δ ex7-Zellen injizierten. Alle Mäuse mit KAI1- Δ ex7-Zellen entwickelten Tumore, während es bei den Mäusen mit KAI1 Wildtyp Zellen nur in 70% der Fälle zur Bildung von Tumoren kam.

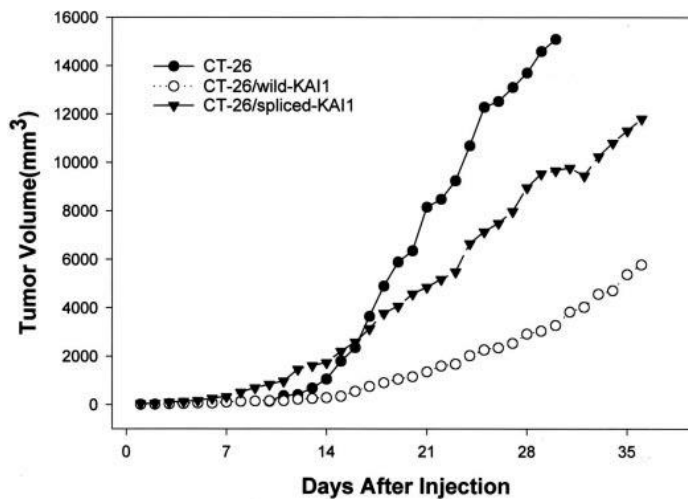


Abbildung 8: Effekt von Wildtyp KAI1 und Spliced KAI1 Expression auf die Tumorentwicklung in vivo. Pro Gruppe waren 10 Mäuse mit den jeweiligen Zellen behandelt worden. Das Tumorumfang wurde jeden Tag gemessen, bis 5 Wochen nach der Injektion [Lee et al., 2003].

Durch alternatives Spleißen scheinen die tumorsuppressiven Eigenschaften des KAI1 unterdrückt zu werden. Lee et al. fanden in den Mäusen, denen KAI1- Δ ex7-Zellen injiziert worden waren, Metastasen in der Lunge (5 von 5 Mäuse), Leber (3 von 5 Mäuse), und im Peritoneum (2 von 5 Mäuse). Bei den Mäusen mit KAI1 Wildtyp-Zellen waren Metastasen lediglich in der Lunge (1 von 5 Mäuse) und der Leber (1 von 5 Mäuse) vorhanden. Die Expression der Spleißvariante führt somit wahrscheinlich zu einer vermehrten Bildung von Metastasen, und so zu einer schlechteren Prognose.

In der Folge wurde die Spleißvariante neben dem Magenkarzinom auch in anderen Tumorentitäten, wie dem Blasen-[Jackson et al., 2007] und dem Ovarialkarzinom gefunden.

Spleiß-Isoform mit Intron zwisch Exon 8 und 9

Eine weitere, bis dahin nicht bekannte Spleißvariante des KAI1 wurde 2011 von Mooez et al. beim Mammakarzinom entdeckt [Mooez S, 2011]. Bei dieser Variante findet sich ein zusätzliches Insert von 274bp zwischen Exon 8 und 9. Dieses Intron beinhaltet ein Stoppcodon, so dass ein fehlerhaftes Protein gebildet wird. Das Einfügen dieser zusätzlichen 274bp kann so zu einer Instabilität der RNA und zu einer Variante des KAI1 führen, welches Unterscheide in der Funktion des Proteins aufzeigt [Mooez S, 2011].

2. Fragestellung

Der Verlust von Tumorsuppressorgenen kann zur Entstehung und Progression eines malignen Tumors beitragen. Ein Funktionsverlust kann unter anderem durch die gesteigerte Bildung von inaktiven Spleißisoformen des Tumorsuppressorgenes, wie hier am Beispiel von KAI1 untersucht, entstehen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die bereits in anderen Tumorentitäten entdeckte Spleißvariante KAI1- Δ ex7 auch im Ovarialkarzinom nachgewiesen werden kann. Des Weiteren wurde untersucht, ob die mRNA-Expression von KAI1- Δ ex7 einen Einfluss auf das Überleben der Patientinnen und die Dauer des rezidivfreien Überlebens hat.

Die verwendeten Tumorgewebe wurden zwischen 01/2001 und 11/2003 bei der Operation von Ovarialkarzinompatientinnen gewonnen. Insgesamt wurden Gewebe von 42 Patientinnen untersucht. Die Proben beinhalteten Gewebe aus dem Primärtumor und den Metastasen im Omentum majus.

RNA aus Tumorgewebe mit hohem Gehalt an der Spleißvariante KAI1- Δ ex7 wurde außerdem verwendet, um einen Expressionsvektor mit der Spleißisoform herzustellen, der für zellbiologische Experimente in Kooperation mit einer anderen Arbeitsgruppe genutzt wurde.

Die Erforschung des Metastasierungssuppressors KAI1 und dessen Fehlfunktion sollte auf lange Sicht Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien liefern, und so eine individualisierte Therapieplanung ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Firmen und Reagenzien

- AppliChem GmbH, Darmstadt: Ethidiumbromid 1mg/ml
- Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland: NEB Puffer 3, NEB Puffer 2, BSA, Restriktionsenzyme Pst, Hind III, Xba, Bam, Dpn1, Ligationspuffer, DNA Ligase
- Biometra, Göttingen, Deutschland, Gel Dokumentations System
- Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland: RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit
- Heraeus Biofuge pico, Buckinghamshire, England, Zentrifuge
- Invitrogen, Darmstadt, Deutschland, Vector pcDNA3.1 Hygro
- Macherey-Nagel, Düren, Deutschland: PCR clean up Gel extraction, Plasmid DNA Purification
- Metabion, Martinsried, Deutschland: Primer
- Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland: peqGOLD 100bp DNA Leiter, peqGOLD 1 kb DNA Leiter, peqGold Agarose, Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer
- Qiagen, Hilden, Deutschland: Rneasy® Mini, Cloning Kit Ligation, PCR Kit, AmpliTaq Gold Polymerase
- Roche, Mannheim, Deutschland: 1Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), High Fidelity Polymerase
- Roche, Mannheim, Deutschland: Expand High Fidelity PCR System
- Stratagene, Amsterdam, Holland: QuikChange ® Site-Directed Mutagenesis Kit, XL-1 Blue Competent Cells
- Transgenomic, Glasgow, England, Wave system, Puffer A, B

3.1.2 Patientinnenkollektiv

In der retrospektiven Studie wurde Gewebe von 42 Patientinnen verwendet. Zum Teil wurde nicht nur das Gewebe des Ovarialtumors untersucht, sondern auch das Gewebe der Metastasen im Omentum majus.

- 19 Primärtumoren aus dem Ovarialkarzinom
- 1 Borderline Tumor
- 14 Metastasen des Omentum Majus
- 13 Proben unklarer Lokalisation

Es wurde ein Normalgewebe aus einem gesunden Ovar als Referenz untersucht.

Die Patientinnen hatten schriftlich in die anonymisierte Verwendung der Gewebeproben eingewilligt.

Nummer	Lokalisation der Probe	histologischer Subtyp
01a	Netz	serös
02a	Ovar	serös
03a	Netz	serös
04a	Ovar	endom.
05a	unklar	serös
06a	Netz	serös
07a	unklar	undifferenziert
08a	Netz	endom.
09a	Ovar	serös
10a	Netz	serös
11a	Ovar	Müller Misch tumor
12a	Netz	Müller Misch tumor
13a	Ovar	serös
14a	Ovar	serös
15a	Ovar	niedrig differenziert
16a	Ovar	serös
17a	Ovar	endom.
18a	Netz	serös
19a	Ovar	serös
20a	Borderlinetumor	serös
21a	Netz	serös
N20	gesundes Ovar	
T02	Netz	serös
T03	Ovar	serös
T04	Ovar	serös
T05	Netz	serös
T06	Ovar	serös
T07	Netz	serös
T09	Netz	serös
T10	Ovar	serös
T11	Netz	Embryonal Tumor
T13	Ovar	serös
T14	Ovar	serös
T18	Ovar	serös
T21	Ovar	serös
T22	Ovar	serös
T24	unklar	unklar
T25	unklar	unklar
T28	Netz	unklar
33052	unklar	serös
A71	unklar	unklar
B15	unklar	muzinös
D9	unklar	endom.
O39	unklar	serös
M66	unklar	niedrig differenziert
S52	unklar	endom.
F10	unklar	serös
B100	unklar	serös

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Gewebe mit Lokalisation und Subtyp

Alle Patientinnen erhielten eine radikale Operation, und wurden, mit Ausnahme einer Patientin, anschließend mit einer Chemotherapie (vorwiegend Platinhaltig) behandelt. Die Patientinnen wurden im Rahmen der Tumornachsorge regelmäßig untersucht und so Rezidive wie auch Todesfälle dokumentiert.

Die Gewebeproben wurden im flüssigen Stickstoff gelagert. Die bereits isolierte RNA, die weiter verwendet wurde, wurde bei -80 °C gefroren.

Nummer	FIGO Stadium	Grading	OP Ergebnis	Subtyp	Überleben in Monaten
01a	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	11
02a	IIII	3	Tumorrest <2cm	serös	2
03a	IIII	3	Tumorrest <2cm	serös	71
04a	III c	3	Tumorrest >2cm	endometroid	32
05a	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	20
06a	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	20
07a	III c	4	Tumorrest <2cm	undifferenziert	114
08a	IIII	3	Tumorrest >2cm	endometroid	18
09a	III c	3	tumorfrei	serös	127
10a	III c	3	Tumorrest <2cm	serös	18
11a	III c	3	tumorfrei	Müller Misch tumor	23
12a	III c	3	tumorfrei	Müller Misch tumor	23
13a	IIc	3	tumorfrei	serös	88
14a	Iic	3	tumorfrei	serös	88
15a	III c	1	Tumorrest <2cm	niedrig differenziert	16
16a	Ic	1	tumorfrei	serös	71
17a	III c	1	tumorfrei	endometroid	117
18a	IIII	1	Tumorrest <1cm	serös	18
19a	Ic	3	tumorfrei	serös	74
20a	unklar	unklar	tumorfrei	serös	135
21a	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	11
N20	Normalgewebe				
T02	IIII	3	Tumorrest >2cm	serös	48
T03	IIII	3	Tumorrest >2cm	serös	48
T04	IIII	3	tumorfrei	serös	114
T05	IIII	3	tumorfrei	serös	114
T06	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	19
T07	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	19
T09	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	11
T10	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	18
T11	unklar	2	tumorfrei	Embryonal Tumor	54
T13	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	46
T14	III c	3	inoperabel	serös	26
T18	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	33
T21	IIII	3	tumorfrei	serös	18
T22	IIIa	3	tumorfrei	serös	15
T24	IIc	2	tumorfrei	unklar	23
T25	Iic	2	tumorfrei	unklar	23
T28	III c	3	Tumorrest <1cm	unklar	53
33052	IIIc	3	Tumorrest <2cm	serös	11
A71	Ic	5	tumorfrei		7
B15	III c	2	Tumorrest <1cm	muzinös	15
D9	IIIb	3	Tumorrest <1cm	endometroid	64
O39	III c	3	Tumorrest <1cm	serös	60
M66	IIII	3	Tumorrest <1cm	niedrig differenziert	24
S52	III c	3	Tumorrest <1cm	endometroid	42
F10	III c	3	tumorfrei	serös	83

Tabelle 5: Übersicht klinische Daten der Patientinnen

3.2 Methoden

3.2.1 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) wurde in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts von Kary Mullis entwickelt [Mullis K, 1986]. Die Polymerasenkettenreaktion ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Amplifizierung von selektiven DNA Abschnitten mittels DNA Polymerasen. DNA Polymerasen nutzen einen bestehenden DNA Einzelstrang als Vorlage zur Synthese eines neuen komplementären Stranges durch Anlagerung von komplementären Desoxyribonukleotiden (dNTPs). Als Markierung für den Start- und Endpunkt der Polymerasen werden Primer (Oligonukleotide) benötigt, die eine 3'Hydroxylgruppe besitzen, an der die Polymerase mit der Anlagerung komplementärer Desoxyribonukleotiden beginnen kann.

Im ersten Schritt der Polymerasenkettenreaktion wird die in doppelsträngiger Form vorliegende DNA auf 94-96°C erhitzt und so eine Auftrennung des Doppelstranges in zwei Einzelstränge erreicht (Denaturierung). Durch ein Absenken der Temperatur auf eine, für jeden Primer abgestimmte Temperatur, wird ein optimales Anlagern der Primer an den entsprechenden komplementären Strang erreicht (Annealing). Die gewählte Temperatur ist abhängig von der Länge und der Nukleotidsequenz der Primer. Bei der Elongation wird eine für die Polymerase optimale Temperatur gewählt, die Polymerase synthetisiert den komplementären Strang, ausgehend von den Primern am 3'Ende der Matrize. Die Abfolge der Schritte Denaturierung-Annealing-Elongation kann mehrfach wiederholt werden. Der neu gebildete Doppelstrang teilt sich in zwei Einzelstränge auf und dient so zweifach als Matrize für die Synthese neuer komplementärer Stränge. Durch diese Methode werden bei 40facher Wiederholung der Zyklen etwa 1 Milliarde Kopien der markierten und erwünschten DNA Sequenz gebildet.

Gerät: MJ Research, PTC-200 Peltier Thermal Cycler

1. PCR „KAI1 full length“

Die hier verwendeten Primer erkennen die gesamte kodierende Region von „KAI1 full length“. Dabei entstehen cDNA Fragmente von einer Länge von 801bp für KAI1 Wildtyp und 717bp für die Spleißvariante $\Delta ex7$ von KAI1 [Lee et al., 2003].

Reagenzien:

- dNTP Mix; je 2mM
- Ampli Taq Gold Polymerase (5U/ μ l)
- 10x Polymerase Puffer inkl. 15mM MgCl₂
- Primer Vorwärts für „KAI1 full length“ (2 μ M)
5' GGA ATT CGA TGG GCT CAG CCT GTA TCA AAG TCA 3'
- Primer Rückwärts für „KAI1 full length“ (2 μ M)
5' GCT CTA GAT CAG TAC TTG GGG ACC TTG CTG T 3'

Durchführung:

Pipettierschema:

		Endkonzentration
10xPuffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	5 μ l	1x
dNTP	5 μ l	200 μ M
Primer gesamt Vorwärts	5 μ l	200nM
Primer gesamt Rückwärts	5 μ l	200nM
Ampli Taq Gold	0,2 μ l	1 U
Wasser (add 50 μ l)	27,3 μ l	
cDNA	2,5 μ l	
<hr/>		
	50 μ l	

Programm Thermocycler:

1. 94°C 3 min
2. 94°C 30 sec
3. 60°C 1 min
4. 72 °C 1 min
5. Goto 2 40x
6. 72°C 8 min
7. 4°C forever
8. end

Das PCR Produkt wurde bei -20°C gelagert.

2. PCR „KAI1 splice“

Diese Primer erkennen die Spleißregion um Exon 7, welches bei der Spleißvariante von KAI1 fehlt. Es entstehen Fragmente von 255bp (Wildtyp KAI1) bzw. 171bp (KAI1- Δ ex7).

Reagenzien:

- dNTP Mix; je 2mM
- Ampli Taq Gold Polymerase (5U/ μ l)
- 10x Polymerase Puffer inkl. 15mM MgCl₂
- 25mM MgCl₂
- Primer Vorwärts für KAI1 Δ ex7 (2 μ M)
5'GAC AAC AGC CTT TCT GTG AGG AAG 3'
- Primer Rückwärts für KAI1 Δ ex7 (2 μ M)
5'GCT CTA GAT CAG TAC TTG GGG ACG TTG CTG TA 3'

Durchführung:

Pipettierschema:

		Endkonzentration
10xPuffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	5 μ l	1x
MgCl ₂	2,5 μ l	1,25mM
dNTP	5 μ l	200 μ M
Primer KAI1 Δ ex7 Forward	5 μ l	200nM
Primer KAI1 Δ ex7 Reverse	5 μ l	200nM
Ampli Taq Gold	0,2 μ l	1 U
Wasser (add 50 μ l)	24,3 μ l	
cDNA	3,0 μ l	
<hr/>		
	50 μ l	

Program Thermocycler:

1. 94°C 3 min
2. 94°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 1 min
5. Goto 2 32x
6. 72°C 8 min
7. 4°C forever
8. end

Das PCR Produkt wurde bei -20°C gelagert.

PCR HPRT Primer

Als sogenanntes „Housekeepergen“ wurde HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) verwendet. Der Gehalt an KAI1-Δex7 konnte so besser quantifiziert werden. Zur Ermittlung der notwendigen Zykluszahl der PCR steigerten wir die Zykluszahl und verglichen die Ergebnisse der jeweiligen PCRs mit Hilfe der Agarose Gelelektrophorese. Es konnte gezeigt werden, dass bei 40 Zyklen noch nicht der Sättigungsbereich erreicht worden ist, und wir die PCR mit 40 Zyklen durchführen können.

Reagenzien:

- dNTP Mix; je 2mM
- Ampli Taq Gold Polymerase (5U/μl)
- 10x Polymerase Puffer inkl. 15mM MgCl₂
- Primer Vorwärts für HPRT (2μM)
5' TAT TGT AAT GAC CAG TCA ACA G 3'
- Primer Rückwärts für HPRT (2μM)
5' GGT CCT TTT CAC CAG CAA G 3'

Durchführung:

Pipettierschema:

		Endkonzentration
10xPuffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	5μl	1x
dNTP	5μl	200μM
Primer HPRT Vorwärts	5μl	200nM
Primer HPRT Rückwärts	5μl	200nM
Ampli Taq Gold	0,2μl	1 U
Wasser (add 50μl)	27,3μl	
cDNA	3,0μl	
<hr/>		
	50μl	

Programm Thermocycler:

1. 94°C 3 min
2. 94°C 30 sec
3. 57°C 1 min
4. 72°C 1 min
5. Goto 2 40x
6. 72°C 8 min
7. 4°C forever
8. end

Das PCR Produkt wurde bei -20°C gelagert.

Durch die Gelelektrophorese konnten wir zeigen, dass mit 40 Zyklen noch kein Sättigungsbereich erreicht wurde.

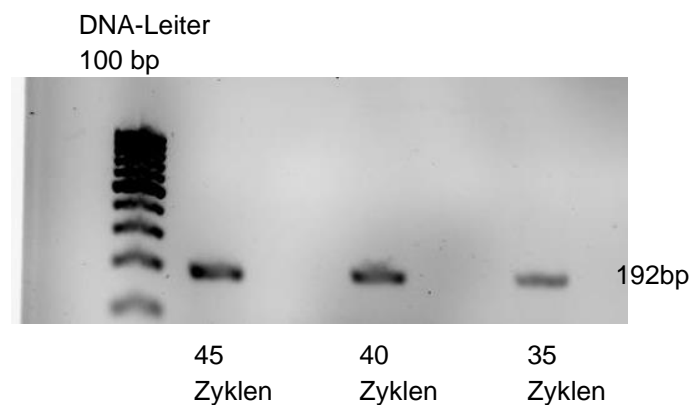


Abbildung 9: Steigerung Zyklenzahl der PCR mit HPRT Primern zur Ermittlung des Sättigungsbereiches. Bei 40 Zyklen ist noch keine Sättigung erreicht

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren, das der Auftrennung von Partikeln unterschiedlicher Größen und Ladungen dient. Miteinander vernetzte Agarosepolymere bilden ein Netz, durch welches negativ geladene RNA- oder DNA-Moleküle entlang eines angelegten elektrischen Feldes wandern. Kleinere Moleküle wandern dabei schneller durch das Agarose Netz als große Moleküle.

Reagenzien:

- 5x TBE-Puffer 90mM Tris
90mM Borsäure
2,5mM EDTA
ph 8,3
- 50x TAE-Puffer 2M Tris
1M Essigsäure
100mM EDTA
ph 8,5
- Ladepuffer
- Agarose
- Ethidiumbromid 10µg/ml

Durchführung:

Zur Herstellung eines 1% bzw. 2% Agarosegels wurde 0,6 bzw. 1,2g Agarose mit 60ml TBE/TAE-Puffer gemischt. Sollten kleinere DNA Fragmente nachgewiesen werden, wurde ein 2% Agarose Gel gegossen. Die Mischung aus Agarose und TBE/TAE-Puffer wurde 2 min. in der Mikrowelle bei 900 Watt erwärmt, um die Auflösung des Agarose Pulvers zu verbessern. Wenn sich eine homogene, lauwarme Flüssigkeit gebildet hatte wurden 3µl Ethidiumbromid (10µg/ml) zugegeben. Die Agarose wird nun in die mit einem Kamm vorbereitete Gelkammer gegossen. Das fest gewordene Gel wird nach Entfernung des Kammes in die Gelelektrophoresekammer gelegt und vollständig mit TBE/TAE-Puffer bedeckt. Die DNA Leiter und die mit Ladepuffer im Verhältnis 1:5 gemischten Proben werden nun in die Geltaschen pipetiert. Um die Auftrennung der DNA- und RNA-Moleküle zu starten wird eine Spannung von 100 Volt an das Gel angelegt.

Mit Hilfe des Ethidiumbromids können die durch die Anlage von Spannung entstandenen, aufgetrennten Banden der Moleküle sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA- und RNA-Moleküle und erhöht so die Fluoreszenz unter ultraviolettem Licht. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde mit Hilfe einer Biometra Kamera dokumentiert.

3.2.3 RNA Extraktion

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurde das Rneasy-Kit (Qiagen) verwendet, mit dem es möglich ist RNA Moleküle, die länger als 200 Nukleotide sind, zu isolieren. Mit diesem ist es möglich, bis zu 100µg RNA aus kleinen Mengen von Zellen zu gewinnen.

Durchführung:

Nach Zentrifugieren der Zellen bei 300 x g für 5 Minuten wurde der Überstand abpipetiert und 350µl RLT-Puffer hinzugegeben. Dieser Puffer dient der Inaktivierung von Rnasen um die Isolierung intakter RNA zu gewährleisten und auch der Lyse und Homogenisierung der Probe. Nachdem die Lösung gevortext wurde, wurde sie auf eine QIAshredder-Säule pipettiert, die sich in einem 2ml Sammelgefäß befindet und 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurden 350µl 70% Ethanol zugegeben und das Lysat durch Pipettieren gut gemischt. Ethanol dient der Schaffung der optimalen Bindungskonditionen. Die Lösung wird dann auf eine Rneasy-Mini-Säule in einem 2ml Sammelgefäß pipettiert und 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert, damit sich die RNA an der Membran anlagert. Der Durchfluss, bestehend aus RLT-Puffer, wird verworfen. Anschließend werden 700µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 500µl RPE-Puffer wurde die Lösung erneut 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Diese beiden Schritte dienen der Entfernung von Kontaminationen. Der letzte Schritt wurde nochmals wiederholt, allerdings wurde die Lösung 2 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert um eine komplette Trocknung der Membran zu erreichen. Zur Lösung der RNA aus der Membran wurde 30µl Rnase freies Wasser auf die Membran (Rneasy-Mini-Säule in einem 2ml Sammelgefäß) pipettiert und 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Die isolierte RNA ist nun in 30µl Wasser gelöst und kann bei -80°C gelagert werden.

3.2.4 Reverse Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der Reversen Transkription gelingt es, aus dem Gewebe isolierte RNA in DNA umzuschreiben, die dann für die Amplifikation mittels PCR zur Verfügung steht. Die heute eingesetzten Reversen Transkriptasen sind veränderte Enzymvarianten aus unterschiedlichen Retroviren, wie das Murine Leukemia Virus (MLV) oder das Avian Myeloblastosis Virus (AMV). Für unsere Versuche haben wir 2 verschiedene Reaktionskits verwendet.

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), Roche

Gerät: MJ Research, PTC-200 Peltier Thermal Cycler

Reagenzien:

- 10x Reaktionspuffer
- 25mM MgCl₂
- dNTP Mix je 10mM (dATP, dCTP; dGTP, dTTP)
- Random Primer 2µg/µl
- RNase Inhibitor 50U/µl
- AMV Reverse Transkriptase 20-25U/µl

Durchführung:

Pipettierschema:

		Endkonzentration
10x Puffer	2µl	1x
25mM MgCl ₂	4µl	4,6mM
dNTP Mix	2µl	914,7µM
Random Primer	2µl	0,08 U
RNase Inhibitor	1µl	16-20 U
AMV Reverse Trankriptase	0,8µl	
RNA	10µl	
	21,8µl	

Die RNA Probe (1µg) wurde auf 10µl mit sterilem Wasser verdünnt und zu dem Mastermix dazugegeben.

Programm Thermocycler:

1. 25°C 10 min
2. 42°C 1 Stunde
3. 95°C 5 min
4. 4°C forever
5. end

Die cDNA wurde bei -80°C gelagert.

RevertAid H Minus First Strand cDNA Sythesis Kit, Fermentas

Vorteil der bei diesem Kit verwendeten Reversen Transkriptase ist eine Punktmutation, die zur vollständigen Eliminierung der Rnase H Aktivität führt. Die Rnase H ist eine unspezifische Endoribonuklease, die die RNA hydrolytisch spaltet. Durch Ausschaltung dieser Rnase gelingt es den Abbau der RNA während der cDNA Synthese zu verhindern und so vermehrt intakte cDNA Stränge zu erhalten.

Gerät: MJ Research, PTC-200 Peltier Thermal Cycler

Reagenzien:

- 5x Reaktionspuffer
- dNTP Mix je 10mM (dATP, dCTP; dGTP, dTTP)
- Random Primer 0,2µg/µl
- RNase Inhibitor 20 U/µl
- RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase 200 U/µl

Durchführung:

Pipettierschema / Programm Thermocycler:

1-2µg RNA auf 5µl mit DEPC Wasser verdünnen

1. 5µl RNA Lösung
 - + 1µl Random Primer
 - + 6µl DEPC Wasser
 - ▶ 70°C 5min
 - ▶ auf Eis
2. + 4µl 5x Reaktionspuffer

+ 1µl RNase Inhibitor
+ 2µl dNTP Mix
+ 2µl dNTP Mix
▶ 25°C 5min

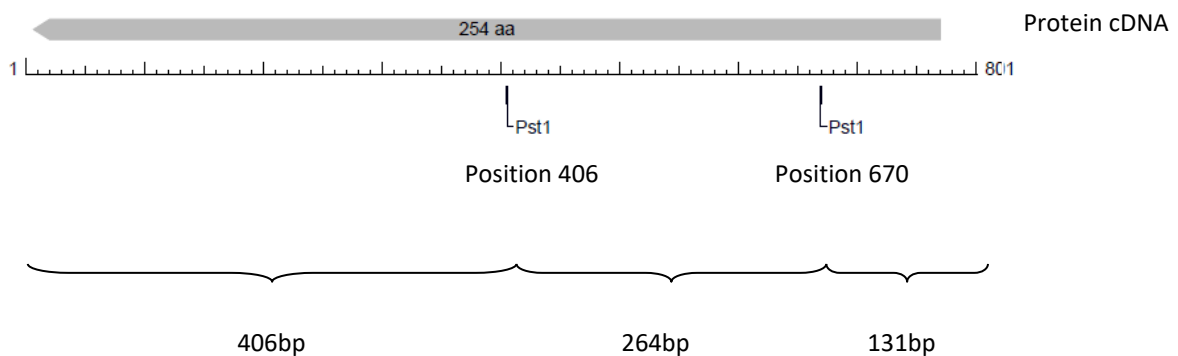
3. + 1µl Reverse Transkriptase
▶ 25°C 10min
▶ 42°C 60min
▶ 70°C 10min
▶ auf Eis

Die cDNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.5 Verdau mit dem Restriktionsenzym Pst1

Mit Hilfe des Restriktionsenzymes Pst1 gelingt die Unterscheidung zwischen KAI1 „full-length“ und KAI1- Δ ex7. Das Restriktionsenzym schneidet KAI1 „full-length“ an 2 Stellen in 3 Fragmente von definierter Länge, während KAI1- Δ ex7 nur in 2 Stücke gespalten wird. Pst1 spaltet KAI1 bei folgender Sequenz: CTGCAG, die eben in KAI1 „full length“ zweimal und in KAI1- Δ ex7 nur einmal vorkommt.

KAI1 „full length“



KAI1- Δ ex7

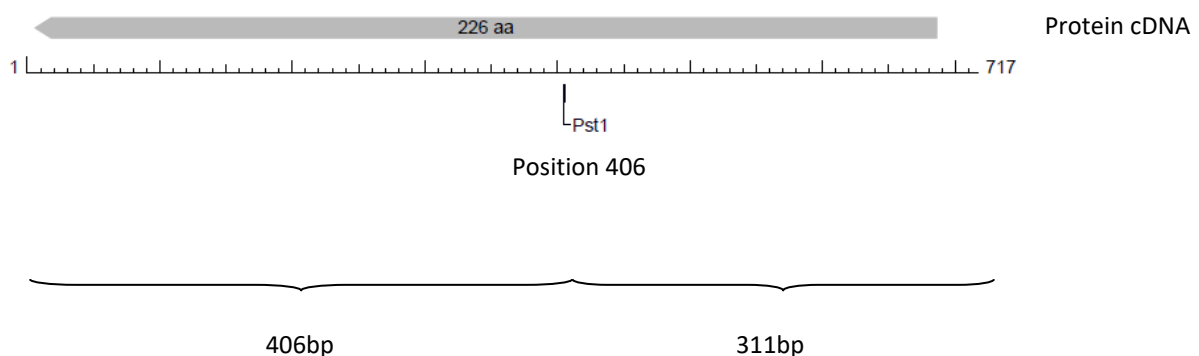


Abbildung 10: Schnittstellen des Restriktionsenzymes Pst1 in KAI1 „full length“ und KAI1- Δ ex7, modifiziert nach Biolabs NEBcutter [Vincze, 2003]

Reagenzien:

- Pst1 Enzym 20000U/μl, Biolabs
- NEB-Puffer 3 10x concentration
- BSA 100x

Durchführung:

Pipettierschema:

		Endkonzentration
Pst1	1μl	20.000 U
Template	5μl	
NEB-Puffer 3	2μl	1x
BSA	0,2μl	1x
Wasser	11,2μl	
<hr/>		
	20μl	

Die Lösung wird bei 37°C 1 Stunde inkubiert.

3.2.6 Konstruktion der Plasmide „KAI1-Δex7“ bzw. „KAI1 full length“ und Transformation in XL-1 blue Zellen

Gel Extraction

Mit dieser Methode gelingt es, DNA Fragmente aus einem TAE-/TBE-Agarose Gel zu extrahieren. Wir haben so KAI1 „full length“, KAI1-Δex7 und auch unser Plasmid für die anschließende Ligation erhalten.

Reagenzien:

PCR clean up Gel extraction, Macherey-Nagel

Durchführung:

Aus einem TBE Gel wurde mit einem Skalpell das gewünschte DNA Fragment sparsam ausgeschnitten. Die so gewonnenen Gelstücke wurden gewogen und jeweils 300μl NT-Puffer zugegeben. Die Proben wurden bei 50°C so lange inkubiert, bis sich die Gelstücke aufgelöst haben. Durch anschließendes vortexen

wurden die Proben komplett gelöst. Die Lösungen wurden nun auf eine NucleoSpin-Extract-II-Säule in einem Sammelgefäß pipettiert und 1 Minute bei 11,000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zum Waschen der Membran wurden 600µl NT3-Puffer zugegeben, die Probe 1 Minute bei 11,000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Für die Trocknung und Elimination des Puffers wurde die Probe 2 Minuten bei 11,000 x g zentrifugiert. Zur Lösung der DNA wurden 15µl Elution-Puffer auf die Membran pipettiert und die Probe bei Raumtemperatur 1 Minute inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation von 1 Minute bei 11,000 x g erhält man die DNA.

Amplifikation mit überhängenden Primern für die Transformation des Plasmids in XL-1 blue Zellen

Durch Verwendung dieser Primer wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und Xba geschaffen. Durch den Verdau mit diesen Restriktionsenzymen, der an die Extraktion aus dem Gel angeschlossen wurde, wurden die entsprechenden Schnittstellen für die anschließende Ligation mit dem Vektor pcDNA3.1/Hygro geschaffen.

Reagenzien:

- dNTP Mix; je 2mM
- Roche High Fidelity Polymerase (3,5 U/µl)
- 10x Polymerase Puffer inkl. 15mM MgCl₂
- Primer Vorwärts für KAI1 2µM
5' AAC AAA AGC TTA TGG GCT CAG CCT GTA TCA AAG TCA CC
3'
- Primer Rückwärts für KAI1 2µM
5' AAC AAT CTA GAG TAC TTG GGG ACC TTG CTG TAG TCT TCG
G 3'

Durchführung:

Pipettierschema:

		Endkonzentration
10xPuffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	5µl	1x
dNTP	3µl	200µM
Primer Vorwärts	3µl	200nM
Primer Rückwärts	3µl	200nM
High Fidelity Polymerase	1µl	3,5U
Wasser (add 50µl)	30µl	
cDNA	5µl	
<hr/>		
	50µl	

Programm Thermocycler:

1. 94°C 2min
2. 95°C 30sec
3. 50°C 1min
4. 68°C 2min
5. Goto 2 5x
6. 94°C 30sec
7. 58°C 30sec
8. 68°C 2min, 5sec increment
9. Goto 6 25x
10. 68°C 7min
11. 4°C forever
12. end

Das PCR Produkt wurde bei -20°C gelagert.

Verdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und Xba

Mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme wurden sowohl das Plasmid pcDNA3.1/Hygro als auch KAI1 „full length“ und KAI1-Δex7 behandelt. Dadurch wurden zueinander komplementäre Schnittstellen als Grundlage für die anschließende Ligation geschaffen. Der Vektor wurde im Bereich der *Multi Cloning Site* geschnitten, während KAI1 „full length“ und KAI1-Δex7 im Bereich der überhängenden Primer geschnitten wurden.

Schnittstelle Hind III und Xba I im Bereich des Plasmid:

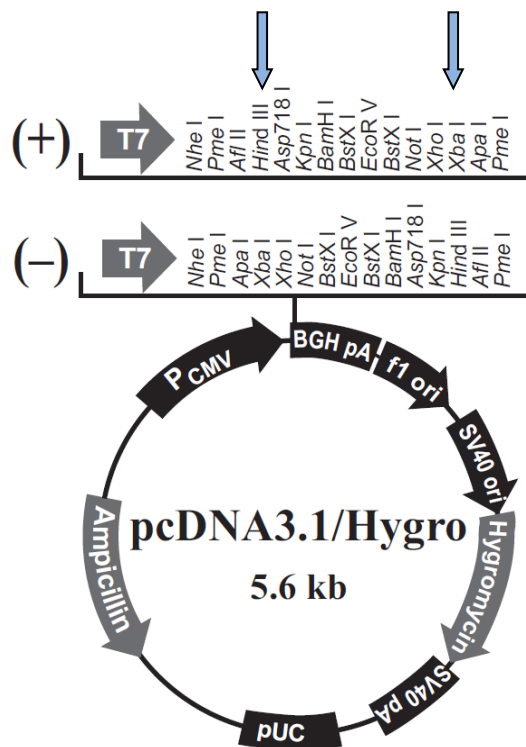
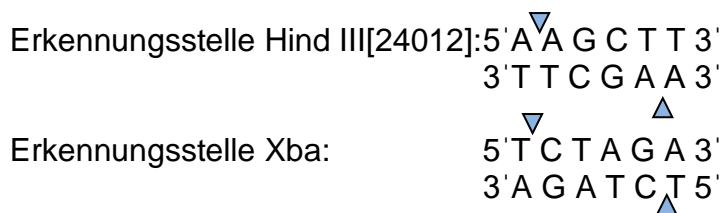


Abbildung 11: pcDNA3.1/Hygro Vector mit den markierten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und Xba (modifiziert nach Invitrogen [Invitrogen, 2011])

Schnittstelle Hind III und Xba im Bereich der Primer:



Hind III schneidet im Bereich des Vorwärts Primer



Xba I schneidet im Bereich des Rückwärts Primer



Reagenzien:

- Puffer 2
- BSA
- Hind III
- Xba

Durchführung:

Pipettierschema:

Puffer 2	2µl
BSA	0,2µl
Hind III	1µl
Xba	1µl
Wasser	4µl
Template	12µl
<hr/>	
	20µl

Die Lösung wird bei 37°C 1 Stunde inkubiert.

PCR „clean up“

Nach dem Verdau mit HindIII/Xba diene dieser Schritt der Entfernung von Enzymen aus der vorhergehenden Reaktion.

Reagenzien:

PCR „clean up“ Gel extraction, Macherey-Nagel

Durchführung:

20µl der Proben KAI1 „full length“ HindIII/Xba und KAI1-Δex7 HindIII/Xba wurden mit 40µl NT Puffer Gemisch und auf eine NucleoSpin-Extract-II-Säule pipettiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 11,000 x g wurde der Durchfluss verworfen und 600µl NT3-Puffer zum Waschen auf die Membran pipettiert. Der Durchfluss wurde nach einer Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wieder verworfen. Zum kompletten Entfernen des NT3-Puffers wurde die Probe erneut zentrifugiert (2 Minuten bei 11,000 x

g). Zur Lösung der DNA wurden 15µl Elution-Puffer auf die Membran pipettiert und die Probe nach Inkubation bei Raumtemperatur von 1 Minute bei 11,000 x g 1 Minute zentrifugiert.

Ligation

Nach der Reinigung der Proben wurden nun der Vektor pcDNA3.1/Hygro und KAI1-Δex7 bzw. KAI1 „full length“ ligiert.

Reagenzien:

- Ligationspuffer 10x T4 DNA Ligase inkl. 10mM ATP, Biolabs
- DNA Ligase 400.000 U/ml, Biolabs
- Vector pcDNA3.1.Hygro HindIII/Xba

Durchführung:

Pipettierschema:

Ligationspuffer	2µl
Ligase	1µl
Vector	2µl
Insert	9µl
Wasser	6µl
<hr/>	
	20µl

Die Proben wurden 3 Stunden bei 25°C im Wasserbad inkubiert.

Transformation

Die Transformation des durch Ligation gewonnenen Plasmids (pcDNA3.1.Hygro KAI1 gesamt/splice) erfolgt in XL-1 blue Zellen.

Reagenzien:

- LB Medium (10g Bacto Tryton, 5g Hefe Extrakt, 10g NaCl, pH 7,0)
- Ampicillin Agarplatte (1,5% Agar in LB Medium)

Durchführung:

12µl der Ligation wurden mit 50µl XI-1 blue Zellen 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Erhitzen auf 45°C für 45 Sekunden wurden die Zellen 5 Minuten auf Eis ausgekühlt. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium wurden die Zellen 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 1000 RPM zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 100µl abpipettiert. Die Bakterien wurden nun sanft resuspendiert und auf einer Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen.

Plasmid DNA Reinigung

Zur Gewinnung des Plasmids wurde ein Reinigungsschritt durchgeführt.

Reagenzien:

Plasmid DNA Purification, Macherey Nagel

Durchführung:

1,5ml der Bakterienkultur wurden bei 11,000 x g 1 Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde nochmals 1,2ml der Bakterienkultur dazu pipettiert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, 250µl Puffer-A1 hinzugegeben und die Lösung gut vermischt (Vortex). Danach wurden 250µl Puffer-A2 hinzugefügt und die Lösung vorsichtig geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 300µl Puffer-A3 hinzugegeben und vorsichtig geschüttelt. Diese Schritte und die verwendeten Puffer dienen der Lyse der Zellen. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 11,000 x g bei Raumtemperatur wurde der Überstand abpipettiert und auf eine NucleoSpin-Plasmid-Säule pipetiert. Dies wurde erneut bei 11,000 x g 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 600µl Puffer-A4 auf die Membran pipettiert und bei 11,000 x g 1 Minute zentrifugiert um die Membran zu waschen. Der Durchfluss wurde verworfen. Um die Membran völlig zu trocknen wurden die NucleoSpin-Plasmid-Säule nochmals bei 11,000 x g 2 Minuten zentrifugiert. Zur Lösung der DNA wurden 50µl Puffer-AE auf die Membran pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 1 Minute bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 11,000 x g

zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt, wodurch der Ertrag der gewonnenen DNA um bis 20% gesteigert werden kann. Die gewonnene DNA wurde bei -20°C gelagert.

Verdau mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Xba

Zur Erkennung der Plasmide, die die Spleißvariante eingebaut haben, wurde erneut ein Pst1-Verdau durchgeführt und die entsprechenden Plasmide an der Größe der Fragmente erkannt.

Zur weiteren Kontrolle wurde noch ein Bam/Xba-Verdau durchgeführt. Das Restriktionsenzym BamH1 schneidet unser Insert bei 98bp, wodurch 2 Fragmente (619bp, 5681bp) entstehen. Die Schnittstelle, die BamH1 in dem Vektor pcDNA3.1.Hygro hat, liegt in der *Multicloning Site*, die allerdings in Folge des HindIII/Xba-Verdaus verloren gegangen ist. Somit erfolgt dort keine Spaltung und man erhält nur die o.g. 2 Fragmente.

Reagenzien:

- BamH1
- Xba
- Puffer-3
- BSA

Durchführung:

Pipettierschema:

BamH1	1µl
Xba	1µl
Template	12,5µl
Puffer-3	2µl
BSA	0,2µl
Wasser	3,3µl
<hr/>	
	20µl

Die Probe wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

3.2.7 Mutagenese

Reagenzien:

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene

Im Rahmen der Transformation und des Sequenzierens hat sich gezeigt, dass ein Klon eine Mutation der Spleißvariante aufzeigt, die wir mit Hilfe der Mutagenese eliminiert haben. Diese Mutation hat zu einem Aminosäureaustausch von Arginin (AGG) zu Glycin (GGG) geführt. Zusätzlich wies der Klon noch eine weitere stille Mutation auf.

PCR Mut KAI1

Cctttctgtg^gggaagggc

KAI1 Wildtyp

Cctttctgtg^aggaagggc

Zur Eliminierung der Mutation wurde zunächst eine PCR mit speziell entwickelten Primern durchgeführt und anschließend ein Dpn1-Verdau gefolgt von der Klonierung.

PCR mit Primern zur Eliminierung der Mutation

5' GCC TTT CTG TGA GGA AGG GCT TCT GC 3'
 5' GCA GAA GCC CTT CCT CAC AGA AAG GC 5'

PCR-Mut-KAI1	5`	gc	ctt	tct	gtg	ggg	aag	ggc	ttc	tgc	3`
AA			L	S	V	G	K	G	F	C	
KAI1-WT	5`	gc	ctt	tct	gtg	agg	aag	ggc	ttc	tgc	3`
AA			L	S	V	R	K	G	F	C	
	3`	cg	gaa	aga	cac	tcc	ttc	ccg	aag	acg	5`
	5`	gca	gaa	gcc	ctt	cct	cac	aga	aag	gc	

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Mutation KAI1 und der entsprechend entwickelten Primer zur Eliminierung der Mutation

Die PCR wurde mit speziellen Primern durchgeführt, die der Eliminierung der Mutation in der Spleiß Variante dienen.

Reagenzien:

- Primer KAI1 splice Mut 100pmol/μl
5' GCC TTT CTG TGA GGA AGG GCT TCT GC 3'
- Primer KAI1 splice Mut 100pmol/μl
5' GCA GAA GCC CTT CCT CAC AGA AAG GC 5'
- 10x Reaction Puffer
- NTP 2,5mM
- Pfu Turbo Polymerase 2,5U/μl

Durchführung:

Pipettierschema:

		Endkonzentration
10xPuffer	5µl	1x
dNTP	2µl	0,1 mM
Primer splice Mut Vorwärts	1,6µl	0,16nM
Primer splice Mut Rückwärts	1,6µl	0,16nM
Pfu Turbo Polymerase	1µl	2,5U
Wasser (add 50µl)	38,3µl	
DNA	0,5µl	
<hr/>		
	50µl	

Programm Thermocycler:

1. 95°C 30sec
2. 95°C 30sec
3. 55°C 1min
4. 68°C 7min
5. Goto 2 14x
7. 4°C forever
8. end

Das PCR Produkt wurde bei -20°C gelagert.

Dpn1-Verdau

Sinn des Dpn1-Verdaues ist der Abbau methylierter DNA. Dieses Restriktionsenzym schneidet nur methylierte DNA nicht aber die neu in der PCR gebildete, nicht methylierte, korrigierte DNA. So kommt es nur zum Abbau der Matrizen DNA, die die Mutation enthält.

Durchführung:

50µl des PCR Produktes wurden mit 1µl Dpn1 (10U/µl) gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Klonierung

Es folgte anschließend die Transformation und Klonierung der geänderten Spleiß-Variante in XL-1-blue-Zellen. Zur Kontrolle, ob das gewünschte Insert eingebaut wurde, wurde ein HindIII/Xba Verdau durchgeführt.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung nach Sanger, die auch als Kettenabbruchreaktion bezeichnet wird, gelingt eine relativ schnelle und sichere Bestimmung der Basenabfolge und so die Analyse der Basensequenz.

Vor Durchführung der Sequenzierung muss das zu sequenzierende Produkt mit entsprechenden Primern amplifiziert werden. Die entsprechenden Primer binden am T7 Promoter bzw. an der *BGH reverse priming site*. Durch diese PCR wird nur das später zu sequenzierende Insert amplifiziert und nicht der gesamte Vektor.

PCR vor dem Sequenzieren

Vor dem Sequenzieren der Klone 6 und 12 wurde eine erneute PCR durchgeführt. Der forward Primer bindet am T7 Promoter und der reverse Primer an der *BGH priming site*. Dadurch erhält man ein Fragment von 813bp.

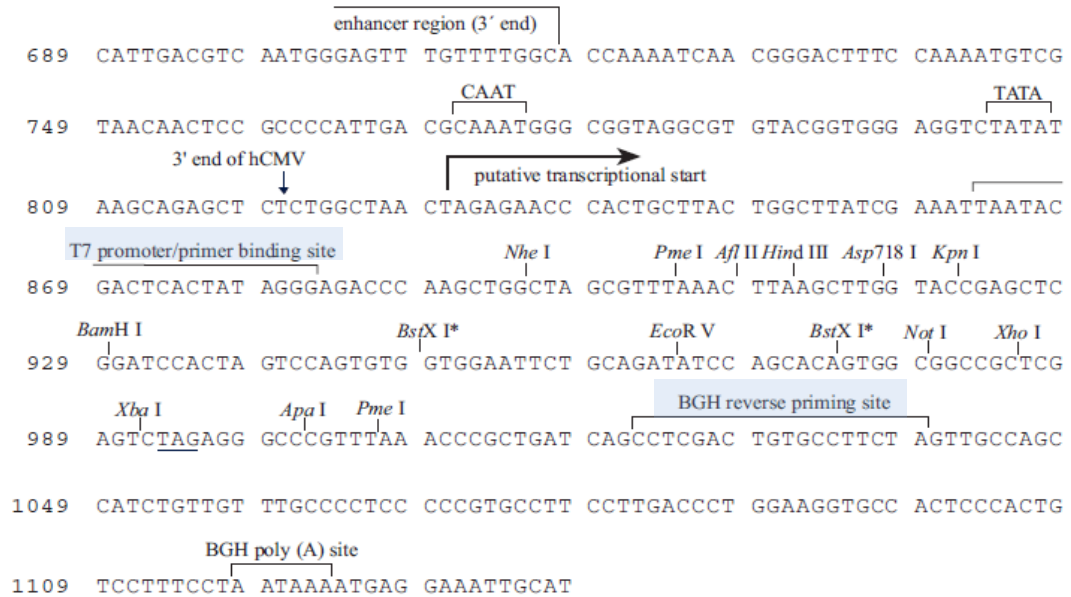


Abbildung 13: Plasmid pcDNA3.1.Hygro; Zwischen den Schnittstellen Hind III und Xba I wurde Kai1 „full length“ bzw. Δex7 eingebaut [Invitrogen, 2012]

717bp	KAI1 Δex7
29bp	bis Schnittstelle Hind III
30bp	ab Schnittstelle Xba
19bp	Primer Vorwärts T7
18bp	Primer Rückwärts BGH
813bp	

Bei der Sequenzanalyse nach Sanger wird zunächst ein DNA-Strang entlang einer Einzelstrangmatrize durch DNA Polymerasen synthetisiert. Die DNA-Polymerase baut entlang der Matrize solange komplementäre Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ein, bis ein sogenanntes Kettenabbruchmolekül eingebaut wird, das nicht mehr verlängert werden kann. Bei dem Kettenabbruchmolekül handelt es sich um ein fluoreszierendes Didesoxynukleosidtriphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), welches am 3'C Atom des Zuckerringes, statt der OH Gruppe wie bei den Desoxynukleotidtriphosphaten, nur ein H Atom trägt, so dass die Polymerase bei dem Einbau eines solches Moleküls stehen bleibt, und es zum Kettenabbruch kommt. In vier Reaktionsgefäße werden die zur DNA-Synthese benötigten dNTP gegeben, und jeweils

ein ddNTP in eines der Reaktionsgefäße hinzugegeben. Im ersten Reaktionsgefäß ddATP, im zweiten ddCTP, im dritten ddGTP und im vierten ddTTP. Das bis zum Kettenabbruch synthetisierte DNA-Stück trägt stets als letzte Base das markierte ddNTP, welches zum Abbruch der Neusynthese geführt hat. Werden nun die einzelnen Reagenzgefäße auf ein Agarosegel aufgetragen und die neugebildeten Stränge der Länge nach aufgetrennt, gibt es für jedes Reaktionsgefäß ein Bandenmuster, welches die Position der einzelnen Basen innerhalb der neu gebildeten Stränge festlegt. Anhand dieser Bandenmuster kann die Sequenz der Basenfolge abgelesen werden.

Mit dem Genetic-Analyzer gelingt eine einfache und schnelle Sequenzierung. Zunächst werden die DNA-Fragmente mit einer fluoreszierenden Farbe markiert, wobei typischerweise ein Farbmolekül an ein DNA-Fragment bindet. Die DNA Moleküle werden in kleine Kapillaren eingespritzt. Nach Stromanlage beginnt die Elektrophorese. Die DNA-Fragmente wandern zu dem anderen Ende, wobei kürzere Fragmente schneller wandern als lange. Sobald die Fragmente die sogenannte *Detection cell* erreichen, beginnen die Farbmoleküle zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz wird in elektronische Information umgewandelt und liefert die gewünschte Sequenz des DNA-Fragmentes.

Gerät: Genetic Analyzer 3100

Reagenzien:

- NTP; je 2mM
- 10x Polymerase Puffer inkl. 15mM MgCl₂
- Primer Vorwärts T7 Promoter 0,1µg/µl
- Primer Rückwärts BGH reverse priming site 0,1µg/µl
- High Fidelity Polymerase

Durchführung:

Pipettierschema:

Plasmid	0,3µl
10x Puffer (inkl. 15mM MgCl ₂)	5µl
NTP	5µl
Primer Vorwärts	1µl
Primer Rückwärts	1µl
Polymerase	1µl
Wasser	36,7µl
<hr/>	
	50µl

Programm Thermocycler:

Die Annealing Temperatur für die Primer wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

Pro Primer Bindestelle A oder T: je 2°C

Pro Primer Bindestelle G oder C: je 4°C

Die Summen der Temperaturen wurden addiert und 2 abgezogen. Diese Rechnung wurde jeweils getrennt für den Forward und Reverse Primer angewandt. Zur Bestimmung der Annealing Temperatur für beide Primer wurde der Mittelwert der beiden Annealingtemperaturen verwendet.

1. 94°C 10min
2. 94°C 30sec
3. 52°C 30sec
4. 72°C 1min
5. Goto2 36x
6. 72°C 8min
7. 10°C 5min
8. End

3.2.9 Nanodrop, Messung der DNA/RNA Konzentrationen

Mit Hilfe des Nanodrop-Gerätes (PeqLab) ist es möglich, bereits in sehr kleinen Mengen der Probe, die DNA bzw. RNA Konzentration zu bestimmen. Bereits 0,5-2,0µl der zu untersuchenden Probe reichen aus.

Zunächst wurden 0,5µl der Probe auf den unteren Sockel des Nanodrop-Gerätes pipettiert, der mit einem Glasfaserkabel verbunden ist. Durch Verschluss des Armes des Nanodrops wird der zweite Sockel, der ebenfalls mit einem Glasfaserkabel verbunden ist, über eine entstandene Flüssigkeitssäule mit dem ersten in Verbindung gebracht. Als Lichtquelle dient ein Xenon Blitzlicht (205nm). Ein Spektrometer berechnet das Licht, welches durch die Flüssigkeitssäule der Probe gelangt. Mit Hilfe eines dazugehörigen Programmes wurde die Konzentration der DNA bzw. RNA berechnet.

Nach der Gewinnung der EtOH gefällten RNA Proben ergab der Nanodrop folgende Messwerte:

Gewebe	RNA Gehalt ng/µl	A 260/280	A 260/230
A 71	1065,4	2	2,32
B 15	248,7	1,83	2,49
D 9	2778,8	2,07	2,22
O 39	2973,3	2,02	2,24
M 66	597,5	1,94	2,32
S 52	172,2	1,69	2,61
F 10	91,6	1,73	2,9
B 100	1066,6	1,97	2,3

Tabelle 6: Übersicht des RNA Gehaltes der Proben nach Nanodrop Messung

Der Wert A 260/280 und A 260/230 lässt Rückschlüsse auf den Grad der Kontamination der Probe durch Proteine zu. Werte unter 2 lassen einen erhöhten Proteingehalt vermuten.

3.2.10 DHPLC

IP-RP-HPLC (*Ion-pair reversed Phase high-pressure liquid Chromatography*) wurde erstmals 1995 von Oefner und Underhill [Oefner and Huber, 2002] beschrieben. Es bezeichnet eines der sensitivsten Verfahren zur Detektion von Mutationen, Insertionen und Deletionen [Oefner and Huber, 2002].

Geräte: Wave® DNA Fragment Analysis System, Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA
WAVEMaker® Software, Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA

Reagenzien:

- Puffer A 0,1 M Triethylammoniumacetat pH 7,0,
Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA
- Puffer B 0,1 M Triethylammoniumacetat pH 7,
025% Acetonitril,
Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA
- Flussrate Puffer 0,75ml/min

Durchführung:

Das Wave System besteht aus einer sogenannten stationären und einer mobilen Phase. Als stationäre Phase wird eine aus alkylierten Polystyren-Divinylbenzen Partikeln bestehenden Säule verwendet [Huber et al., 1993]. Diese ermöglicht, mit Hilfe der mobilen Phase, eine größenabhängige Trennung der DNA Fragmente. Die mobile Phase wird von den beiden Puffern gebildet, die über die Säule laufen. TEAA dient der Bindung des Fragmentes an die Säule, während Acetonitril die DNA von der Säule eluiert (sh. unten). Die Puffer und auch die Proben werden mit Hilfe einer Pumpe in die Säule injiziert.

Nach der Amplifizierung des DNA Produktes mittels PCR werden die Proben zunächst im Wave System erhitzt, was zur Denaturierung der DNA Doppelstränge führt. Durch das anschließende Abkühlen lagern sich die entstandenen Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammen. Dabei können 4 verschiedenen Doppelstränge entstehen:

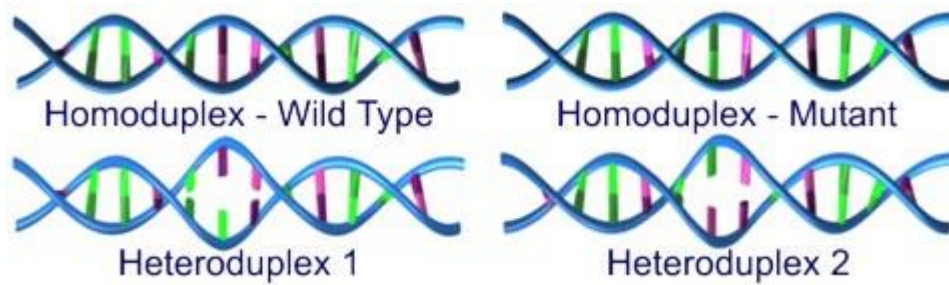


Abbildung 14: Schematische Darstellung der 4 möglichen Doppelstränge [Transgenomic, 2010]

Heteroduplices enthalten Basenpaarungen, die von den Watson-Crick Basenpaaren AT und GC abweichen. Diese bilden keine oder nur wenige Wasserstoffbrückenbindungen wodurch die Doppelstränge weniger hitzestabil sind.

Homoduplices enthalten nur Wasserstoffbrücken und sind somit deutlich hitzestabiler.

Die Probe, die Hetero- und Homoduplices enthält, wird nun in eine Säule, die die Puffer Triethylammoniumacetat (TEAA) und Acetonitril (ACN) enthält, gespritzt. In dieser Lösung bildet TEAA das positiv geladene Triethylammonium Ion (TEA⁺), welches sowohl hydrophile als auch hydrophobe Enden hat. Die DNASep Säule enthält hydrophobe Enden und interagiert darüber mit den TEAA Molekülen. Die DNA bindet über ihre negativ geladenen Phosphatgruppen an das positive geladene TEAA Ion. Somit bindet TEA einerseits die DNA durch seine positive geladene Ammoniumgruppe und andererseits über hydrophobe Ethylgruppen an der Säule [Frueh and Noyer-Weidner, 2003]. Längere DNA Fragmente binden fester über TEA an die Säule, da sie mehr Bindungsstellen zur Verfügung haben.

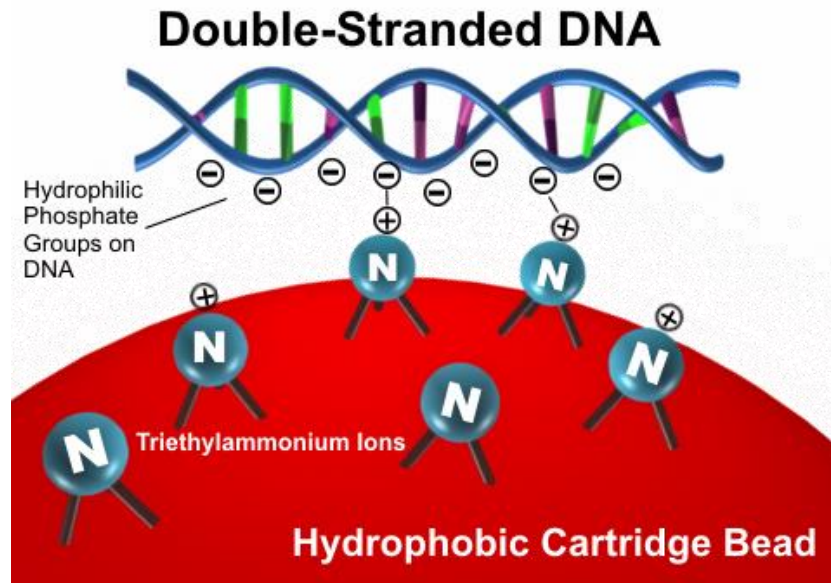


Abbildung 15: Anlagerung der DNA über negativ Phosphatgruppen an die DNASep Säule mit Hilfe der Triethylammonium Ionen (TEAA) [Transgenomic, 2010]

Ein stetiger Anstieg der ACN Konzentration im Puffer führt über eine Konkurrenz mit den hydrophoben Bindungen zwischen der Säule und der DNA zu einer Elution der DNA von der Säule. Heteroduplices lösen sich zuerst von der Säule. Ebenso lösen sich kürzere Fragmente schneller, da sie über weniger Bindungsstellen an die Säule gebunden sind als längere. Mit Hilfe der Navigator Software wird sowohl die Temperatur für die Denaturierung als auch die Konzentration an ACN bestimmt. Die gelösten Fragmente passieren nun einen UV Detektor, der die Absorption über die Zeit misst. Die Navigator Software wandelt diese Information in ein Chromatogramm um. Heteroduplices die sich früher von der Säule lösen entsprechen einem früheren Peak im Chromatogramm.

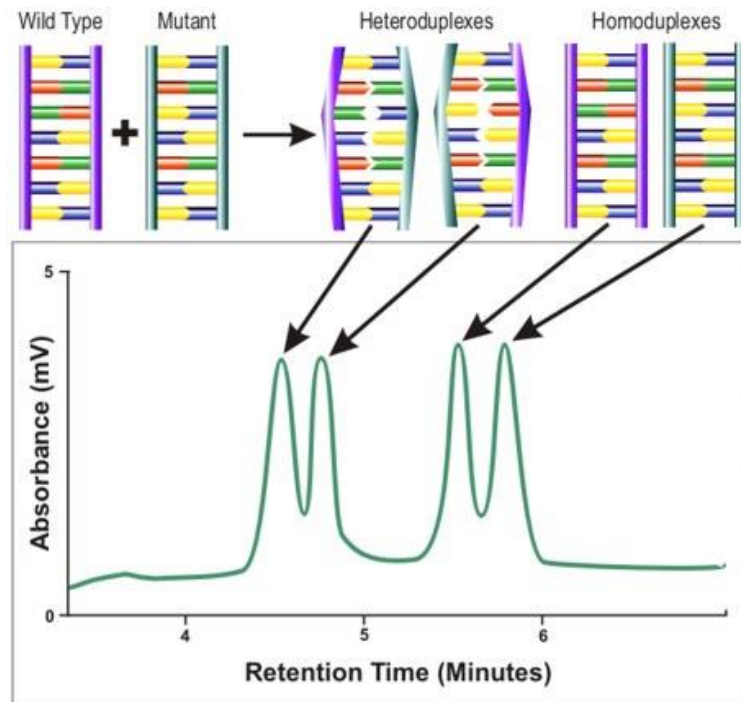


Abbildung 16: Darstellung der Hetero- und Homoduplexes mittels Chromatogram [Transgenomic, 2010]

Über die Höhe der Peaks im Chromatogram können Rückschlüsse auf den DNA Gehalt der Probe gemacht werden.

Ermittlung der Temperatur

Die Wahl der Temperatur ist ein wichtiger Schritt bei der Detektion von Mutationen oder Insertionen/Deletionen. Durch Erhöhung der Temperatur kommt es zur Denaturierung und Trennung der Doppelstränge. Wird eine Temperatur gewählt die unter 50°C-55°C liegt, es also zu keiner Denaturierung kommt, ist die Auftrennung der Fragmente streng abhängig von der Länge der Fragmente [Oefner and Huber, 2002]. Lange DNA Fragmente besitzen mehr Phosphatgruppen, über die sie via TEAA an die Säule binden können. Erst bei Temperaturen, die diesen Bereich überschreiten kommt es zu einer Denaturierung und die Trennung der Fragmente ist abhängig von der Sequenz. Wir haben eine Temperatur von 50°C gewählt, da wir lediglich eine Auftrennung nach der Größe der Fragmente erreichen wollten.

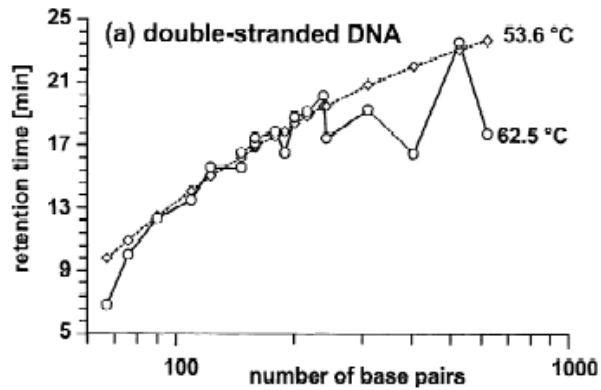


Abbildung 17: Abhängigkeit der molekularen Größe doppelsträngiger DNA unter denaturierenden und nicht denaturierenden Konditionen [Oefner and Huber, 2002]

3.2.11 KM-Plotter

Mit dem KM-Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) steht eine Datenbank zur Verfügung, die öffentliche Daten von 2978 Mammakarzinompatientinnen, 1464 Ovarialkarzinompatientinnen und 1715 Bronchialkarzinompatienten beinhaltet. Insgesamt 22277 Gene können untersucht werden. Daten über das progressionsfreie Überleben, das Gesamtüberleben und die Genexpression stammen aus GEO- (Gene Expression Omnibus), EGA- (European Genome-phenome Archive) und TCGA-Daten (Cancer Genome Atlas).

Zur Bestimmung des prognostischen Wertes eines Gens werden die Patienten in 2 Gruppen geteilt, entsprechend einer hohen bzw. niedrigen Expressionsstärke des jeweiligen Gens. Berechnet wird die Hazard ratio und der p-Wert der jeweiligen Statistik. Grafisch dargestellt wird das Ergebnis mittels Kaplan Meier Kurven [Gyorffy B, 2012].

3.2.12 Berechnung Cut off Wert des KAI1- Δ ex7

Der Cut-off Wert wurde mit Hilfe der ROC Kurve (*Receiver-Operating-Characteristics*) berechnet und liegt bei 41%.

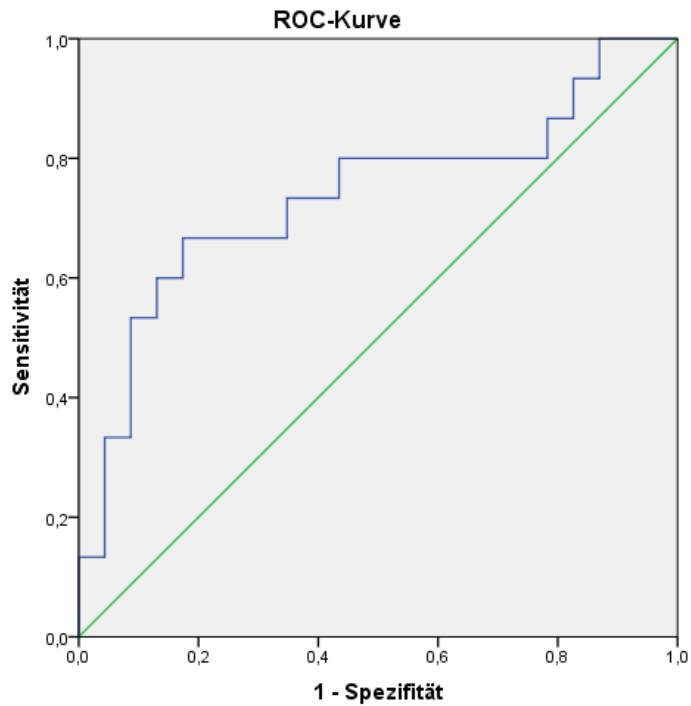


Abbildung 18: ROC Kurve zur Berechnung des Cut-Off Wertes

4. Ergebnisse

4.1 RT-PCR zur Darstellung von KAI- Δ ex7

Aus den vorhandenen Ovarialkarzinomgeweben und den Zelllinien wurde cDNA präpariert und anschließend die RT-PCR in 2 Schritten durchgeführt.

Nach der PCR mit den Primern KAI1 „full length“ und der anschließenden PCR mit den Primern „KAI1 splice“ konnten die Amplifikate im Agarose Gel dargestellt werden. Nach Durchführung der 1. PCR waren noch keine Banden im Gel sichtbar. Erst nach anschließender Durchführung der PCR mit „KAI1 splice“ Primern waren genügend Produkte amplifiziert und Banden im Gel zu sehen.

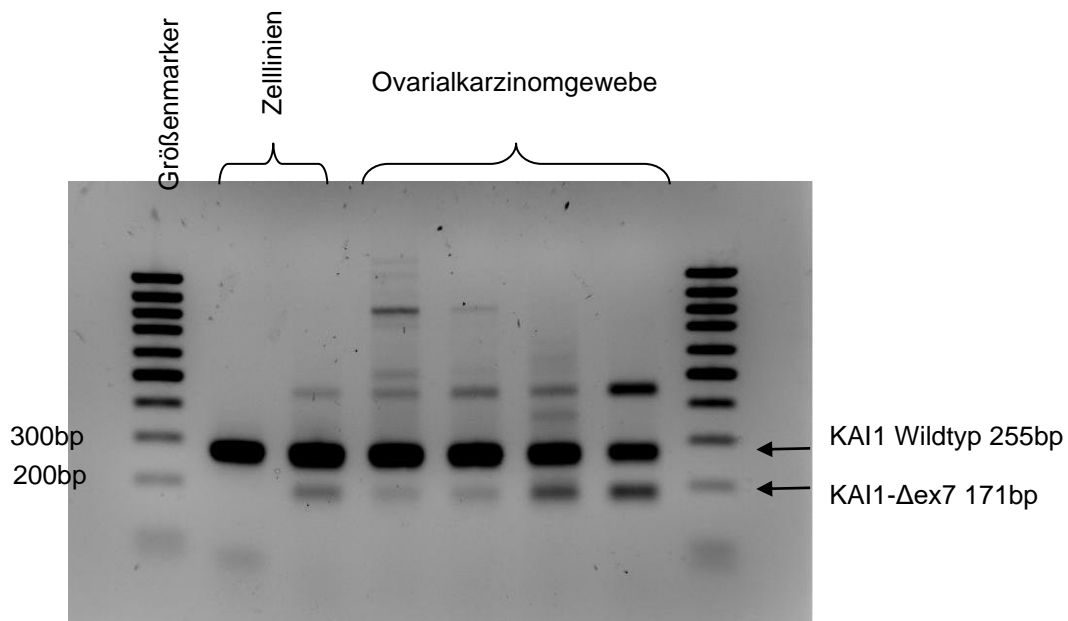


Abbildung 19: Darstellung des KAI1 Wildtyp (255bp) und der Speißvariante (171bp) mittels Gelelektrophorese nach Durchführung der 2. PCR mit „KAI1 spliced“ Primern

4.2 Quantitativer Vergleich mit HPRT Primern

Eine Relativierung der Menge an KAI1- Δ ex7 bzw. KAI1-Wildtyp in den jeweiligen Geweben gelang mit Hilfe des Vergleiches mit HPRT, welches als „*Housekeepergen*“ verwendet wurde. In dem Großteil der Karzinomgewebe konnte KAI1- Δ ex7 detektiert werden, und mit besonders hoher Expression in den Metastasen im Omentum majus.

Vergleicht man die KAI1 Expression einer Patientin im Primärtumor und in der Metastase, so zeigt sich eine deutlich höhere KAI1 Wildtyp Expression im Primärtumor (Reihe 10 Primärtumor, Reihe 11 Metastase der gleichen Patientin).

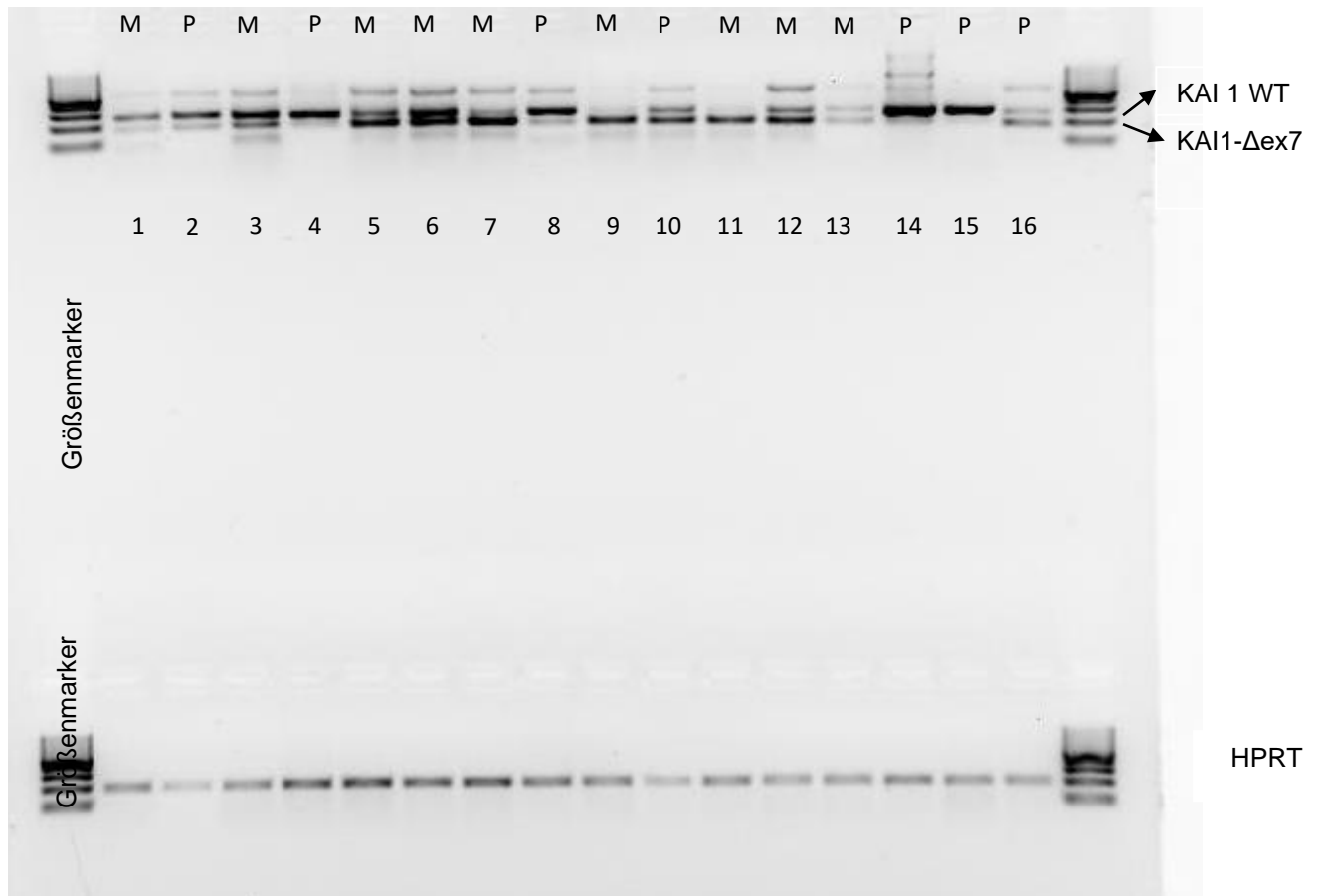


Abbildung 20: Relative Expression von KAI1- Δ ex7 (nach 2. PCR) im Vergleich zu HPRT als *Housekeeper*, P: Primärtumor, M: Metastase

4.3 Darstellung und Quantifizierung der KAI- Δ ex7-Spleißvariante mittels DHPLC

Mit Hilfe der IP-RP-HPLC (Ion-pair reversed Phase high-pressure liquid Chromatography) konnte ein Screening der Proben auf das Vorhandensein von KAI1- Δ ex7 durchgeführt werden. Bei den Geweben, die verschiedene Isoformen des KAI1 enthalten, entstehen durch das Erhitzen Homo- und Heteroduplices. Einerseits lagern sich die Einzelstränge der Spleißvariante wie auch der Wildtypform zu zwei

verschiedenen Homoduplices zusammen, andererseits entstehen aber auch Heteroduplices aus je einem Strang Spleißvariante und einem Strang Wildtyp, wie in Abb. 27 dargestellt ist.

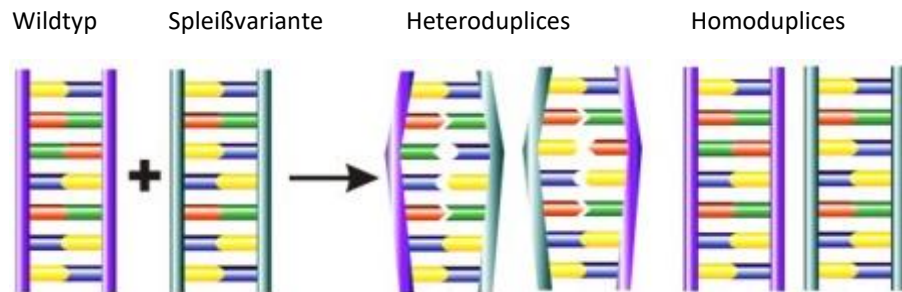


Abbildung 21: Schematische Darstellung der möglichen Doppelstränge nach Denaturierung [Transgenomic, 2010]

Die Homo- und Heteroduplices unterscheiden sich durch eine verschieden starke Bindung an die Säule des Wave Gerätes. Diese Tatsache macht sich die DHPLC Technologie zu nutzen, und kann so eine Differenzierung zwischen Spleißvariante, Wildtyp und Heteroduplices erzeugen.

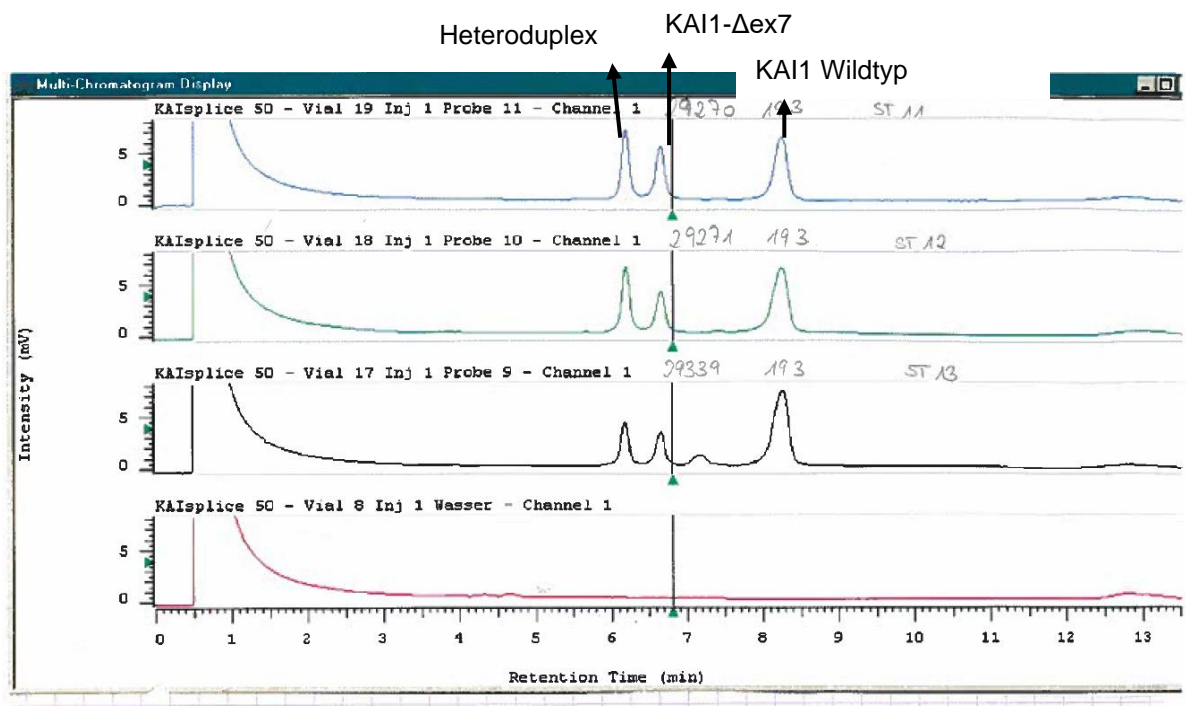


Abbildung 22: Darstellung der Homo- und Heteroduplices mittels HPLC

Durch die Messung der Fläche der jeweiligen Peaks (mit Hilfe der Wavemaker Software) können semiquantitative Rückschlüsse auf den Gehalt an Spleißvariante in dem Gewebe gemacht werden.

Nummer	relative Expression von KAI1 Δ ex7 (%)	Lokalisation
01a	54,6	Netz
02a	64,1	Ovar
03a	16,7	Netz
04a	8,1	Ovar
05a	83,3	Unklar
06a	51,8	Netz
07a	31,6	Unklar
08a	72,7	Netz
09a	19,0	Ovar
10a	48,7	Netz
11a	56,6	Ovar
12a	69,8	Netz
13a	65,7	Ovar
14a	low	Ovar
15a	11,9	Ovar
16a	2,6	Ovar
17a	37,2	Ovar
18a	0,0	Netz
19a	32,6	Ovar
20a	36,0	Borderlinetumor
21a	41,8	Netz
N20	12,7	gesundes Ovar
T02	0,5	Netz
T03	4,9	Ovar
T04	40,7	Ovar
T05	x	Netz
T06	36,0	Ovar
T07	52,1	Netz
T09	5,6	Netz
T10	27,7	Ovar
T11	20,3	Netz
T13	55,3	Ovar
T14	43,9	Ovar
T18	25,1	Ovar
T21	0,0	Ovar
T22	19,7	Ovar
T24	6,9	unklar
T25	40,3	unklar
T28	45,5	Netz
33052	85,5	unklar

Tabelle 7: Anteil der Spleißvariante KAI1 Δ ex7 im Vergleich zu der Gesamtexpression von KAI1 in den Gewebeproben (gemessen mit Hilfe der Wavemaker Software) unter Angabe der Lokalisation der Gewebeprobe, x: keine Messung möglich, Teil 1

Nummer	relative Expression von KAI1 Δex7 (%)	Lokalisation
A71	18,8	unklar
B15	39,2	unklar
D9	16,1	unklar
O39	80,0	unklar
M66	42,0	unklar
S52	x	unklar
F10	15,9	unklar
B100	10,3	unklar

Tabelle 8: Anteil der Spleißvariante KAI1 Δ ex7 im Vergleich zu der Gesamtexpression von KAI1 in den Gewebeproben (gemessen mit Hilfe der Wavemaker Software) unter Angabe der Lokalisation der Gewebeprobe, x: keine Messung möglich, Teil 2

Somit ergeben sich 19 Gewebe aus dem Ovar, von denen 32% einen hohen Anteil der Spleißvariante haben.

4.4 Nachweis der Spleißisoform KAI- Δ ex7 über Pst1-Verdau

Zur weiteren Überprüfung, ob die entsprechenden Gewebe auch wirklich die Spleißvariante des KAI1 enthalten, und nicht eine andere Sequenz hinter den Gelbanden bei der entsprechenden Basenpaaranzahl steht, wurde ein Pst1-Verdau durchgeführt. Ausgewählt wurden 2 Gewebe (Gewebe Nr. 29072, 29271) mit einem hohen Anteil an KAI1- Δ ex7 in den Auswertungen der DHPLC. Pst1 ist ein Restriktionsenzym, das bei der Sequenz CTGCAG spaltet, welches KAI1 „full length“ somit in 3 Fragmente von 406bp, 264bp und 131bp spaltet. Die Spleißisoform des KAI1 hat eine Schnittstelle für Pst1 verloren und wird nur in 2 Fragmente gespalten (406bp, 311bp). Die Fragmente der entsprechenden Größe können mit Hilfe der Gelelektrophorese dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die erwarteten Fragmente im Gel nachzuweisen waren und die Gewebe somit sowohl KAI1 „full length“ als auch KAI1- Δ ex7 enthalten.

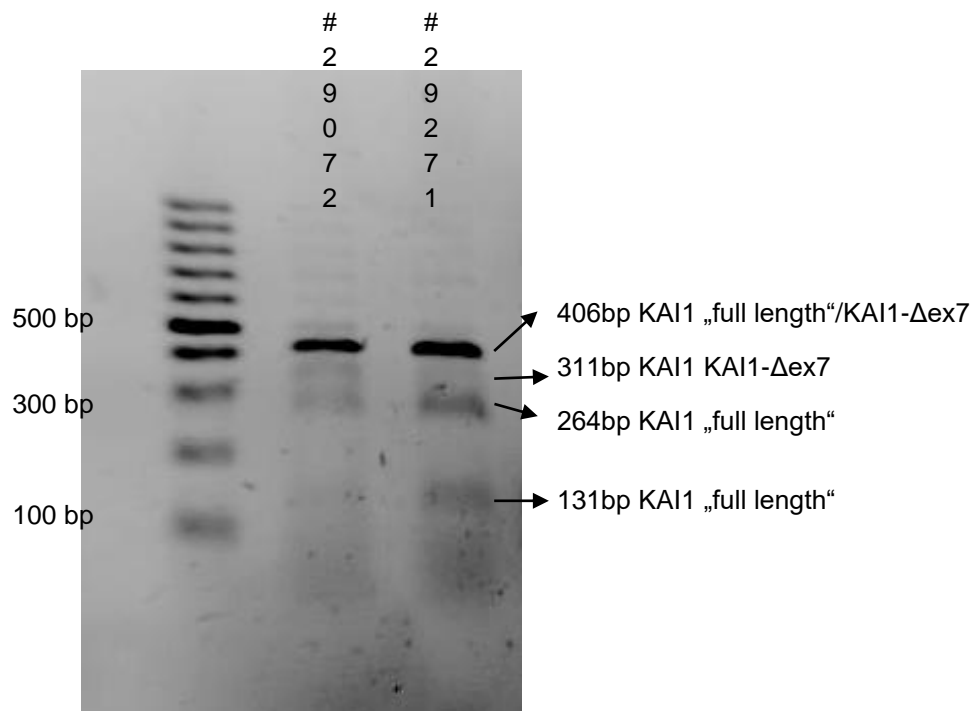


Abbildung 23: Gewebe #29072, #29271 nach Pst1 Verdau mit den Banden bei KAI1- Δ ex7 (406bp, 311bp) und KAI1 „full length“ (406bp, 264bp, 131bp)

4.5 Herstellung von Expressionsplasmiden mit KAI1 „full length“ und KAI1- Δ ex7

Um für weitere funktionelle, zellbiologische Experimente ein Expressionsplasmid mit der Spleißvariante zur Verfügung zu haben, wurden Klone mit KAI1- Δ ex7 bzw. KAI1 Wildtyp hergestellt. Das Expressionsplasmid wurde von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Reuning verwendet um zu untersuchen, ob KAI1- Δ ex7 einen Effekt hat auf die Integrin induzierte Tumorbilologie hat [Upheber et al., 2015].

Für die Klonierung wurde das Gewebe 29072 verwendet. Zur Schaffung der entsprechenden Restriktionsschnittstellen an KAI1- Δ ex7 und KAI1 „full length“ wurde zunächst eine PCR mit speziellen Primern durchgeführt. Durch diese Primer wurden Schnittstellen für die anschließend verwendeten Restriktionsenzyme HindIII/Xba geschaffen. Zuerst wurde die entsprechende Bande des PCR Produktes aus dem Agarosegel geschnitten und die DNA daraus gewonnen. Nach Hind III, Xba-Verdau des KAI1- Δ ex7 und des Plasmids wurde die Transformation in XL1-blue-Zellen durchgeführt. Hind III und Xba schneiden das Plasmid bei Position 911bp. Zur Überprüfung welches der Plasmide die Spleißvariante eingebaut hat, wurde ein Pst1-Verdau durchgeführt. Das Plasmid mit KAI1 „full length“ wird dabei in 3 Fragmente geschnitten (KAI1 „full length“ 4459bp, 1594bp und 264bp), während KAI1- Δ ex7 in 2 Fragmente von 4459bp und 1721bp Größe geschnitten wird. Eine Schnittstelle des Restriktionsenzymes Pst1 befindet sich außerdem im Bereich des Plasmids. KAI1 „full length“ und Δ ex7 werden an den bekannten Stellen geschnitten.

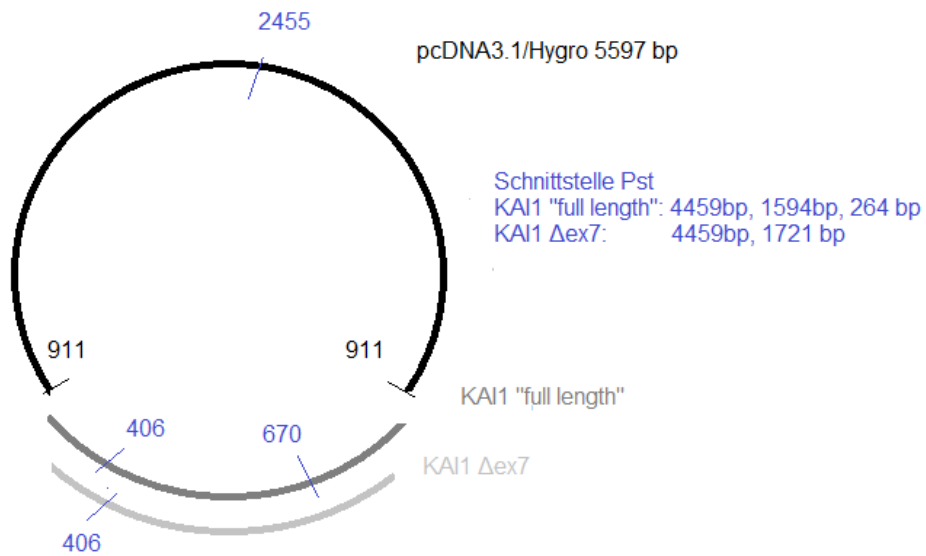


Abbildung 24: Schnittstellen des Plasmids pcDNA3.1/Hygro mit KAI1-Δex7 oder „full length“ mit dem Restriktionsenzym Pst1.

Das nach dem Verdau durchgeführte Gel zeigt, dass die überprüften Klone die Spleißisoform eingebaut hatten.

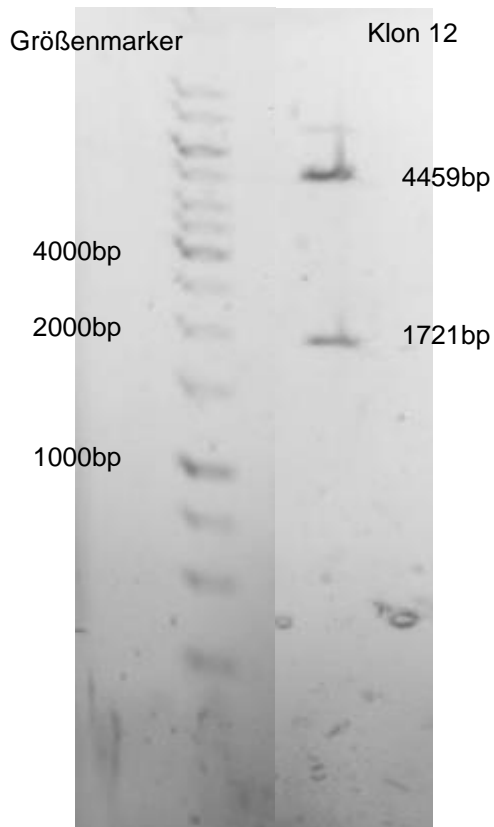


Abbildung 25: Gelelektrophorese des Klon 12, der die Spleißvariante enthält (4459bp und 1721bp), bearbeitet

Vor Durchführung der Sequenzierung der Klone 6 und 12 des Gewebes #29072 wurde zur weiteren Überprüfung ein BamH1/Xba-Verdau durchgeführt. Durch diesen Verdau entstehen Fragmente von 619bp und 5681bp. Diese wurden auch im Gel nachgewiesen.

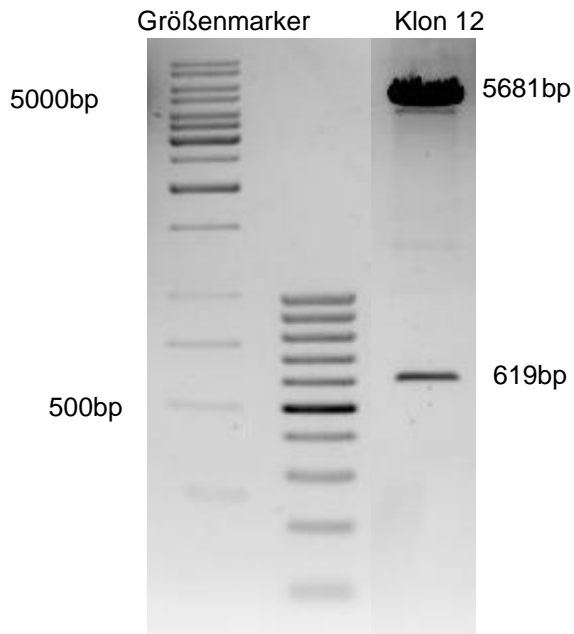


Abbildung 26: Klon 12 nach BamH1/Xba-Verdau, Fragmente von 619bp und 5681bp nachweisbar, bearbeitet

4.6 Überprüfen der DNA-Sequenz der klonierten Spleißvariante KAI- Δ ex7

Sequenziert wurden Vektoren aus den Klonen 6 und 12 des Gewebes #29072, bei welchen nachgewiesen wurde, dass sie die Spleißisoform des KAI1 enthalten. Vor Durchführung der Sequenzierung wurde eine erneute PCR mit den Primern am T7 Promoter und an der BGH site zur Amplifizierung des Inserts durchgeführt. Das Gel zeigt die entsprechenden Fragmente bei 813bp (Berechnung Kapitel 3.2.8, S.57).

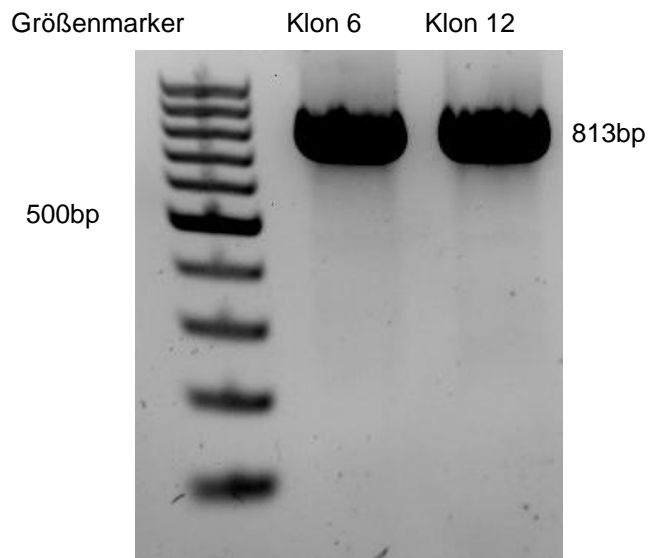


Abbildung 27: Insert Klon 6 und 12 nach Amplifikation mit T7 und BGH Primern, bearbeitet

Die Sequenzierung der Spleißisoform ergab bei den 2 untersuchten Klonen 6 und 12 verschiedene Mutationen in der Spleißvariante. Der Klon 6 wies lediglich eine Mutation auf, die zu einem Aminosäurenwechsel geführt hat und zusätzlich eine stille Mutation (c → t, Aminosäure Glycin). Auf das Sequenzieren weiterer Klone wurde verzichtet, da die Wahrscheinlichkeit relativ hoch schien, dass auch weitere Klone Mutationen aufweisen würden.

Sequenzierung Klon 6:

KAI1-Δex7-Referenzsequenz

atgggctcagcctgtatcaaagtcaccaaatactttcttcttcaactgatcttctttatcctgggcgagtgatcctgggcttgggggtggtgatcct
ggccgacaagagcagtttcatctctgtcctgcaaacctctccagctcgcttaggatggggcctatgtcttcatcggcgtggggcagtcactatgct
catgggcttctgggctgcatcggcgccgtcaacgagggtccgctgctgctggggctgactttgcttctctgctcctgatcctcattgccaggtgacg
gccggggcccttctacttcaacatgggcaagctgaagcaggagatgggctggcatcgtgactgagctcattcgagactacaacagcagtcgca
ggacagcctgcaggatgctgggactacgtgcaggctcaggtgaagtgtcggcgtgggtcagcttctacaactggacagacaacgctgagctca
tgaatgccctgaggtcacctaccctgttctcctgcaagtaagggggaagaggacaacagccttctgtgagggaagggcttctgcgaggccccc
ggcaacaggaccagagtggaaccacctgaggactggcctgtgtaccaggagctcctggggatggtcctgtccatctgctgtgccggcacgctc
cattccgaagactacagcaaggtccccaagtac (717 bp)

Protein:

MGSACIKVTKYFLFLFNLIFFILGAVILGFGVWILADKSSFISVLQTSSSSL
RMGAYVFIGVGAVTMLMGFLGCIGAVNEVRCLLGLYFAFLLLILIAQVTA
GALFYFNMGKLLKQEMGGIVTELIRDYNSREDSLQDAWDYVQAQVKCC
GWVSFYNWTDNAELMNRPEVTYPCSEVKGEEDNSLSV**R**KGFCEAPGN
RTQSGNHPEdWPVYQELLGMVLSICLCRHVHSEdYSKVPKY

PCR-Produkt von KAI-Δex7 Klon 6 des Gewebes 29072:

atgggctcagcctgtatcaaagtcaccaaatactttcttcttcaactgatcttctttatcctgggcgagtgatcctgggcttgggggtggtgatcct
ggccgacaagagcagtttcatctctgtcctgcaaacctctccagctcgcttaggatggggcctatgtcttcatcggcgtggggcagtcactatgct
catgggcttctgggctgcatcggcgccgtcaacgagggtccgctgctgctggggctgactttgcttctctgctcctgatcctcattgccaggtgacg
gccggggcccttctacttcaacatgggcaagctgaagcaggagatgggctggcatcgtgactgagctcattcgagactacaacagcagtcgca
ggacagcctgcaggatgctgggactacgtgcaggctcaggtgaagtgtcggcgtgggtcagcttctacaactggacagacaacgctgagctca
tgaatgccctgaggtcacctaccctgttctcctgcaagtaagggggaagaggacaacagccttctgtgagggaagggcttctgcgaggccccc
ggcaacaggaccagagtggaaccacctgaggactggcctgtgtaccaggagctcctggggatggtcctgtccatctgctgtgccggcacgctc
cattccgaagactacagcaaggtccccaagtac (717 bp)

Protein:

MGSACIKVTKYFLFLFNLIFFILGAVILGFGVWILADKSSFISVLQTSSSSL
RMGAYVFIGVGAVTMLMGFLGCIGAVNEVRCLLGLYFAFLLLILIAQVTA
GALFYFNMGKLLKQEMGGIVTELIRDYNSREDSLQDAWDYVQAQVKCC
GWVSFYNWTDNAELMNRPEVTYPCSEVKGEEDNSLSV**G**KGFCEAPGN
RTQSGNHPEdWPVYQELLGMVLSICLCRHVHSEdYSKVPKY

■ stille Mutation GGC -> GGT, Glycin (G)

■ Aminosäurenaustausch AGG -> GGG, also Arg (R) -> Gly (G)

Sequenzierung Klon 12:

KAI1-Δex7-Referenzsequenz

atgggctcagcctgtatcaaagtcaccaaatactttcttcttcaactgatcttctttatcctgggcgagtgatcctgggcttgggggtggtgatcct
ggccgacaagagcagtttcatctctgtcctgcaaacctctccagctcgcttaggatggggcctatgtcttcatcggcgtggggcagtcactatgct
catgggcttctgggctgcatcggcgccgtcaacgaggtccgctgctgctgggctgactttgcttctctgctcctgatcctcattgccaggtgacg
gccggggcccttctacttcaacatgggcaagctgaagcaggagatgggctggcatcgtgactgagctcattcgagactacaacagcagtcgca
ggacagcctgcaggatgctgggactcgtgcaggctcaggtgaagtgctgctgggctgggtcagcttctacaactggacagacaacgctgagctca
tgaatgccctgaggtcacctaccctgttctgcaagtaagggggaagaggacaacagccttctgtgagggaagggtcttgcgaggccccc
ggcaacaggaccagagtggaaccaccctgaggactggcctgtgtaccaggagctcctggggatggtcctgtccatctgcttgcggcacgctc
cattccgaagactacagcaaggtccccaagtac (717 bp)

Protein:

MGSACIKVTKYFLFLFNLIFFILGAVILGFGVWILADKSSFISVLQTSSSSL
RMGAYVFIGVGAVTMLMGFLGCIGAVNEVRCLLGLYFAFLLLILIAQVTA
GALFYFNMGKLLKQEMGGIVTELIRDYNSREDSLQDAWDYVQAQVKCC
GWVSFYNWDNAELMNRPEVTYPCSEVKGEEDNSLSV**R**KGFCEAPGN
RTQSGNHPEdWPVYQELLGMVLSICLCRHVHSEdYSKVPKY

PCR-Produkt von KAI-Δex7 Klon 12 des Gewebes 29072:

atgggctcagcctgtatcaaagtcaccaaatactttcttcttcaactgatcttctttatcctgggcgagtgatcctgggcttgggggtggtgatcct
ggccgacaagagcagtttcatctctgtcctgcaaacctctccagctcgcttaggatggggcctatgtcttcatcggcgtggggcagtcactatgct
catgggcttctgggctgcatcggcgccgtcaacgaggtccgctgctgctgggctgactttgcttctctgctcctgatcctcattgccaggtgacg
gccggggcccttctacttcaacatgggcaagctgaagcaggagatgggctggcatcgtgactgagctcattcgagactacaacagcagtcgca
ggacagcctgcaggatgctgggactcgtgcaggctcaggtgaagtgctgctgggctgggtcagcttctacaactggacagacaacgctgagctca
tgaatgccctgaggtcacctaccctgttctgcaagtaagggggaagaggacaacagccttctgtgagggaagggtcttgcgaggccccc
ggcaacaggaccagagtggaaccaccctgaggactggcctgtgtaccaggagctcctggggatggtcctgtccatctgcttgcggcacgctc
cattccgaagactacagcaaggtccccaagtac (717 bp)

Protein:

MGSACIKVTKYFLFLFNLIFFILGAVILGFGVWILADKSSFISVLQTSSSSL
RMGAYVFIGVGAVTMLMGFLGCIGAVNEVRCLLGLYFAFLLLILIAQVTA
GALFYFNMGKLLKQEMGGIVTELIRDYNSREDSLQDAWDYVQAQVKCC
GWVSFYNWDNAELMNRPEVTYPCSEVKGEEDNSLSV**G**KGFCEAPGN
RTQSGNHPEdWPVYQELLGMVLSICLCRHVHSEdYSKVPKY

Im PCR-Produkt des Klon 6 trat ein AGG → GGG, also ein Arg (R) → Gly (G)-Austausch auf. Deshalb sollte dieser Basenaustausch per *in vitro*-Mutagenese rückgängig gemacht werden.

4.7 In vitro-Mutagenese

Die Mutation konnte im Rahmen der Mutagenese mit den entsprechend entwickelten Primern eliminiert werden (sh. Seite 55). Nach dem Dpn1 Verdau wurden die methylierten Plasmide zerschnitten, und es blieben nur die neu synthetisierten Plasmide mit der korrigierten Form der Spleißisoform übrig, da diese keine Methylierung besitzen.

Zur Prüfung ob das jeweilige Insert auch im Vektor eingebaut wurde, haben wir erneut einen HindIII/Xba-Verdau durchgeführt. Das anschließend durchgeführte Gel bestätigt den Einbau des Inserts (sh. Anhang S.116, Abbildung Nr. 38)

Das Expressionsplasmid wurde für zellbiologische Arbeiten in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Reuning weiterverwendet. Beispielsweise zeigte KAI1 Wildtyp eine Kolokalisation mit αv -Integrin an der Zelloberfläche von Ovarialkarzinomzellen, welche KAI1- $\Delta ex7$ nicht mehr aufzeigt. Die Experimente zur Kolokalisation wurden von Upheber et al. durchgeführt und sind hier exemplarisch dargestellt:

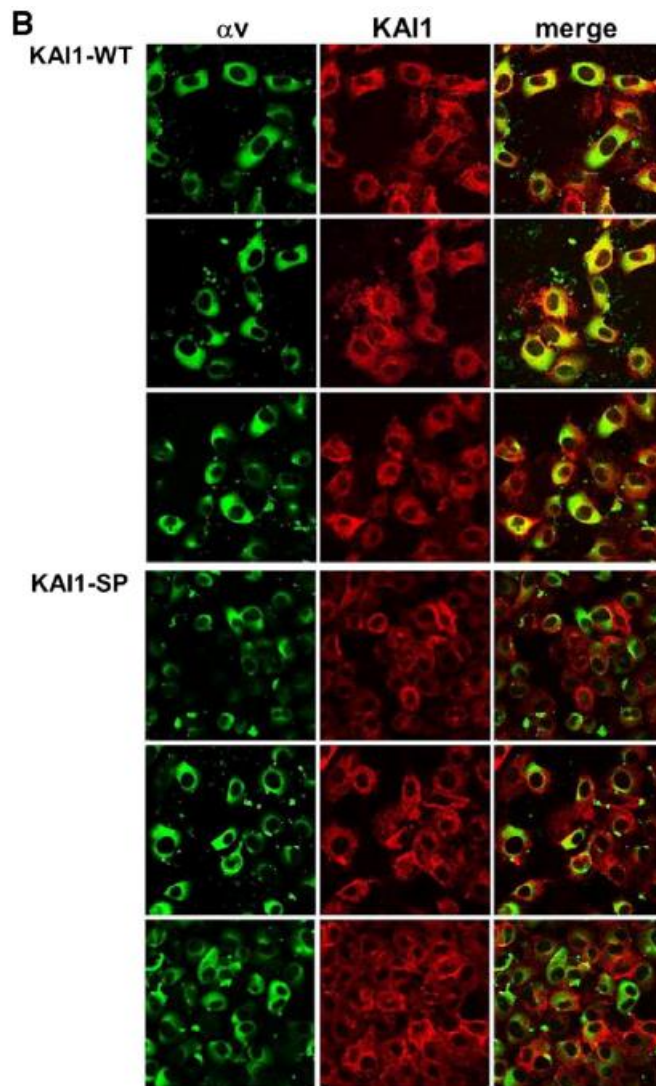


Abbildung 28: Es zeigt sich eine Kolokalisation von α _v-Integrin mit KAI1 Wildtyp, sichtbar an der gelben Färbung der Überlappungen. Bei KAI1- Δ ex7 zeigt sich keine sichtbare Kolokalisation mit α _v [Upheber et al., 2015]

Desweiteren konnten Unterschiede in der Proliferation, Adhäsion und Migration bei KAI1 Wildtyp- und KAI1- Δ ex7-Zellen von Upheber et al. festgestellt werden, die in der Diskussion näher ausgeführt werden.

4.8 Korrelation der KAI1- Δ ex7 Expression mit klinischen Daten

KAI1 fungiert als Metastasierungssuppressoren in verschiedenen Karzinomen, wie dem Prostata-, Lungen-, Pankreas- und Mammakarzinom. In diesen Tumorentitäten konnte, wie auch im Ovarialkarzinom vermutet wurde, gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung des KAI1 (KAI1 Expressionsrate im Vergleich zur Expressionsrate

eines „Housekeeping Gens“ verglichen mit den Werten einer Zelllinie [Huang et al., 1998]) mit einem schlechteren Überleben verbunden ist [Dong et al., 1996; Adachi et al., 1996; Guo et al., 1996; Huang et al., 1998].

Öffentliche Daten aus dem KM Plotter

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst öffentliche Daten mittels der KM-Plotter Software berechnet, für die eine deutlich größere Patientenzahl zur Verfügung stand. Hier zeigte sich ein Einfluss der KAI1 mRNA Expression auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben.

Mit Hilfe des Kaplan Meier Plotters, bei dem Ovarialkarzinompatientinnen auf die Auswirkungen einer hohen bzw. niedrigen Expression von KAI1 untersucht wurden, konnte bestätigt werden, dass eine starke Expression von KAI1 zu einer signifikanten Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom führt [Gyorffy B, 2012].

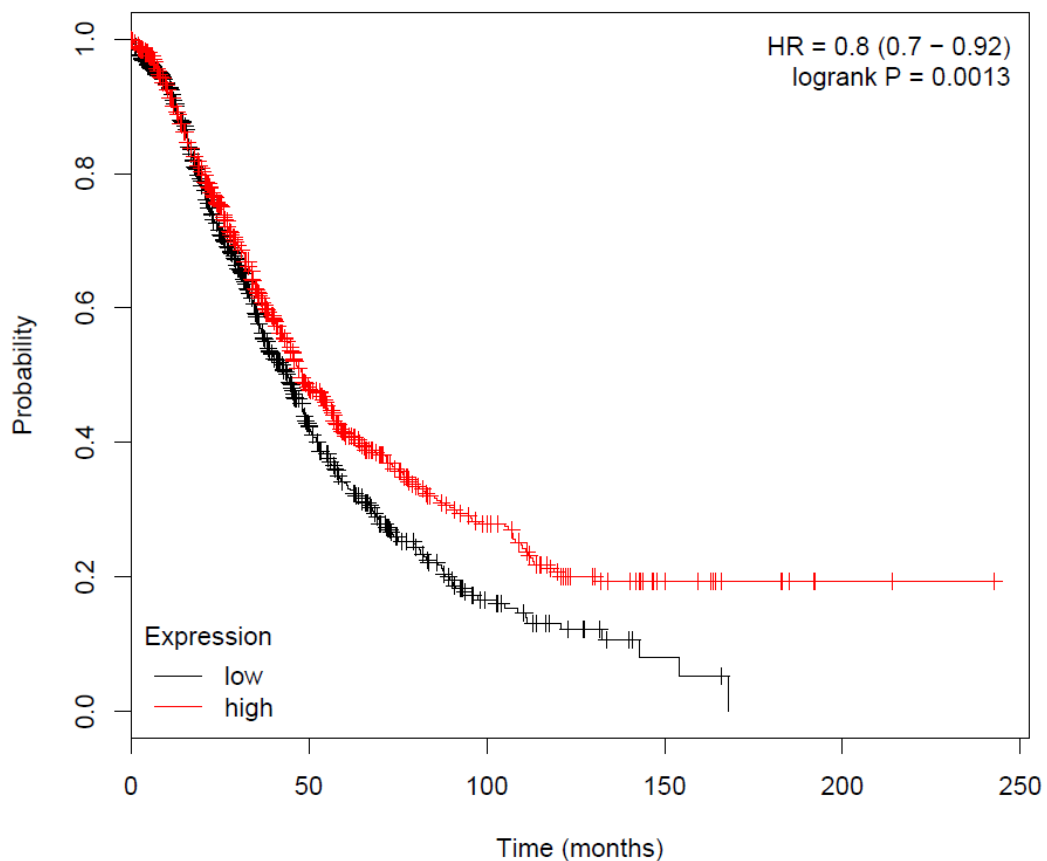


Abbildung 29: Einfluss der KAI1 Expression auf das Gesamtüberleben ($p=0.0013$, $n=1581$, cut off Wert 451), modifiziert nach [Gyorffy B, 2012]

Nicht nur auf das Gesamtüberleben, sondern auch auf das progressionsfreie Überleben hat eine hohe Expression von KAI1 einen positiven Einfluss.

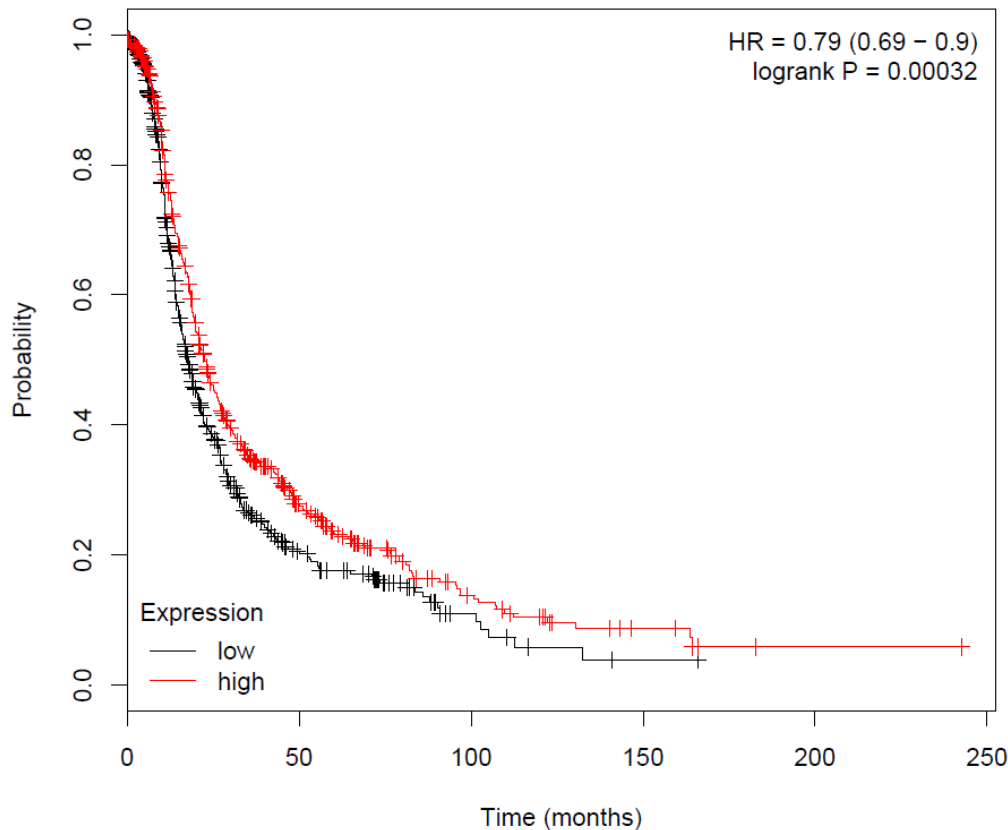


Abbildung 30: Einfluss der KAI1 Expression auf das progressionsfreie Überleben ($p=0.00032$, $n=1306$, cut Off Wert 403), modifiziert nach [Gyorffy B, 2012]

Daten aus den Ergebnissen am eigenen Patientenkollektiv

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Spleißvariante KAI1- Δ ex7 auf das Überleben der Patientinnen zu eruieren.

Durch einen Verlust des Exon 7 im KAI1 Gen entsteht die KAI1- Δ ex7 Form, die das Protein in seiner 3D-Struktur höchstwahrscheinlich stark verändert. Liegt in einem Karzinom eine hohe oder niedrige relative Expression von KAI1- Δ ex7 vor, so ergab sich im untersuchten Patientenkollektiv ein Einfluss auf die Überlebensraten der Patientinnen. Der Cut-off Wert wurde mit Hilfe der ROC Kurve (*Receiver-Operating-Characteristics*) berechnet und lag bei einem Anteil von 41% KAI1- Δ ex7 relativ zur Gesamtexpression.

Bei niedrigem Anteil an KAI1- Δ ex7 und somit einem Überwiegen des KAI1 Wildtyp, welches als Metastasierungssuppressor fungiert, zeigte sich ein Trend zu einem verlängerten Gesamtüberleben der Patientinnen ($p=0,059$).

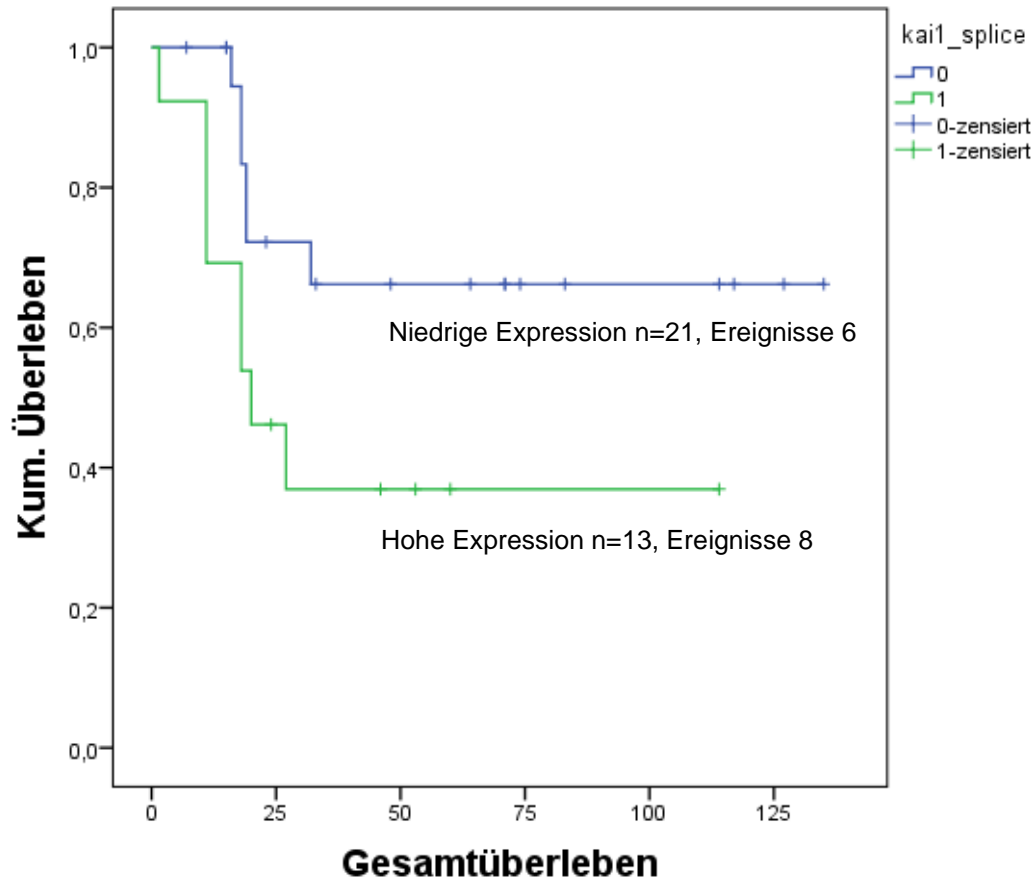


Abbildung 31: Einfluss des Expressionsniveaus von KAI1- Δ ex7 auf das Gesamtüberleben in Monaten, $n=34$, $p=0,059$, cut off Wert 41%. 5-Jahres Überleben bei hoher vs. niedriger Expression: 37 \pm 13,8% vs. 66 \pm 11,3%

Wenn der Einfluss einer unterschiedlichen Expressionshöhe von KAI1- Δ ex7 auf das rezidivfreie Überleben untersucht wurde, so zeigte sich kein Unterschied in den Überlebensdaten.

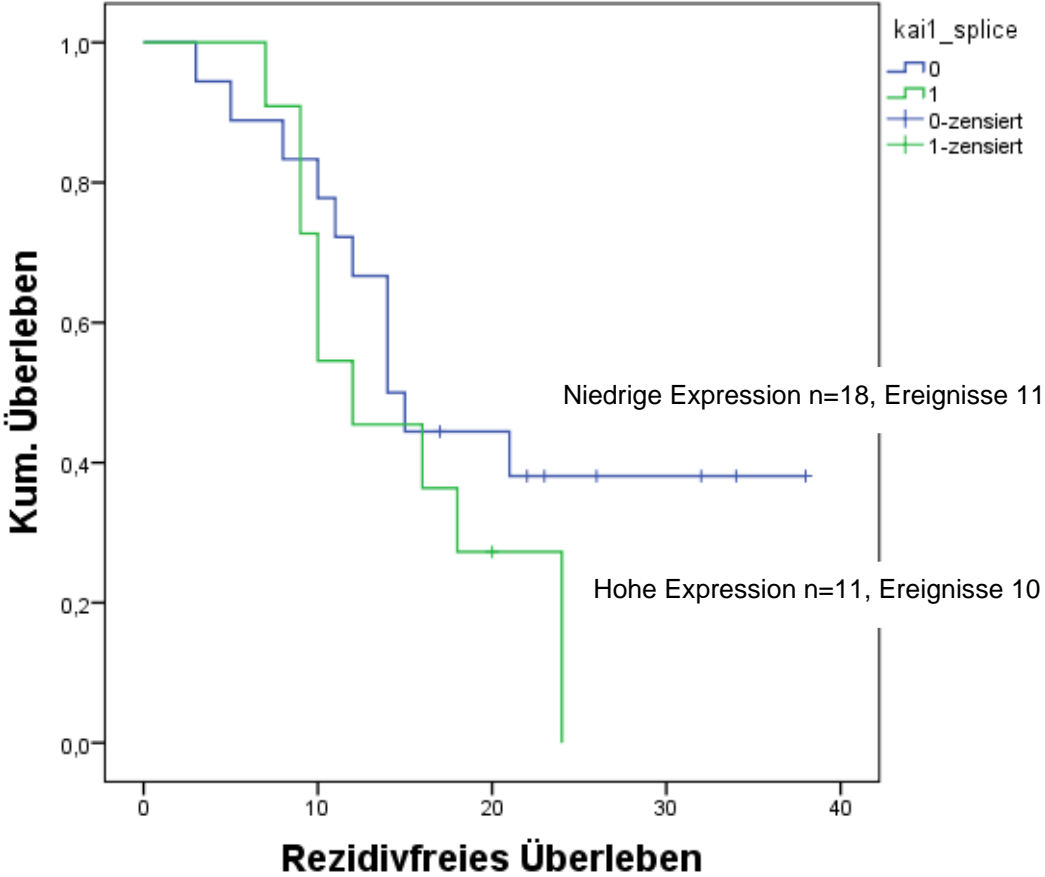


Abbildung 32: Einfluss des Expressionniveaus von KAI1- Δ ex7 auf das rezidivfreie Überleben in Monaten, $p=0,185$, cut off Wert 41%

Betrachtet man nun nur die Gewebe aus Tumorproben aus dem Omentum majus, so ergeben sich aufgrund der zu niedrigen Zahlen, keine signifikanten Ergebnisse. Es lässt sich aber der Trend, den wir bei Betrachtung aller Gewebe feststellen konnten, bestätigen.

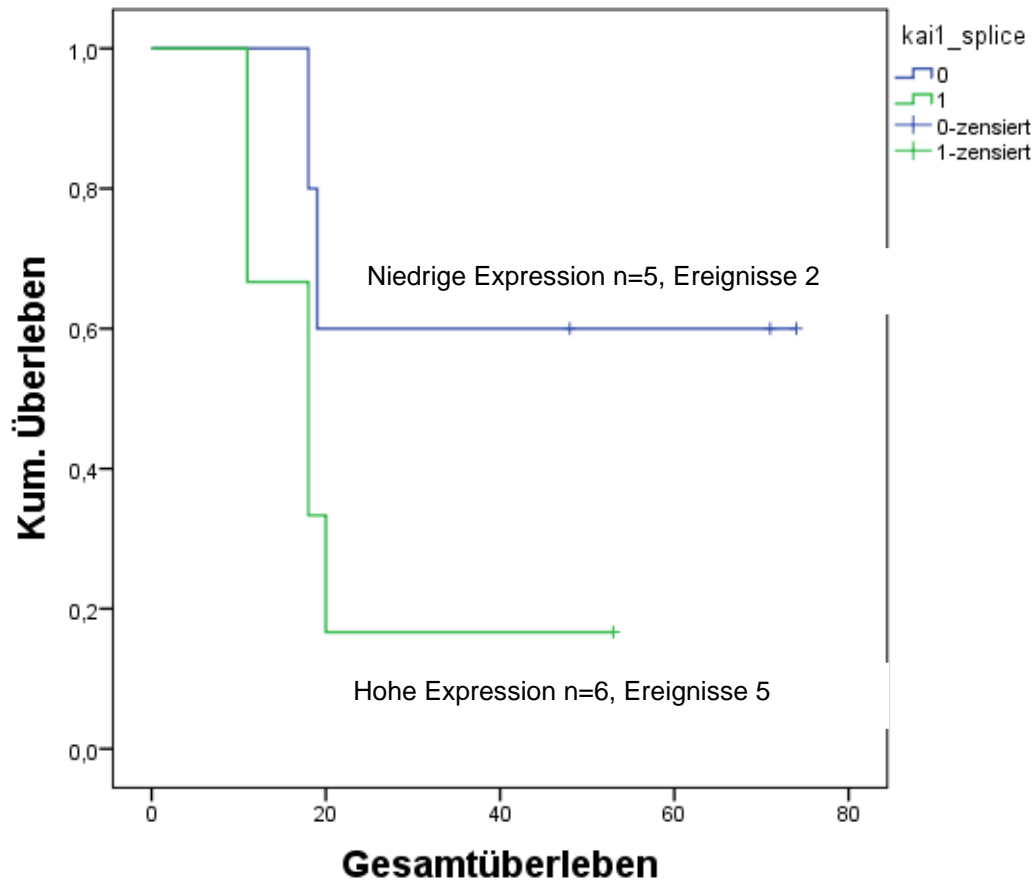


Abbildung 33: Einfluss des Expressionsniveaus von KAI1- Δ ex7 auf das Gesamtüberleben in Monaten unter Berücksichtigung lediglich der Netztumoren, $p=0,128$, cut off Wert 41%

Auch bei Untersuchung lediglich der serösen Karzinome zeigt sich ebenso, dass eine niedrige Menge an KAI1- Δ ex7 einen positiven Einfluss auf das Überleben der Patientinnen hat. Hier konnten wir einen deutlichen Trend aufzeigen ($p=0,054$), der auf Grund der geringen Patientenzahl die statistische Signifikanz verfehlte.

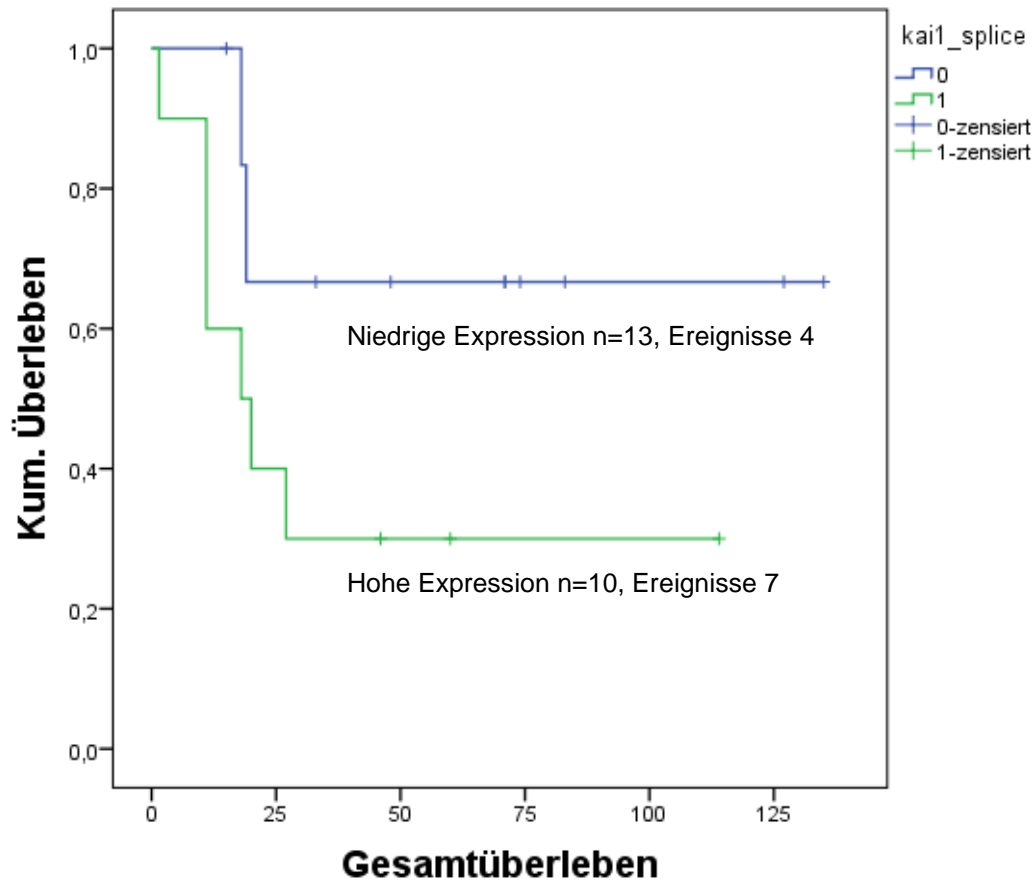


Abbildung 34: Einfluss des Expressionsniveaus von KAI1- Δ ex7 auf das Gesamtüberleben in Monaten unter Berücksichtigung lediglich der serösen Gewebe, $p=0,55$, cut off Wert 41%

4.9 Einfluss des KAI1 beim Mammakarzinom

Auch beim Mammakarzinom fungiert KAI1 wahrscheinlich als Metastasierungssuppressor. Mit Daten aus der KM Plotter Software (<http://kmplot.com/analysis>) konnte gezeigt werden, dass bei insgesamt 2978 Mammakarzinompatientinnen eine hohe Expressionsrate von KAI1, mit einem signifikant längerem Überleben assoziiert ist.

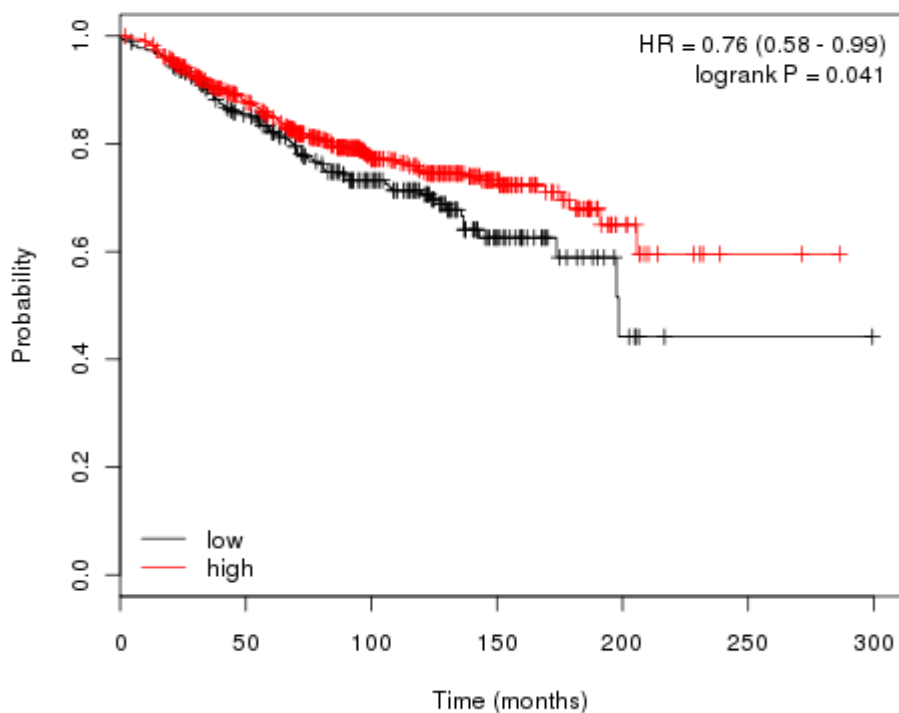


Abbildung 35: Einfluss von KAI1 auf das Gesamtüberleben beim Mammakarzinom, n=2978, p=0,041, cut off 342, modifiziert nach [Gyorffy et al., 2010]

Auch auf das rezidivfreie Überleben hat KAI1 einen signifikanten Einfluss, wie aus folgender Grafik hervorgeht.

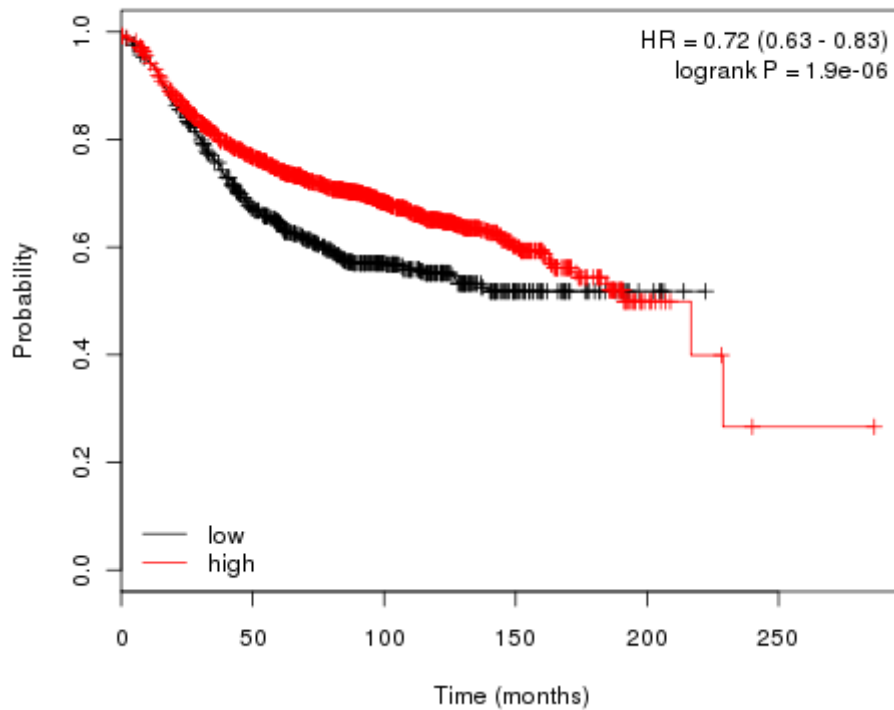


Abbildung 36: Einfluss von KAI1 auf das rezidivfreie Überleben beim Mammakarzinom, n=2978, p=1,9e-0,6, cut off 349, modifiziert nach [Gyorffy et al., 2010]

Dass KAI1 als Metastasierungssuppressor fungiert, kann auch anhand des KM Plotters bestätigt werden, wenn man den Zeitraum bis zum Auftreten von Fernmetastasen bei hohen und niedrigen KAI1 vergleicht.

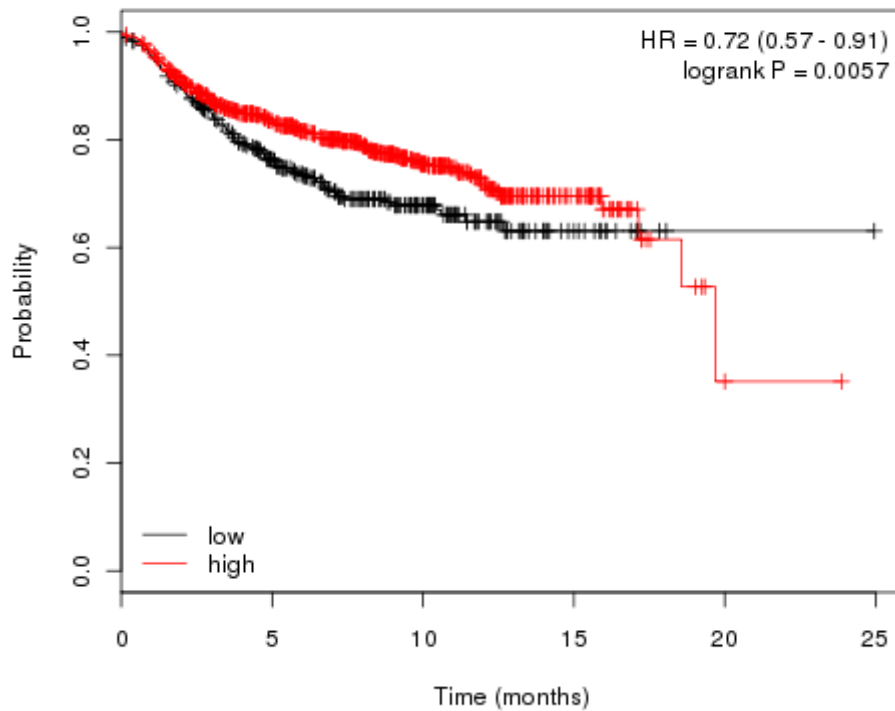


Abbildung 37: Einfluss von KAI1 auf den Zeitraum bis zum Auftreten von Fernmetastasen beim Mammakarzinom, n=2978, p=0,0057, modifiziert nach [Gyorffy et al., 2010]

5. Diskussion

Das Ovarialkarzinom hat eine 5 Jahresüberlebensrate von 43%, wenn alle Stadien gemeinsam betrachtet werden (FIGO I 89%, FIGO II 77%) [Robert Koch Institut, 2021], und zählt so zu einem der aggressivsten Tumore. Der wichtigste Prognosefaktor für das Ovarialkarzinom ist der in situ verbleibende Tumorrest nach einer radikalen Operation. Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen das Alter und die physische Verfassung der Patientin, wie auch der histologische Subtyp, das Grading und die Tumorausdehnung mit ggf. vorliegenden Fernmetastasen.

Um die Ursachen für die Entstehung von Karzinomen besser verstehen zu können, ist es Ziel der Forschung, die Charakteristika der Karzinogenese auf molekularer Ebene zu erforschen. Dies sollte zudem zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen, die individualisierte und spezifischere Therapien ermöglichen.

KAI1 als Metastasierungssuppressor

Eine wichtige Rolle spielen bei der Karzinogenese sowohl die Tumorsuppressorgene als auch die Onkogene. KAI1 ist ein Glykoprotein aus der Gruppe der *Transmembran 4 Superfamily*. Diese Proteinfamilie ist unter anderem involviert in die Steuerung der Zellbeweglichkeit und Signalweitergabe in der Zelle, und hat so einen Einfluss auf das Metastasierungspotential einer Zelle [Ruseva et al., 2009]. KAI1 wurde erstmals im Prostatakarzinom von Dong et al. [Dong et al., 1995] als Metastasierungssuppressor identifiziert. Nicht nur in vitro hat KAI1 einen Einfluss auf die Zellmigration, sondern hemmt auch im Tiermodell die Metastasierung [Yang et al., 2001]. Eine niedrige Expression von KAI1 korreliert mit einer schlechteren Prognose der Patienten, die an einem Prostata- [Bouras T, 1999], Lungen- [Adachi et al., 1996], Mamma- [Huang et al., 1998], Blasen-, Darm-[Maurer et al., 1999], Haut- [Takaoka et al., 1998], Endometrium- [Liu et al., 2003], Zervix- [Liu et al., 2001] oder Ovarialkarzinom [Liu et al., 2000] erkrankt sind. Für das Ovarialkarzinom konnten diese Daten hier mit Hilfe des KM-Plotters an größeren Fallzahlen bestätigt werden (sh. Kapitel 4.8, S 84/85).

In vielen Studien konnte diese Rolle von KAI1 aufgezeigt werden, aber es bleibt weiter unklar, über welchen Mechanismus KAI1 diese Funktion ausübt. Eine Hypermethylierung des Promotors [Jackson et al., 2000], eine Genmutation [Dong et al., 1996] oder ein *Loss of Heterozygosity* der KAI1 Region [Tagawa K, 1999] spielen wahrscheinlich keine Rolle im Tumorgeschehen.

Ein Verlust von KAI1 während der Tumorprogression könnte durch Veränderungen in der Regulation der Transkription in den Tumorzellen bedingt sein. Die Expression von KAI1 kann durch Zytokine [Gellersen et al., 2007], Wachstumsfaktoren [Sigala S, 1999] und Medikamente [Mashimo et al., 2000] induziert werden. Eine Hypoxie kann die Expression von KAI1 induzieren, wie Kim et al erforscht haben. In ischämischen Geweben wurde eine erhöhte KAI1 Expression [Kim et al., 2010] festgestellt. Auch zwischen dem Expressionsniveau des Östrogenrezeptors und der KAI1 Konzentration in Mammakarzinomgeweben konnte ein Zusammenhang gesehen werden [Christgen et al., 2008].

Zudem ist eine posttranslationale Regulation der KAI1 Expressionshöhe möglich [Tsai YC, 2011]. Ein weiterer regulatorischer Faktor ist das alternative Spleißen von Tumorsuppressorgenen.

Spleißisoform KAI1- Δ ex7

Durch alternatives Spleißen könnte die tumorsuppressive Wirkung von KAI1 verloren gehen. Der hier untersuchten KAI1 Isoform fehlt das Exon 7, was zu einer Veränderung an der COOH Region von KAI1 führt. Dieses Exon kodiert 28 Aminosäuren, die sich vom distalen Teil des zweiten extrazellulären Loop bis zum proximalen Teil der 4. transmembranösen Domäne erstrecken. Damit ist eine wichtige Region für die Interaktion mit potentiellen Bindungspartnern verändert. Für eine gestörte Funktion der Spleißisoform gibt es eine Reihe von Hinweisen in der Literatur: Laut Lee et al. ist die KAI1 Spleißvariante, welche als erstes im Magenkarzinom nachgewiesen [Lee et al., 2003] wurde, durch den Verlust des Exon 7 nicht in der Zellmembran lokalisiert und verliert so auch die Funktion, mit Integrinen (α 3 β 1-Integrin) auf der Zelloberfläche zu interagieren. Auch die für KAI1 typische Kolokalisation mit E-Cadherin, einem Adhäsionsprotein, zeigte KAI1- Δ ex7 nicht. Kolonkarzinomzellen, die KAI1- Δ ex7 exprimierten, zeigten eine gesteigerte Invasivität und Adhäsion an die

extrazelluläre Matrix verglichen mit Zellen, die KAI1 Wildtyp exprimierten. Ein deutliches Überwiegen von KAI1- Δ ex7 verglichen mit Wildtyp konnten Lee et al. in Lungen- und Lebermetastasen von Mäusen finden, die mit KAI1- Δ ex7 Zellen geimpft worden waren. Die hemmende Wirkung von KAI1 auf die Adhäsion an Fibronektin Oberflächen und auf die Zellmigration und Metastasierung, vermindert sich damit. Die COOH Region, die von der Veränderung betroffen ist, könnte so wahrscheinlich eine Rolle bei der Zellmotilität [Lee et al., 2003] spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass KAI1- Δ ex7 auch im Ovarialkarzinom exprimiert wird. Ein aus einem entsprechendem Gewebe präpariertes Insert wurde in einen Expressionsvektor kloniert und konnte für weitere zellbiologische Studien an Ovarialkarzinomzelllinien verwendet werden. Der kooperierenden Arbeitsgruppe von Fr. Prof. Reuning gelang es in der Folge nachzuweisen, dass die Assoziation der Spleißisoform von KAI1 mit α v-Integrinen im Vergleich zu Wildtyp-KAI1 gestört ist. Die Spleißisoform unterscheidet sich auch in Bezug auf die Lokalisation von der des Wildtyp-KAI1, wie auch schon von Lee et al berichtet. Upheber et al zeigten, dass die Wildtyp Form in der Zellmembran von Ovarialkarzinomzellen lokalisiert ist, während die Spleißform nicht auf der Zelloberfläche zu finden ist [Upheber et al., 2015]. Um zu sehen welchen Einfluss die Anwesenheit der Spleißisoform auf das Verhalten der Zellen hat, haben Upheber et al. die Proliferation der Wildtyp KAI1-Zellen mit KAI1- Δ ex7-Zellen verglichen. Sie konnten demonstrieren, dass nur Wildtyp KAI1 das Wachstum der Zellen supprimiert [Upheber et al., 2015]. Bei der Invasion von Zellen und somit der Metastasierung spielt die Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre-Matrix-Interaktion eine wichtige Rolle. KAI1 Wildtyp reduziert signifikant die α v β 3/Vitronectin abhängige Zellmigration. KAI1- Δ ex7-Zellen zeigten in vitro eine deutlich höhere Zellmotilität. Die Expression führte dabei zu einer größeren Steigerung der Zellmigration als der Verlust der KAI1 Wildtyp Expression [Upheber et al., 2015].

Der EGF-Rezeptor ist an der Zellproliferation der OV-MZ-6 Zellen beteiligt. Upheber et al. haben deshalb untersucht, ob Veränderungen der Zellmigration durch KAI1 auch durch eine Veränderung der EGF-Rezeptor Expression wiedergespiegelt werden. Sie konnten zeigen, dass KAI1-Wildtyp zu einem geringen Abfall der EGF-Rezeptor Expression führte, während die Spleißvariante des KAI1 zu einer signifikanten Steigerung führte [Upheber et al., 2015].

KAI1- Δ ex7 führte in Ovarialkarzinomzelllinien außerdem zu einer Steigerung der $\alpha\beta$ 3 Expression um bis zu 70%, während KAI1 Wildtyp keine Veränderung der $\alpha\beta$ 3 Expression verursacht [Upheber et al., 2015].

Die Ergebnisse von Upheber et al. wie auch die initialen Untersuchungen von Lee et al. legten nahe, dass die Anwesenheit der KAI1- Δ ex7 Spleißvariante einen ungünstigen Einfluss auf das Patientenüberleben haben könnte. So konnte in Metastasen des Ovarialkarzinoms im Omentum majus eine signifikant höhere Expression des KAI1- Δ ex7 im Vergleich zum Primärtumor nachgewiesen werden [Upheber et al., 2015]. Tatsächlich zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein kürzeres 5 Jahresüberleben bei Ovarialkarzinompatientinnen mit einer hohen Expression von KAI1- Δ ex7. Wenn also KAI1- Δ ex7 im Ovarialkarzinom in größeren Mengen exprimiert wird, könnte dies einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patientinnen haben. Die Expression von KAI1- Δ ex7 könnte somit ein Marker sein für Patientinnen mit einer schlechteren Prognose.

Ein Problem bei der Auswertung der Daten war mit Sicherheit die geringe Patientinnenzahl, so dass die vorliegenden Ergebnisse zunächst initiale Untersuchungen darstellen. Weitere Ovarialkarzinomgewebe werden momentan auf die Spleißvariante untersucht, um die statistische Aussagekraft der Daten zu erhöhen.

Die Gewebe, die hier untersucht wurden, beinhalten nicht nur Proben aus dem Primärtumor, sondern auch Proben aus dem Omentum majus. Durch den Funktionsverlust von KAI1 durch Verlust des Exon 7 wird die Bildung von Metastasen gesteigert und die Motilität der Zellen nimmt zu. Möglicherweise war dadurch die Rate an hoher KAI1 splice Expression überrepräsentiert, da ein großer Teil der Gewebe aus den Absiedlungen des Karzinoms untersucht wurde.

Die Quantifizierung erfolgte in dieser Arbeit mittels semiquantitativer PCR und ist diesbezüglich mit Fehlern behaftet. In einer anschließenden Arbeit wurde die Expression von KAI1 Wildtyp vs. Spleißvariante mittels spezifischen Taqman-Proben weiter untersucht, um eine genauere Quantifizierung zu ermöglichen.

KAI1 als Ansatz neuer Therapiemöglichkeiten

Ziel der Forschung ist es, neue Therapiemöglichkeiten für Patientinnen mit Karzinomen zu entwickeln, um die Prognose der Tumorerkrankungen zu verbessern. Ein momentaner Forschungsansatz ist die Gentherapie. KITTENIN (KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin) interagiert mit der COOH Region von KAI1. Eine KITTENIN Überexpression führte in Vt-26 Kolonzellen von Mäusen zu einer frühen hepatischen Metastasierung und einer gesteigerten Invasivität in vitro. Durch i.v. Gabe von siRNA (small interfering RNA) gegen KITTENIN konnte die Progression und Metastasierung unterdrückt werden [Lee et al., 2011b]. Die Therapie mit siRNA könnte so einen möglichen neuen Therapieansatz darstellen.

In einer Studie von Xu et al. wurde Mäusen subkutan in die Leiste Pankreaskarzinomzellen injiziert, die dort einen Tumor bildeten. Nach 10 Tagen wurde den Mäusen KAI1 direkt in den Tumor gespritzt. Beim Vergleich der Tumorgöße und der pulmonalen Metastasen der Mäuse, denen KAI1 injiziert wurde mit denen der Kontrollgruppe, zeigte sich ein signifikant niedrigeres Tumolvolumen und weniger Lungenmetastasen [Xu et al., 2008].

Auch beim Bronchialkarzinom gibt es ähnliche Studien. Takeda et al. haben Adenoviren, die die KAI1 cDNA kodieren, in Lungenkarzinomzellen transferiert. Zunächst wurden Bronchialkarzinomzellen direkt in die Lungen der Mäuse injiziert um Primärtumore zu erzeugen. Nach intratrachealer Gabe der Adenoviren, die als Vektoren dienten, zeigte sich zwar keine signifikante Verkleinerung des Primärtumors, aber eine deutliche Verkleinerung der mediastinalen Lymphknotenmetastasen, verglichen mit der Kontrollgruppe [Takeda et al., 2007].

Eine Re-Induktion eines Metastasierungssuppressors wie KAI1 wäre ebenfalls eine mögliche therapeutische Option. Smith und Theodorescu haben 2009 mögliche therapeutische Aspekte, den Metastasierungssuppressor KAI1 betreffend, zusammengefasst [Smith and Theodorescu, 2009]: Es konnte gezeigt werden, dass p53 die Transkription von KAI1 steigert [Smith and Theodorescu, 2009]. Mashimo et al. haben den Einfluss von Etoposid, welches p53 aktiviert, auf die KAI1 Expression untersucht und festgestellt, dass es zu einer Induzierung der KAI1 Expression führt [Mashimo et al., 2000]. Etoposid wird als Chemotherapeutikum zum Beispiel beim Bronchialkarzinom oder dem M. Hodkin verwendet [Karow T., 2012]. Wu et al.

therapierten Mäuse, denen sie Magenkarzinomzellen in die Milz injiziert hatten, anschließend mit Etoposid und beobachteten eine geringere Zahl an hepatischen Metastasen, und gesteigerte KAI1-Expression in den Milztumoren [Wu et al., 2003]. Die Frage, ob die beobachteten Effekte von Etoposid auf die Metastasenbildung durch eine Expressionsveränderung von KAI1 bedingt sind, lässt sich nicht sicher beantworten. Etoposid zeigt vielfältige Effekte und führt zu einer Induktion von p53, so dass es fraglich ist, ob die Induktion der KAI1-Expression eine entscheidende Rolle spielt.

Mit Hilfe von Genistein gelang es El Touny und Banerjee, die Expression von KAI1 im Prostatakarzinom Mausmodell zu steigern. Genistein ist ein Phytoöstrogen, das in Rotklee und der Sojabohne vorkommt. In den Mäusen, die ein Genisteinhaltige Diät erhielten, konnte eine dosis abhängige Steigerung der KAI1 mRNA und des KAI1 Proteins gezeigt werden. In vitro konnte eine geminderte Invasivität der Tramp-C2 Zellen (Prostatakarzinomzellen) nach Genistein Exposition erreicht werden. Auf welche Weise Genistein diesen Effekt am KAI1 Gen erreicht ist noch unklar und auch ob Genistein einen wirklichen Nutzen für die Patienten mit sich bringt [El Touny and Banerjee, 2007].

Beim Mammakarzinom konnte ein unterschiedliches Expressionsniveau von KAI1 beim östrogenrezeptorpositiven, verglichen mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom, festgestellt werden. Östrogenrezeptornegative Karzinome zeigten eine hohe Expression des Metastasierungssuppressors KAI1. Auch in den Metastasen von östrogenrezeptornegativen Karzinomen zeigte sich eine hohe KAI1 Expression. Es konnte somit von Christgen et al. gezeigt werden, dass die KAI1 Expression bei der Bildung von Metastasen, und somit dem Progress des Karzinoms bei östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen beibehalten wird [Christgen et al., 2009]. Die Exposition von Fulvestrant, einem Östrogenrezeptorantagonist, bewirkte hingegen bei östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen eine signifikante Steigerung von KAI1, sowie eine Hemmung der Zellproliferation und Migration. Es konnte im Rahmen der Studie von Christgen et al. gezeigt werden, dass KAI1 ein Ziel für Östrogen-vermittelte-Gen-Repression ist. Möglicherweise lässt sich also die Expression von KAI1 beim östrogenpositiven Mammakarzinom mit Hilfe von Östrogenrezeptorantagonisten wieder induzieren [Christgen et al., 2008]. Die Funktion von KAI1 als Metastasierungssuppressor könnte dann wieder zum Tragen kommen und die Prognose der Patientinnen evtl. verbessert werden.

6. Ausblick

KAI1- Δ ex7, eine Spleißvariante des Metastasierungssuppressors KAI1, konnte in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für eine Metastasierung, und auch dem Progress der Tumorerkrankung beim Magen- und Kolonkarzinom gebracht werden. Auch für das Ovarialkarzinom könnte die Expression von KAI1- Δ ex7 von klinischer Bedeutung sein, wie in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurde. Die genauen Interaktionen, vor allem mit Integrinen der verschiedenen Untergruppen, müssen noch genauer untersucht werden, um mögliche neue Therapieansätze des Ovarialkarzinoms zu erforschen.

Da wir unsere Daten bisher nur an einem relativ kleinen Patientenkollektiv von 42 Patientinnen erheben konnten, ist es nötig weitere Ovarialkarzinomgewebe zu untersuchen, um die prognostische Bedeutung der Spleißvariante des KAI1 weiter zu bestätigen.

Ein weiterer wichtiger, und weiter zu untersuchender Aspekt wird sein, ob es noch andere Aberrationen gibt, die zu einem Funktionsverlust des KAI1 als Tumorsuppressor führen. Die Deletion des Exon 7, wie beim KAI1- Δ ex7, das wir hier untersucht haben, ist neben der Spleißvariante mit einem zusätzliche Intron wie beim Mammakarzinom beschrieben, die bisher einzige bekannte Variante.

In der Therapie von Tumorerkrankungen stehen zum heutigen Zeitpunkt verschiedene, zum Teil sehr radikale Therapieoptionen zur Verfügung, die oftmals eine starke Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patientinnen zur Konsequenz haben. Ein wichtiges Ziel der Forschung in der Tumorbilogie sollte es sein, Patientinnen mit guter bzw. schlechter Prognose zu identifizieren, um so eine individuelle Therapieoption für jede einzelne Patientin zu haben. Patientinnen könnten so abgestimmt auf ihr eigenes Risikoprofil, was Metastasierung, rezidivfreies Überleben, aber auch den Tod betrifft, therapiert werden. Bereits Hippokrates hatte die Idee einer personalisierten Medizin: „Es ist wichtiger zu wissen, welche Art von Person eine Krankheit hat, als zu wissen, welche Art von Krankheit eine Person hat“ [Hahnen Eric, 2018].

Dies ist ein großes Thema in der Forschung aller Karzinomentitäten. Im MD Anderson Cancer Center in Texas, einem renommierten Krebszentrum, werden die Gewebeproben der rekrutierten Patienten auf genetische Veränderungen untersucht,

bei denen man eine Bedeutung für das Karzinomwachstum annimmt. Durch eine anschließende, spezifische Therapie konnte sowohl die Ansprechrate als auch die Überlebenszeit verlängert werden im Vergleich zu den Patienten, die eine nicht spezifische Therapie erhalten haben [Deutsches Ärzteblatt, 2011]. Ziel ist es, die Patienten in klinisch relevante Subgruppen zu unterteilen, die sich nach Variationen auf der DNA-, RNA-, Protein- oder der Stoffwechselebene ergeben. Beim Mammakarzinom ist dies bereits der Fall. Patientinnen werden je nach Hormon- und Her2neu Status des Karzinomgewebes in unterschiedliche Therapiegruppen eingeteilt. Durch neue diagnostische Möglichkeiten (Oncotype, uPA und PAI1) wird es beim Mammakarzinom ermöglicht, Patientinnen eine belastende Chemotherapie zu ersparen, wenn Sie davon voraussichtlich keinen Nutzen erzielen können.

Ziel der weiteren Forschung sollte es sein, auch Patientinnen, die an anderen Tumorentitäten wie z.B. dem Ovarialkarzinom erkrankt sind, eine solche auf sie persönlich abgestimmte Therapie zu ermöglichen. Dadurch kann der Patientin eine möglicherweise belastende aber nicht Erfolg bringende Therapie erspart werden.

7. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist der fünfthäufigste (3,3%, nach Brustkrebs, Darmkrebs, Bronchialkarzinom und dem Korpuskarzinom) maligne Tumor der Frau [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]. Der wichtigste Prognosefaktor für das Ovarialkarzinom ist der nach einer Operation in situ gebliebene Tumorrest. Somit sind die Früherkennung und frühzeitige Therapie des Karzinoms von großer Bedeutung für die erkrankten Frauen. Um Risikofamilien für das Ovarialkarzinom zu detektieren ist es heute möglich, Genmutationen in Risikogenen zu bestimmen, damit die betroffenen Frauen eine frühzeitige Therapie erhalten können. Die meisten Ovarialkarzinome weisen jedoch keine bekannte Risikomutation in der Keimbahn auf, so dass Zielstrukturen im Tumorgewebe für eine effektive Therapiestrategie zu erforschen sind.

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines Karzinoms spielen Tumorsuppressorgene. KAI1 (CD82, C33 oder Kangai), als Mitglied der Gruppe der Tetraspanine, spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und wird den Tumorsuppressorgenen zugeordnet. Bei einigen Tumorentitäten wie dem Prostatakarzinom konnte KAI1 als Metastasierungssuppressorgen entdeckt werden. Eine Spleißvariante von KAI1 (KAI1- Δ ex7), bei der das Exon 7 fehlt, wurde erstmals beim Magenkarzinom entdeckt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Spleißvariante KAI1- Δ ex7 auch im Ovarialkarzinom nachgewiesen werden. Eine relative Quantifizierung der im jeweiligen Gewebe enthaltenen Spleißvariante im Vergleich zu Wildtyp KAI1 gelang mit Hilfe der DHPLC Analyse.

Die Korrelation mit den Überlebenszeiten der Patientinnen lässt darauf schließen, dass durch die Expression der Spleißisoform die Funktion von KAI1 als Metastasierungssuppressorgen verloren geht und so die Tumorzellen in ihrer Migration nicht, wie im Falle der Wildtypform, gehemmt werden. So zeigte sich bei den Patientinnen mit einer hohen Expression der Spleißvariante ein Nachteil in Bezug auf das Überleben nach Diagnosestellung.

In dieser Arbeit wurde nur eine relativ kleine Gruppe von Patientinnen auf das Vorliegen der Spleißvariante und den Einfluss auf die Überlebenszeiten untersucht.

Sicher ist es nötig, die hier gewonnenen Ergebnisse an einem größeren Patientenkollektiv zu verifizieren.

8. Literaturverzeichnis

A.Meindl EHNA (2014) Genetik des familiären Brust- und Eierstockkrebses. *Gynäkologe* **47**: 735-740

Abe M, Sugiura T, Takahashi M, Ishii K, Shimoda M, Shirasuna K (2008) A novel function of CD82/KAI-1 on E-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Lett* **266**: 163-170

Adachi M, Taki T, Ieki Y, Huang CL, Higashiyama M, Miyake M (1996) Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **56**: 1751-1755

Alfons Meindl NDKKKRRKS (2011) Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom. *Deutsches Ärzteblatt* **108**: 323-330

Anastasi E MGVVGGFLRMG (2010) HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol* **31**: 113-119

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* **72**: 1-22

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjakoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* **72**: 1117-1130

Astra Zeneca GmbH (2018) Lynparza für die Erhaltungstherapie des Platin-sensiblen Ovarialkarzinomrezidivs. *Frauenarzt* **59**: 584

Barbara Schmalfeldt PW (2018) Personalisierte Therapie des Ovarialkarzinoms. *Frauenarzt* **59**: 286-294

Bass Rosemary, Finn Werner, Elena Odintsova, Tsuyoshi Sugiura, Fedor Berditchevski, Vincent Ellis (2005) Regulation of Urokinase Receptor Proteolytic Function by the Tetraspanin CD82 3537. *Journal of biological chemistry* **280**: 14811-14818

Bevan P, Mala C (2008) The Role of uPA and uPA Inhibitors in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* **3**: 1-2

Bouras T FA (1999) Expression of the prostate cancer metastasis suppressor gene KAI1 in primary prostate cancers: a biphasic relationship with tumour grade. *J Pathol* **188**: 382-388

Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ (2002) Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* **20**: 1248-1259

Burger RA SMMBea (2007) Phase II Trial of Bevacizumab in Persistent or Recurrent Epithelial Ovarian Cancer or Primary Peritoneal Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study
3532. *J Clin Oncol* **25**: 5165-5171

Christgen M, Bruchhardt H, Ballmaier M, Krech T, Langer F, Kreipe H, Lehmann U (2008) KAI1/CD82 is a novel target of estrogen receptor-mediated gene repression and downregulated in primary human breast cancer. *Int J Cancer* **123**: 2239-2246

Christgen M, Christgen H, Heil C, Krech T, Langer F, Kreipe H, Lehmann U (2009) Expression of KAI1/CD82 in distant metastases from estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Sci* **100**: 1767-1771

Crawford SM, Peace J (2005) Does the nadir CA125 concentration predict a long-term outcome after chemotherapy for carcinoma of the ovary? *Ann Oncol* **16**: 47-50

Daniel Böhm DD (2012) Adjuvante Chemotherapie bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom. *Frauenarzt* **53**: 1180-1184

Denijn M, Ruiter DJ (1993) The possible role of angiogenesis in the metastatic potential of human melanoma. Clinicopathological aspects. *Melanoma Res* **3**: 5-14

Deutsches Ärzteblatt. Fortschritt oder falsches Versprechen? Internet Spetember 2011, Heft 37, S. 1622-2626. 2011.
Ref Type: Electronic Citation

Dong JT, Isaacs WB, Isaacs JT (1997) Molecular advances in prostate cancer. *Curr Opin Oncol* **9**: 101-107

Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC (1995) KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* **268**: 884-886

Dong JT, Suzuki H, Pin SS, Bova GS, Schalken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT (1996) Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res* **56**: 4387-4390

Duffy MJ (1996) Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res* **2**: 613-618

Edgell T, Martin-Roussety G, Barker G, Autelitano DJ, Allen D, Grant P, Rice GE (2010) Phase II biomarker trial of a multimarker diagnostic for ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**: 1079-1088

El Touny LH, Banerjee PP (2007) Genistein induces the metastasis suppressor kangai-1 which mediates its anti-invasive effects in TRAMP cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **361**: 169-175

Felding-Habermann B (2003) Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* **20**: 203-213

Frueh FW, Noyer-Weidner M (2003) The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med* **41**: 452-461

Gadducci A, Cosio S, Fanucchi A, Negri S, Cristofani R, Genazzani AR (2004) The predictive and prognostic value of serum CA 125 half-life during paclitaxel/platinum-based chemotherapy in patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* **93**: 131-136

Gellersen B, Briese J, Oberndorfer M, Redlin K, Samalecos A, Richter DU, Loning T, Schulte HM, Bamberger AM (2007) Expression of the metastasis suppressor KAI1 in decidual cells at the human maternal-fetal interface: Regulation and functional implications. *Am J Pathol* **170**: 126-139

Grundmann (2004) *Allgemeine Pathologie*. München

Guo X, Friess H, Graber HU, Kashiwagi M, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW (1996) KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res* **56**: 4876-4880

Gyorffy B LASZ (2012) Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. *Endocr Relat Cancer* **19**: 197-208

Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z (2010) An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* **123**: 725-731

Hagemann, Olav. Laborlexikon (ISSN 1860-966X): CA 125. Internet . 20-1-2021. 21-6-2021.

Ref Type: Electronic Citation

Hahnen Eric KRRS (2018) Personalisierte Medizin in der Gynäko-Onkologie; Fortschritte bedingen neue Herausforderungen. *Deutsches Ärzteblatt* **115**: 248-251

Hapke S, Kessler H, Luber B, Benge A, Hutzler P, Hofler H, Schmitt M, Reuning U (2003) Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem* **384**: 1073-1083

Harter P. (2019) DUO-O: A randomized phase III trial of durvalumab (durva) in combination with chemotherapy and bevacizumab (bev), followed by maintenance durva, bev and olaparib (olap), in newly diagnosed advanced ovarian cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* **37**: 5598

Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, Takami K, Adachi M, Taki T, Ishiguro S, Nakamori S, Yoshie O, Miyake M (1998) KAI1/CD82 expression in nonsmall cell lung carcinoma is a novel, favorable prognostic factor: an immunohistochemical analysis. *Cancer* **83**: 466-474

Hoffman AG, Burghardt RC, Tilley R, Auersperg N (1993) An in vitro model of ovarian epithelial carcinogenesis: changes in cell-cell communication and adhesion occurring during neoplastic progression. *Int J Cancer* **54**: 828-838

Horowitz NS et al. Tumorausdehnung bleibt trotz R0 Resektion relevant. Deutsches Ärzteblatt 19, 735. 2015.
Ref Type: Electronic Citation

Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M (1998) Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol* **153**: 973-983

Huber CG, Oefner PJ, Preuss E, Bonn GK (1993) High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Res* **21**: 1061-1066

I.Meinhold-Heerlein, F.Zeppernick, A.Strauss, N.Maass, S.Hauptman (2011) Die Heterogenität des Ovarialkarzinoms. *Gynäkologe* **44**: 708-716

Iizumi M BSWK (2007) Interaction of Duffy antigen receptor for chemokines and KAI1: a critical step in metastasis suppression. *Cancer Res* **67**: 1411-1414

Invitrogen. pcDNA3.1/Hygro 5.6 kb, Invitrogen. Internet . 2011. 19-1-2011.
Ref Type: Electronic Citation

Invitrogen. pcDNA3.1 Hygro Polylinker. Internet . 2012. 19-1-2011.
Ref Type: Electronic Citation

Jackson Paul, Alexandra Marreiros Pamela J. Russell. KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 530-534. 2011.
Ref Type: Electronic Citation

Jackson P, Millar D, Kingsley E, Yardley G, Ow K, Clark S, Russell PJ (2000) Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett* **157**: 169-176

Jackson P, Rowe A, Grimm MO (2007) An alternatively spliced KAI1 mRNA is expressed at low levels in human bladder cancers and bladder cancer cell lines and is not associated with invasive behaviour. *Oncol Rep* **18**: 1357-1363

Jee B, Jin K, Hahn JH, Song HG, Lee H (2003) Metastasis-suppressor KAI1/CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through Src-dependent pathway. *Exp Mol Med* **35**: 30-37

K.Goerke JSAV (2008) *Klinikleitfaden Gynäkologie und Geburtshilfe*. Urban & Fischer, Elsevier GmbH: München

Karow T. L-RR (2012) *Pharmakologie und Toxikologie*. Pfuheim

Kiechle (2007) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Urban & Fischer, Elsevier GmbH: München

Kim B, Boo K, Lee JS, Kim KI, Kim WH, Cho HJ, Park YB, Kim HS, Baek SH (2010) Identification of the KAI1 metastasis suppressor gene as a hypoxia target gene. *Biochem Biophys Res Commun* **393**: 179-184

Koczorek Michael (2012) Angiogenesehemmung Bevacizumab bei Ovarialkarzinom zugelassen. *Arzneimitteltherapie* **30**:

Lee HA, Park I, Byun HJ, Jeoung D, Kim YM, Lee H (2011a) Metastasis suppressor KAI1/CD82 attenuates the matrix adhesion of human prostate cancer cells by suppressing fibronectin expression and beta1 integrin activation. *Cell Physiol Biochem* **27**: 575-586

Lee JH, Seo YW, Park SR, Kim YJ, Kim KK (2003) Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res* **63**: 7247-7255

Lee JK, Lee DH, Sun EG, Bae JA, Lim SC, Min JJ, Sung MW, Kim KK (2011b) Gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma using KAITENIN (KAI1 COOH-Terminal Interacting Tetraspanin)-antisense therapy. *Yonsei Med J* **52**: 463-468

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 3.0, 2019. AWMF. 2020. Internet . 1-3-2020. 1-5-2021. Ref Type: Electronic Citation

Liu FS, Chen JT, Dong JT, Hsieh YT, Lin AJ, Ho ES, Hung MJ, Lu CH (2001) KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol* **159**: 1629-1634

Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ (2000) Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* **78**: 10-15

Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ, Lu CH, Chiou LC (2003) KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer. *Clin Cancer Res* **9**: 1393-1398

Liu WM, Zhang XA (2006) KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett* **240**: 183-194

M.Mackelenbergh NMWJFH (2015) Ovarialkarzinom und Präkanzerosen. *Gynäkologe* 415-421

- Mashimo T, Bandyopadhyay S, Goodarzi G, Watabe M, Pai SK, Gross SC, Watabe K (2000) Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 370-376
- Maurer CA, Graber HU, Friess H, Beyermann B, Willi D, Netzer P, Zimmermann A, Buchler MW (1999) Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery* **126**: 869-880
- Mayr D, Diebold J (2000) Grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* **19**: 348-353
- Mooez S MFKMRRZAKA (2011) Expressional alterations and transcript isoforms of metastasis suppressor genes (KAI1 and KiSS1) in breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* **12**: 2785-2791
- MSD Sharp & Dohme GmbH (2013) Folatrezeptoren als Angriffspunkt für eine gezielte Therapie nutzen. *Der Gynäkologe* **46**: News & Views
- Mullis K FFSSSRHGEH (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273
- Munstedt K, Kovacic M, Zygmunt M, von GR (2003) Impact of hemoglobin levels before and during chemotherapy on survival of patients with ovarian cancer. *Int J Oncol* **23**: 837-843
- Nagira M, Imai T, Ishikawa I, Uwabe KI, Yoshie O (1994) Mouse homologue of C33 antigen (CD82), a member of the transmembrane 4 superfamily: complementary DNA, genomic structure, and expression. *Cell Immunol* **157**: 144-157
- Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F (2000) Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol* **10**: 1009-1012
- Odintsova E, Voortman J, Gilbert E, Berditchevski F (2003) Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J Cell Sci* **116**: 4557-4566
- Oefner PJ, Huber CG (2002) A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **782**: 27-55
- Ow K, Delprado W, Fisher R, Barrett J, Yu Y, Jackson P, Russell PJ (2000) Relationship between expression of the KAI1 metastasis suppressor and other markers of advanced bladder cancer. *J Pathol* **191**: 39-47
- Oza AM, et al (2015) Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* **16**: 928. –936
- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1996) Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* **46**: 5-27

Pedersen M WMMKNMBTPLHHKMBGLSNTAPHTMÖNBDMSI (2018) Adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic ovarian cancer: a pilot study. *Oncoimmunology* **7**:

Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, du BA, Sehouli J, Kimmig R, Stahle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Leminen A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MK, Oza AM (2011) A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer

1. *N Engl J Med* **365**: 2484-2496

Prof.Dr.Barbara Schmalfeldt (2007) *Tumor Manual Ovarialkarzinom*. Zuckschwerdt Verlag München:

R.K.Schmutzler SS (2014) Systemtherapie bei BRCA1- und BRCA2-positiven Mamma- und Ovarialkarzinomen. *Gynäkologe* **47**: 769-772

Rafnar et al (2011) Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat Genetics* **43**: 1104-1107

Ray JM, Stetler-Stevenson WG (1994) The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* **7**: 2062-2072

Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland: Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom). Internet . 30-3-2021. 22-7-2021.

Ref Type: Electronic Citation

Ruseva Z, Geiger PX, Hutzler P, Kotzsch M, Lubert B, Schmitt M, Gross E, Reuning U (2009) Tumor suppressor KAI1 affects integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. *Exp Cell Res* **315**: 1759-1771

S.Mahner, A. du Bois J. Sehouli W. Meier C. Kurzeder U. Wagner J. Pfisterer. Bevacizumab in der Primärtherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms. AGO . 2-9-2010. 6-7-2021.

Ref Type: Electronic Citation

Sanford J.Shattil CK&MHG (2010) The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 288-300

Sandra S.Buys M, Edward Partridge M, Amanda Black PM, et al (2011) Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality
The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA* **305**: 2295-2303

Schoenfeld N, Bauer MK, Grimm S (2004) The metastasis suppressor gene C33/CD82/KAI1 induces apoptosis through reactive oxygen intermediates. *FASEB J* **18**: 158-160

Sigala S FIBDP-PMMCBESP (1999) Suppression of telomerase, reexpression of KAI1, and abrogation of tumorigenicity by nerve growth factor in prostate cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **5**: 1211-1218

Smith SC, Theodorescu D (2009) Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. *Nat Rev Cancer* **9**: 253-264

Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* **267**: 2524-2529

Sun CC RPBDC (2007) Quality of life for patients with epithelial ovarian cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **4**: 18-29

Tagawa K AKTYHEYMIK (1999) Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* **90**: 970-976

Takaoka A HYSSAYIFAMIK (1998) Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene* **16**: 1443-1453

Takaoka A, Hinoda Y, Sato S, Itoh F, Adachi M, Hareyama M, Imai K (1998) Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn J Cancer Res* **89**: 397-404

Takeda T, Hattori N, Tokuhara T, Nishimura Y, Yokoyama M, Miyake M (2007) Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer Res* **67**: 1744-1749

TESARO Bio Germany GmbH (2018) PARP-Inhibition für alle rezidierten Paltin-sensitiven Ovarialkarzinome. *Frauenarzt* **59**: 1-4

Tonoli H, Barrett JC (2005) CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends Mol Med* **11**: 563-570

Transgenomic. Transgenomic Wave System. Internet . 2010. 26-1-2010.
Ref Type: Electronic Citation

Tsai YC MAMJZMKZCBVTHSHLKCWA (2007) The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat Med* **13**: 1504-1509

Tsai YC WA (2011) Dissecting the diverse functions of the metastasis suppressor CD82/KAI1. *FEBS Lett* **585**: 3166-3173

Tumorregister München. ICD-10 C56: Ovarialtumor - Inzidenz und Mortalität. Internet . 25-1-2021. 21-6-2021.
Ref Type: Electronic Citation

Upheber S, Karle A, Miller J, Schlaugk S, Gross E, Reuning U (2015) Alternative splicing of KAI1 abrogates its tumor-suppressive effects on integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer biology. *Cell Signal* **27**: 652-662

Vincze TPJaRRJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **31**: 3688-3691

Winter-Roach B, Hooper L, Kitchener H (2003) Systematic review of adjuvant therapy for early stage (epithelial) ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **13**: 395-404

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA (1997) General mechanisms of metastasis. *Cancer* **80**: 1529-1537

Wu Q, Ji Y, Zhang MQ, Chen YQ, Chen F, Shi DL, Zheng ZH, Huang YJ, Su WJ (2003) Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in digestive tract carcinomas and cancer cells. *Cell Tissue Res* **314**: 237-249

Xu JH, Guo XZ, Ren LN, Shao LC, Liu MP (2008) KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* **14**: 1126-1132

Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME (2001) Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res* **61**: 5284-5288

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	medianes Überleben in Abhängigkeit von der Tumorreduktion ($p < 0,001$) modifiziert nach [Bristow et al., 2002],[Prof.Dr.Barbara Schmalfeldt, 2007]	9
Abb. 2	Nebenwirkungen der first line Chemotherapie beim Ovarialkarzinom im Vergleich zu Carboplatin (modifiziert nach [Sun CC, 2007])	10
Abb. 3	Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten in Deutschland 1999-2019, Prognose (Inzidenz) bis 2020; Fälle pro 100.000 [Robert Koch Institut, 2021]	15
Abb. 4	KAI1 als Tetraspanin (modifiziert nach [Jackson Paul, 2011])	19
Abb. 5	KAI1 (CD82) Einfluss auf Zellmotilität, Invasion, Adhäsion [Tonoli and Barrett, 2005]	21
Abb. 6	Genomische Organisation KAI1, Exon 7 fehlt bei Spleißisoform von KAI1, Exons ■ , Introns ■ [Lee et al., 2003]	25
Abb.7	Schematische Darstellung des KAI1 Proteins, Wildtyp KAI1 hat 2 extrazelluläre Loops, 2 intrazelluläre Strecken und 4 T Transmembrandomänen. KAI1- Δ ex7 fehlen 28 Aminosäuren (215-242 aa) [Lee et al., 2003]	26
Abb.8	Effekt von Wildtyp KAI1 und Spliced KAI1 Expression auf die Tumorprogression in vivo. Pro Gruppe waren 10 Mäuse mit den jeweiligen Zellen behandelt worden. Das Tumolvolumen wurde jeden Tag gemessen, bis 5 Wochen nach der Injektion [Lee et al., 2003].	26
Abb.9	Steigerung Zyklenzahl der PCR mit HPRT Primern zur Ermittlung des Sättigungsbereiches. Bei 40 Zyklen ist noch keine Sättigung erreicht	38
Abb.10	Schnittstellen des Restriktionsenzymes Pst1 in KAI1 „full length“ und KAI1- Δ ex7, modifiziert nach Biolabs NEBcutter [Vincze, 2003]	44
Abb.11	pcDNA3.1/Hygro Vector mit den markierten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und Xba (modifiziert nach Invitrogen [Invitrogen, 2011])	48
Abb.12	Schematische Darstellung der Mutation KAI1 und der entsprechend entwickelten Primer zur Elimination der Mutation	55
Abb.13	Plasmid pcDNA3.1.Hygro; Zwischen den Schnittstellen Hind III und Xba I wurde Kai1 „full length“ bzw. Δ ex7 eingebaut [Invitrogen, 2012]	58

Abb.14	Schematische Darstellung der 4 möglichen Doppelstränge [Transgenomic, 2010]	63
Abb.15	Anlagerung der DNA über negativ Phosphatgruppen an die DNASep Säule mit Hilfe der Triethylammonium Ionen (TEAA) [Transgenomic, 2010]	64
Abb.16	Darstellung der Hetero- und Homoduplices mittels Chromatogram [Transgenomic, 2010]	65
Abb.17	Abhängigkeit der molekularen Größe doppelsträngiger DNA unter denaturierenden und nicht denaturierenden Konditionen [Oefner and Huber, 2002]	66
Abb.18	ROC Kurve zur Berechnung des Cut-Off Wertes	67
Abb.19	Darstellung des KAI1 Wildtyp (255bp) und der Speißvariante (171bp) mittels Gelelektrophorese nach Durchführung der 2. PCR mit „KAI1 spliced“ Primern	68
Abb.20	Relative Expression von KAI1- Δ ex7 (nach 2. PCR) im Vergleich zu HPRT als Housekeeper, P: Primärtumor, M: Metastase	69
Abb.21	Schematische Darstellung der möglichen Doppelstränge nach Denaturierung[Transgenomic, 2010]	70
Abb.22	Darstellung der Homo-und Heteroduplices mittels HPLC	70
Abb.23	Gewebe #29072, #29271 nach Pst1 Verdau mit den Banden bei KAI1- Δ ex7 (406bp, 311bp) und KAI1 „full length“ (406bp, 264bp, 131bp)	74
Abb.24	Schnittstellen des Plasmids pcDNA3.1/Hygro mit KAI1- Δ ex7 oder „full length“ mit dem Restriktionsenzym Pst1	76
Abb.25	Gelelektrophorese des Klon 12, der die Spleißvariante enthält (4459bp und 1721bp), bearbeitet	76
Abb.26	Klon 12 nach BamH1/Xba-Verdau, Fragmente von 619bp und 5681bp nachweisbar, bearbeitet	77
Abb.27	Insert Klon 6 und 12 nach Amplifikation mit T7 und BGH Primern, bearbeitet	78
Abb.28	Es zeigt sich eine Kolokalisation von α v-Integrin mit KAI1 Wildtyp, sichtbar an der gelben Färbung der Überlappungen. Bei KAI1- Δ ex7 zeigt sich keine sichtbare Kolokalisation mit α v [Upheber et al., 2015]	82

Abb.29	Einfluss der KAI1 Expression auf das Gesamtüberleben (p=0.0013, n=1581, cut off Wert 451), modifiziert nach [Gyorffy B, 2012]	84
Abb.30	Einfluss der KAI1 Expression auf das progressionsfreie Überleben (p=0.00032, n=1306, cut Off Wert 403), modifiziert nach [Gyorffy B, 2012]	85
Abb.31	Einfluss des Expressionsniveaus von KAI1-Δex7 auf das Gesamtüberleben in Monaten, n=34, p=0,059, cut off Wert 41%. 5-Jahres Überleben bei hoher vs. niedriger Expression: 37+/-13,8% vs. 66+/-11,3%	86
Abb.32	Einfluss des Expressionniveaus von KAI1-Δex7 auf das rezidivfreie Überleben in Monaten, p=0,185, cut off Wert 41%	87
Abb.33	Einfluss des Expressionsniveaus von KAI1-Δex7 auf das Gesamtüberleben in Monaten unter Berücksichtigung lediglich der Netztumoren, p=0,128, cut off Wert 41%	88
Abb.34	Einfluss des Expressionsniveaus von KAI1-Δex7 auf das Gesamtüberleben in Monaten unter Berücksichtigung lediglich der serösen Gewebe, p=0,55, cut off Wert 41%	89
Abb.35	Einfluss von KAI1 auf das Gesamtüberleben beim Mammakarzinom, n=2978, p=0,041, cut off 342, modifiziert nach [Gyorffy et al., 2010]	90
Abb.36	Einfluss von KAI1 auf das rezidivfreie Überleben beim Mammakarzinom, n=2978, p=1,9e-0,6, cut off 349, modifiziert nach [Gyorffy et al., 2010]	91
Abb. 37	Einfluss von KAI1 auf den Zeitraum bis zum Auftreten von Fernmetastasen beim Mammakarzinom, n=2978, p=0,0057, modifiziert nach [Gyorffy et al., 2010]	92
Abb.38	Durch Hind/Xba-Verdau wurde der Einbau des Plasmids bestätigt (bearbeitet)	103

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM und FIGO Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms, Teil 1 [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]	7
Tabelle 2	TNM und FIGO Klassifikation der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms, Teil 2 [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]	8
Tabelle 3	Nebenwirkungen der Chemotherapeutika (modifiziert nach [Karow T., 2012])	14
Tabelle 4	Übersicht über die verwendeten Gewebe mit Lokalisation und Subtyp	31
Tabelle 5:	Übersicht klinische Daten der Patientinnen	33
Tabelle 6	Übersicht des RNA Gehaltes der Proben nach Nanodrop Messung	61
Tabelle 7:	Anteil der Spleißvariante KAI1 Δ ex7 im Vergleich zu der Gesamtexpression von KAI1 in den Gewebeproben (gemessen mit Hilfe der Wavemaker Software) unter Angabe der Lokalisation der Gewebeprobe, x: keine Messung möglich, Teil 1	72
Tabelle 8:	Anteil der Spleißvariante KAI1 Δ ex7 im Vergleich zu der Gesamtexpression von KAI1 in den Gewebeproben (gemessen mit Hilfe der Wavemaker Software) unter Angabe der Lokalisation der Gewebeprobe, x: keine Messung möglich, Teil 2	73
Tabelle 9:	WHO Klassifikation der Tumoren des Ovar, Tube und Peritoneum [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]	105

11. Anhang

11.1 Hind/Xba-Verdau

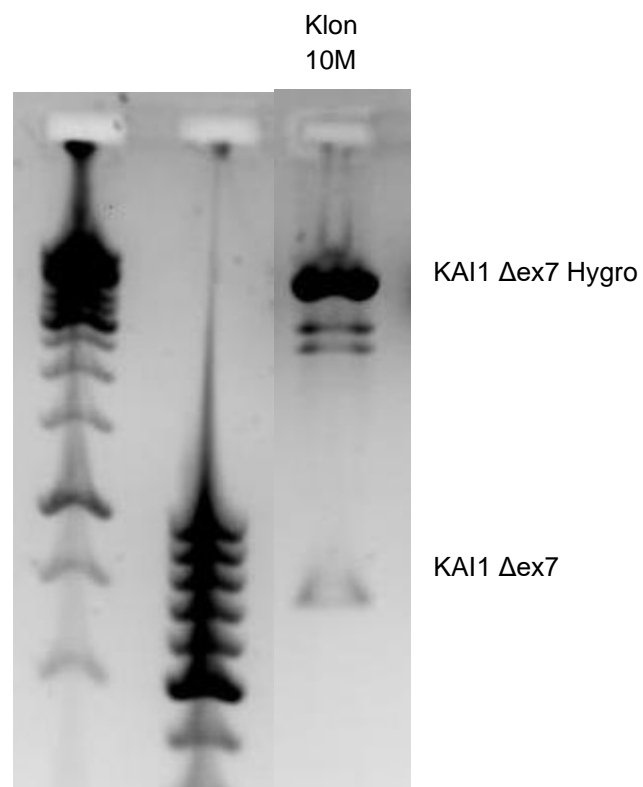


Abbildung 38: Durch Hind/Xba-Verdau wurde der Einbau des Plasmids bestätigt (bearbeitet)

11.2 WHO Klassifikation der Tumoren des Ovar, Tube und Peritoneum

Epitheliale Tumoren

seröse Tumoren

Benigne	seröses Zystadenom seröses Adenofibrom seröses Oberflächenpapillom
Borderline	seröser Borderlinetumor /atypischer proliferativer seröser Tumor seröser Borderlinetumor - mikropapilläre Variante /Nicht-invasives low-grade seröses Karzinom
Maligne	Low-grade seröses Karzinom High-grade seröses Karzinom

Muzinöse Tumoren

Benigne	muzinöses Zystadenom muzinöses Adenofibrom
Borderline	muzinöser Borderlinetumor /atypischer proliferativer muzinöser Tumor
Maligne	muzinöses Karzinom

Endometrioide Tumoren

Benigne	endometrioides Zystadenom endometrioides Adenofibrom
Borderline	endometrioider Borderlinetumor /atypischer proliferativer endometrioider Tumor
Maligne	endometrioides Karzinom

Klarzellige Tumoren

Benigne	klarzelliges Zystadenofibrom klarzelliges Adenofibrom
Borderline	klarzelliger Borderlinetumor /atypischer proliferativer klarzelliger Tumor
Maligne	klarzelliges Karzinom

Brennertumoren

Benigne	Brennertumor
Borderline	Borderline Brennertumor /atypischer proliferativer Brennertumor
Maligne	maligner Brennertumor

Seromuzinöse Tumoren

Benigne	seromuzinöses Zystadenom seromuzinöses Adenofibrom
Borderline	seromuzinöser Borderlinetumor /atypischer proliferativer klarzelliger Tumor
Maligne	seromuzinöses Karzinom

undifferenziertes Karzinom

Gemischt epithelial-mesenchymale Tumoren

Adenosarkom

Karzinosarkom

Tabelle 9: WHO Klassifikation der Tumoren des Ovar, Tube und Peritoneum [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)]