

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Diedrich

**Der lokale Vitamin-D-Metabolismus am Ovar –
Einflussfaktor bei der Entstehung des
Ovarialkarzinoms?**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von
Marlene Thomé
aus Steinheim

Lübeck, 2009

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Dorothea Fischer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.08.2011

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.08.2011

Für Mama und Papa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Vitamin D-Metabolismus	1
1.1.1 Regulation der Enzymaktivität.....	2
1.1.2 Vitamin D-Rezeptor (VDR).....	2
1.2 Bedeutung von Vitamin D für den Menschen.....	3
1.2.1 Kalzium- und Phosphathaushalt.....	3
1.2.2 Erkrankungen der Knochen bei Vitamin D-Mangel	4
1.2.3 Weitere Auswirkungen eines Vitamin D-Mangels	5
1.3 Extrarenaler Vitamin D-Metabolismus	5
1.3.1 Einfluss extrarenalen Calcitriols auf das Immunsystem	5
1.3.2 Bedeutung extrarenalen Calcitriols für die Barriereintegrität	6
1.4 Zusammenhang zwischen Vitamin D und Krebsentstehung.....	7
1.4.1 Antitumoreffekt von Calcitriol.....	7
1.4.2 VDR in Tumoren.....	9
1.5 1α OHase: Schlüsselenzym im Vitamin D-Metabolismus	9
1.5.1 Das Enzym 1α OHase	9
1.5.2 1α OHase in Tumoren	10
1.6 24 OHase: Abbau und Inaktivierung der Vitamin D-Metaboliten	11
1.6.1 Das Enzym 24 OHase	11
1.6.2 24 OHase in Tumoren	11
1.7 Relevanz der untersuchten Thematik	12
1.7.1 Das Ovarialkarzinom.....	12
1.7.2 Inzidenz des Ovarialkarzinoms in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status	15

1.7.3	Ziel der vorliegenden Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Zelllinien	17
2.1.2	Geräte	17
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer	22
2.2.2	Probengewinnung.....	24
2.2.3	PCR	28
2.2.4	Western Blot.....	32
2.2.5	Immunhistochemie	36
2.2.6	Real Time-PCR	38
2.2.7	Klonierung und Sequenzierung von 1 α OHase-Splice-Varianten aus Zellen und Gewebe.....	42
3	Ergebnisse 1αOHase	50
3.1	Untersuchung zur Expression der 1 α OHase mittels Nested Touchdown-PCR im Gewebe.....	50
3.1.1	Bestimmung der optimalen total RNA-Menge zur mRNA-Isolierung	50
3.1.2	Bestimmung der optimalen cDNA-Template-Menge im ersten PCR-Schritt....	50
3.1.3	1 α OHase-Expression in malignem und benignem Ovarialgewebe.....	50
3.2	Untersuchung zur Expression der 1 α OHase mittels Nested Touchdown-PCR an Zelllinien.....	52
3.2.1	Bestimmung der optimalen total RNA-Menge zur mRNA-Isolierung	52
3.2.2	Bestimmung der optimalen cDNA-Template-Menge im ersten PCR-Schritt....	52
3.2.3	1 α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zelldichte nach 0-96 h.....	53
3.2.4	1 α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zellkulturpassage	53
3.3	Untersuchung zur Expression der 1 α OHase mittels Real Time-PCR im Gewebe	55
3.4	Untersuchung zur Expression der 1 α OHase mittels Real Time-PCR an Zelllinien..	55

3.5	Untersuchung zur Proteinexpression der 1 α OHase mittels Western Blot im Gewebe	56
3.5.1	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration.....	56
3.5.2	1 α OHase-Expression in malignem und benignem Ovarialgewebe.....	57
3.6	Untersuchung zur Proteinexpression der 1 α OHase mittels Western Blot an Zelllinien.....	60
3.6.1	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration.....	60
3.6.2	Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration.....	60
3.6.3	Bestimmung der optimalen Primär-Ak-Konzentration	60
3.6.4	1 α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zelldichte.....	61
3.6.5	1 α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zellkulturpassage	61
3.7	Immunhistochemie 1 α OHase	65
3.8	Klonierung und Sequenzierung von 1 α OHase-Splice-Varianten aus Zellen und Gewebe	68
4	Ergebnisse 24OHase.....	71
4.1	Untersuchung zur Expression der 24OHase mittels Real Time-PCR im Gewebe	71
4.2	Untersuchung zur Expression der 24OHase mittels Real Time-PCR an Zelllinien..	71
4.3	Untersuchung zur Proteinexpression der 24OHase mittels Western Blot im Gewebe	72
4.3.1	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration.....	72
4.3.2	Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration.....	73
4.3.3	24OHase-Expression in malignem und benignem Ovarialgewebe.....	73
4.4	Untersuchung zur Proteinexpression der 24OHase mittels Western Blot an Zelllinien.....	75
4.4.1	Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration.....	75
4.4.2	Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration.....	76
4.4.3	Bestimmung der optimalen Primär-Ak-Konzentration	76
4.4.4	24OHase-Expression in Abhängigkeit der Zellkulturpassage	76

5	Diskussion	80
5.1	Untersuchung der 1 α OHase-Expression in benignem und malignem Ovarialgewebe sowie an malignen Ovarial-Zelllinien im Vergleich zu benignen GLZ.....	80
5.2	Untersuchung der 24OHase-Expression in benignem und malignem Ovarialgewebe sowie an malignen Ovarial-Zelllinien im Vergleich zu benignen GLZ.....	86
5.3	Zusammenhang zwischen 1 α OHase und 24OHase in benignem und malignem Ovarialgewebe sowie in Ovarialkarzinomzelllinien.....	90
5.4	Ausblick.....	91
6	Zusammenfassung.....	93
	Literaturverzeichnis.....	95
	Anhang	A-I
	Danksagung.....	A-XIX
	Lebenslauf.....	A-XX

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Expression der 1 α OHase und Detektion möglicher Splice-Varianten in malignem und benignem Ovarialgewebe	51
Abb. 3.2: Expression der 1 α OHase und Detektion möglicher Splice-Varianten in GLZ/HGL5 und in OVCAR-3/COV434.....	54
Abb. 3.3: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Expression nach Real Time-PCR normalisiert zu HPRT in malignem relativ zu benignem Ovarialgewebe.....	55
Abb. 3.4: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Expression nach Real Time-PCR normalisiert zu HPRT in HGL5, OVCAR-3 und COV434 relativ zu GLZ	56
Abb. 3.5: Proteinexpression der 1 α OHase exemplarisch an malignem und benignem Ovarialgewebe.....	58
Abb. 3.6: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin in malignem relativ zu benignem Ovarialgewebe.....	59
Abb. 3.7: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin unter Einbeziehung von Varianten in malignem relativ zu benignem Ovarialgewebe.....	59
Abb. 3.8: Expression der 1 α OHase in verschiedenen Zellkulturpassagen in GLZ, HGL5, OVCAR-3 und COV434	63
Abb. 3.9: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin in HGL5, OVCAR-3 und COV434 relativ zu GLZ	64
Abb. 3.10: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin unter Einbeziehung von Varianten in GLZ, HGL5, OVCAR-3 und COV434 relativ zu GLZ	65
Abb. 3.11: Immunhistochemie: benignes Ovarialgewebe, nach Primär- und Sekundär-Ak je 1:1000.....	66
Abb. 3.12: Immunhistochemie: benignes Ovarialgewebe, Negativkontrolle ohne Primär-Ak und nach Sekundär-Ak 1:1000.....	66
Abb. 3.13: Immunhistochemie: malignes Ovarialgewebe, nach Primär- und Sekundär-Ak je 1:1000.....	67
Abb. 3.14: Immunhistochemie: malignes Ovarialgewebe, Negativkontrolle ohne Primär-Ak und nach Sek-Ak 1:1000	67

Abb. 3.15: Für die Sequenzierung ausgewählte Klone nach Plasmidisolation und EcoR1-Verdau	69
Abb. 3.16: Genstruktur der 1 α OHase mit Markierung der für die Ferrodixin-Bindungsstelle und für die Häm-Bindungsstelle kodierenden Regionen sowie Struktur nachgewiesener 1 α OHase-Splice-Varianten in den sequenzierten Proben.....	70
Abb. 4.1: Quantitative Auswertung der 24OHase-Expression nach Real Time-PCR normalisiert zu HPRT in malignem relativ zu benignem Ovarialgewebe.....	71
Abb. 4.2: Quantitative Auswertung der 24OHase-Expression nach Real Time-PCR normalisiert zu HPRT in HGL5, OVCAR-3 und COV434 relativ zu GLZ.....	72
Abb. 4.3: Proteinexpression der 24OHase exemplarisch an malignem und benignem Ovarialgewebe.....	74
Abb. 4.4: Quantitative Auswertung der 24OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin in malignem relativ zu benignem Ovarialgewebe.....	75
Abb. 4.5: Expression der 24OHase in verschiedenen Zellkulturpassagen in GLZ, HGL5, OVCAR-3 und COV434	78
Abb. 4.6: Quantitative Auswertung der 24OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin in HGL5, OVCAR-3 und COV434 relativ zu GLZ	79

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Zellen.....	17
Tab. 2.2:	Geräte	18
Tab. 2.3:	Verbrauchsmaterialien.....	18
Tab. 2.4:	Chemikalien und Reagenzien	19
Tab. 2.5:	In der PCR verwendete Reagenzien	19
Tab. 2.6:	Im Western Blot verwendete Reagenzien	20
Tab. 2.7:	Im Western Blot verwendete Primär-Antikörper	20
Tab. 2.8:	Im Western Blot verwendete Sekundär-Antikörper	20
Tab. 2.9:	In der Immunhistochemie verwendete Reagenzien.....	21
Tab. 2.10:	In der Immunhistochemie verwendete Primär-Antikörper	21
Tab. 2.11:	In der Immunhistochemie verwendete Sekundär-Antikörper	21
Tab. 2.12:	Für die Klonierung verwendete Reagenzien	21
Tab. 2.13:	Zusammensetzung 75% Ethanol	22
Tab. 2.14:	Zusammensetzung PBS + 0,1% Tween 20	22
Tab. 2.15:	Zusammensetzung 1x TBE-Puffer	22
Tab. 2.16:	Zusammensetzung 5% Block-Milch	22
Tab. 2.17:	Zusammensetzung 10x Laufpuffer.....	22
Tab. 2.18:	Zusammensetzung 1x Laufpuffer.....	23
Tab. 2.19:	Zusammensetzung 10x Transferpuffer.....	23
Tab. 2.20:	Zusammensetzung 1x Transferpuffer.....	23
Tab. 2.21:	Zusammensetzung Zellysepuffer	23
Tab. 2.22:	Zusammensetzung 10% SDS	23
Tab. 2.23:	Zusammensetzung 10% APS	23
Tab. 2.24:	Zusammensetzung 4x Trenngelpuffer.....	24
Tab. 2.25:	Zusammensetzung 4x Sammelgelpuffer	24
Tab. 2.26:	Zusammensetzung 4x Ladepuffer	24
Tab. 2.27:	Pipettieransatz cDNA-Synthese, Nested Touchdown-PCR	29
Tab. 2.28:	Pipettieransatz Nested Touchdown-PCR	31
Tab. 2.29:	Zusammensetzung Trenngel (12,5%).....	34
Tab. 2.30:	Zusammensetzung Sammelgel (4%).....	34
Tab. 2.31:	Pipettieransatz cDNA-Synthese Real Time-PCR (1).....	40

Tab. 2.32: Pipettieransatz cDNA-Synthese Real Time-PCR (2).....	40
Tab. 2.33: Pipettieransatz Real Time-PCR.....	41
Tab. 2.34: Pipettieransatz Klonierung, Kontroll-PCR.....	44
Tab. 2.35: Pipettieransatz Klonierung, A-Overhang	45
Tab. 2.36: Pipettieransatz Klonierung, Ligation.....	45
Tab. 2.37: Pipettieransatz Klonierung, Ligation Kontroll-PCR	46
Tab. 2.38: Pipettieransatz Klonierung, Ligation Negativkontrolle.....	46
Tab. 2.39: Pipettieransatz Klonierung, EcoR1-Verdau	48
Tab. 3.1: Übersicht der durch Nested Touchdown-PCR detektierten Genvarianten der 1 α OHase (2,2 kb) in malignem und benignem Ovarialgewebe.....	52
Tab. 3.2: Übersicht der durch Nested Touchdown-PCR detektierten, möglichen Genvarianten der 1 α OHase (2,2 kb) in GLZ, HGL5, OVCAR-3 und COV434...	54
Tab. 3.3: Übersicht detektierter, möglicher Varianten des 1 α OHase-Proteins (56 kDa)	57
Tab. 3.4: Größe des 1 α OHase-Signals im PCR-Bild und Genstruktur nach Auswertung der durch Sequenzierung untersuchten Klone.....	70
Tab. 4.1: Übersicht detektierter Varianten des 24OHase-Proteins (55 kDa) in malignem und benignem Ovarialgewebe	74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
ggf.	gegebenenfalls
h	hours (Stunden)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mM	Millimol
min	minutes (Minuten)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
nM	Nanomol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
sec	seconds (Sekunden)
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem

UV-Strahlung

V

v. a.

vgl.

µl

z. B.

z. T.

Ultraviolettstrahlung

Volt

vor allem

vergleiche

Mikroliter

zum Beispiel

zum Teil

1 Einleitung

Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃), die aktive Form von Vitamin D, spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes. Über die Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel hinaus ist auch ein Einfluss von Vitamin D auf Prozesse der Immunantwort und die Reifung und Differenzierung von Zellen bekannt. Es wird ein Zusammenhang zwischen einem Mangel an Vitamin D und der Entstehung u. a. immunologischer und granulomatöser Erkrankungen sowie verschiedener Karzinome beschrieben.

1.1 Vitamin D-Metabolismus

Calcitriol entsteht in mehreren Schritten aus dem Cholesterinderivat 7-Dehydrocholesterol, das durch UV-Strahlung über Provitamin D₃ in Vitamin D₃ umgewandelt wird. Dieser Prozess findet in der Haut statt, wodurch der Mensch bei ausreichender Exposition von UV-Strahlung nicht zwangsläufig auf eine Vitamin D-Zufuhr von außen angewiesen ist. Calcitriol ist daher im engeren Sinne kein Vitamin, sondern eher ein Hormon. Biochemisch gehört es zu den Secosteroiden.

Die Reaktion zu Calcitriol und die anschließende Inaktivierung werden durch verschiedene Enzyme der Cytochrom P450-Familie katalysiert. Vitamin D₃ wird zunächst in der Leber durch die 25-Hydroxylase (CYP27A1, 25OHase) in 25-Hydroxyvitamin D₃ (25-Hydroxycholecalciferol, 25(OH)D₃, Calcidiol), umgewandelt. Von allen Vitamin D-Metaboliten weist 25(OH)D₃ die höchste Serumkonzentration auf und zeigt den Vitamin D-Status an. In der Niere katalysiert die 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase (1 α -Hydroxylase, CYP27B1, 1 α OHase) schließlich die Reaktion zu dem Vitamin D-Metaboliten mit der höchsten biologischen Aktivität, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25-Dihydroxycholecalciferol, 1,25(OH)₂D₃, Calcitriol). Diese Aktivierung findet im Rahmen der Kalziumhomöostase bei niedrigem Serum-Kalziumspiegel statt (Zehnder et al., 1999). Ein weiteres in den Vitamin D-Metabolismus eingebundenes Enzym, die 25-Hydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase (24-Hydroxylase, CYP24, 24OHase), ist für den Abbau der aktiven Vitamin D-Metaboliten verantwortlich und wird neben der Niere auch in Prostata, Intestinaltrakt, Ovar und weiteren Geweben mit Vitamin D-Rezeptor (VDR) exprimiert. Das Enzym katalysiert die

1 Einleitung

Hydroxylierung von Calcitriol zu 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ (24,25(OH)₂D₃) und zu 1,24,25-Trihydroxyvitamin D₃ (1,24,25(OH)₃D₃) sowie die von 25OHD₃ zu 24,25(OH)₂D₃.

Neben diesem klassischen Vitamin D-Metabolismus existieren auch eine extrarenale, lokale Synthese sowie ein Abbau von Calcitriol in verschiedenen Geweben und Zellen.

1.1.1 Regulation der Enzymaktivität

Die in den Vitamin D-Metabolismus involvierten Enzyme werden im Rahmen der Kalzium- und Phosphathomöostase durch eine negative Rückkopplung reguliert. Hohe Level an zirkulierendem Calcitriol bzw. an Kalzium und Phosphat hemmen die Aktivität der 1 α OHase und induzieren die Inaktivierung von Calcitriol durch die 24OHase; niedrige Level dieser Substanzen hingegen führen zu einer erhöhten Aktivität der 1 α OHase, so dass die Menge an zirkulierendem Calcitriol und folglich an Kalzium ansteigt. Das ebenfalls den Kalzium-Serumspiegel erhöhende Parathormon (PTH) bewirkt wiederum eine Verminderung der 1 α OHase-Expression. Die Expression der 24OHase wird in nahezu allen Geweben mit VDR-Expression durch Calcitriol im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus hochreguliert, um hyperkalzämischen Effekten vorzubeugen (Christakos et al., 2003). Dies geschieht durch eine Bindung von Calcitriol an bestimmte DNA-Bindungsstellen des 24OHase-Gens (vitamin d response elements, VDRE) (Kerry et al., 1996). Weitere Mechanismen zur Regulation der 1 α OHase-Aktivität wurden u. a. in Studien von Christakos et al. untersucht (Christakos et al., 2006).

1.1.2 Vitamin D-Rezeptor (VDR)

Ein Großteil der Effekte von Calcitriol wird über den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt. Der VDR ist ein intrazellulärer Rezeptor aus der Familie der Steroidhormon-Rezeptor-Superfamilie. Er hat eine hohe Affinität bei geringer Kapazität und ist überwiegend im Zellkern lokalisiert. Der VDR ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der nach Bindung von Calcitriol und anschließender Phosphorylierung des Rezeptors ein Heterodimer mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) bildet und an VDRE bindet. Auf diesem Weg wird die Transkription der Zielgene durch den VDR bzw. indirekt durch Calcitriol hoch- oder herunterreguliert (Johnson et al., 2006). In diesen Mechanismus sind eine Reihe von Koaktivatoren involviert, z. B. der Koaktivator-Komplex DRIP (engl.: vitamin D3 receptorinteracting proteins) und VDR-interagierende Proteine (englisch: thyroid receptor

1 Einleitung

activating proteins TRAP) (Christakos et al., 2006). Darüber hinaus kann Calcitriol auch vom VDR unabhängig wirken, z. B. durch eine Aktivierung der Proteinkinase C (Slater et al., 1995) und durch eine direkte Auslösung des Kalzium-Transports (De Boland et al., 1990). Der VDR ist gewebespezifisch unterschiedlich stark exprimiert. Neben den in den klassischen Vitamin D-Metabolismus einbezogenen Organen (Darmmukosa, Niere, Knochen) findet er sich auch in anderen Mesenchym- und Epithelzellen sowie in Leukämiezellen und vielen malignen Zelltypen.

1.2 Bedeutung von Vitamin D für den Menschen

Vitamin D erfüllt im menschlichen Organismus eine Reihe wichtiger Funktionen, was insbesondere bei einem Defizit ersichtlich wird. Der 25(OH)D₃-Serumspiegel, als Maß für den Vitamin D-Status, beträgt 25 bis 125 nM im Winter und 50 bis 300 nM im Sommer. Von einem Vitamin D-Defizit wird bei einer 25(OH)D₃-Serumkonzentration unter 10 nM gesprochen; im Konzentrationsbereich von ca. 30 nM liegt eine Vitamin D-Insuffizienz vor (Peterlik und Cross, 2005).

1.2.1 Kalzium- und Phosphathaushalt

Calcitriol wirkt auf den Knochenaufbau überwiegend über eine Regulierung der intestinalen Kalzium- und Phosphat-Absorption (Amling et al., 1999). Dabei induziert es die Expression des Kalzium bindenden Proteins Calbindin und erleichtert damit die Kalzium-Diffusion durch die intestinalen Zellen. VDR Knockout-Mäuse zeigen eine um 50% reduzierte Expression der Calbindin-mRNA (Li et al., 1998). Darüber hinaus wurden apikale Kalzium-Kanäle sowohl in Epithelien des Dünndarms als auch im distalen Nephron der Niere entdeckt, die auf Calcitriol reagieren und einen zusätzlichen Mechanismus des Kalzium-Eintritts vermuten lassen (Hoenderop et al., 2005). Studien an Zellen des Knochenstoffwechsels zeigten weiterhin auch direkte Effekte von Calcitriol auf den Knochen, u. a. gewährleistet die Induktion der Kalzium bindenden Proteine Osteocalcin und Osteopontin eine stetige Erneuerung der Knochensubstanz (Price und Baukol, 1980; Shapses et al., 2003). Es sind Calcitriol-Analoga entwickelt worden, die selektiv in Osteoblasten aktiv sind und die Knochenbildung induzieren (Shevde et al., 2002). Neben Calcitriol bewirkt auch das in den Nebenschilddrüsen gebildete PTH eine Erhöhung des Serumkalziums, hierbei durch eine Kalziumfreisetzung aus den Knochen. Calcitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert und senkt den Kalziumspiegel im Serum durch eine Hemmung der Osteoklastenaktivität und durch eine

1 Einleitung

Erhöhung der Kalziumausscheidung über die Niere. PTH erhöht die Transkription des 1α OHase-Gens, Calcitonin wirkt unter normokalzämischen Bedingungen auf die 1α OHase-Aktivität stimulierend (Shinki et al., 1999).

Eine im Rahmen maligner Neoplasien häufig zu beobachtende Hyperkalzämie ist meist Folge einer Sekretion des Tumors von rekombinantem PTH (rPTH) bei gleichzeitig normalem Calcitriol-Serumspiegel. Eine Ausnahme hiervon bildet das Dysgerminom, bei dem in einer Studie von Evans et al. eine stark erhöhte Expression der 1α OHase-mRNA sowohl im Tumorgewebe als auch in Makrophagen des entzündlichen Infiltrates (s. u.) detektiert wurde und als Ursache der Hyperkalzämie angesehen werden konnte (Evans et al., 2004).

1.2.2 Erkrankungen der Knochen bei Vitamin D-Mangel

Im Rahmen der Rachitis kommt es im Kindesalter aufgrund eines Kalziummangels zu einer gestörten Mineralisation des wachsenden Knochens. Meist liegt die Ursache in einer verminderten Sonnenlichtexposition in Verbindung mit einer unzureichenden Vitamin D-Zufuhr durch die Nahrung. Seltener führt im Rahmen der hereditären Pseudovitamin D-defizienten (Vitamin D-abhängige) Rachitis ein Defekt der 1α OHase zu einem Mangel an Calcitriol bei gleichzeitig erhöhtem $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Serumspiegel (Fraser et al., 1973). Das Gen der humanen 1α OHase ist auf dem langen Arm des Chromosoms 12 in der Region q13.1-q13.3 lokalisiert. Mittels Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) konnte gezeigt werden, dass der Genlocus der Pseudovitamin D-defizienten Rachitis im Intervall 12q13-q14 liegt (Labuda et al., 1996), wodurch Mutationen im 1α OHase-Gen für den Phänotyp der Krankheit in Betracht kommen. Die Identifizierung dieser Mutationen ist seit längerer Zeit Gegenstand der Forschung (Berg, 1998).

Das der Rachitis entsprechende Krankheitsbild im Erwachsenenalter stellt die Osteomalazie mit schmerzhafter Knochenerweichung und häufig assoziierter Osteoporose dar. Ähnliche Auswirkungen auf den Knochen zeigen sich im Rahmen des Hyperparathyreoidismus, wobei der sekundären Form eine verminderte Funktion der 1α OHase zugrunde liegt (Heaney et al., 2003). Calcitriol und das Analogon Paracalcitol werden zur Therapie des sekundären Hyperparathyreoidismus bei chronischer Nierenerkrankung eingesetzt (Anderson et al., 2006).

1.2.3 Weitere Auswirkungen eines Vitamin D-Mangels

Epidemiologische Studien belegen weiterhin, dass eine inverse Korrelation zwischen dem Vitamin D-Status und dem Risiko für Th1-Zytokin vermittelte Autoimmunerkrankungen besteht. Dazu gehören neben entzündlichen Darmerkrankungen (Haderslev et al., 2003) u. a. die rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes, Multiple Sklerose und Diabetes mellitus Typ 1 (Peterlik und Cross, 2005). Durch Verabreichung von Vitamin D konnte bei Tieren die Entwicklung dieser Erkrankungen verhindert bzw. vorliegende Krankheitssymptome verringert werden (Mathieu und Adorini, 2002). Granulomatöse Erkrankungen, wie Sarkoidose, Tuberkulose und Morbus Crohn, entstehen vermehrt bei Vorliegen eines Vitamin D-Defizits und führen häufig zu einem Verlust an Knochendichte; paradoxerweise weisen die Patienten durch die Calcitriol-Synthese aktivierter Makrophagen häufig gleichzeitig eine Hyperkalzämie und Hyperkalzurie auf (Hewison et al., 2007; Ustianowski et al., 2005).

1.3 Extrarenaler Vitamin D-Metabolismus

Die Detektion einer extrarenalen Calcitriol-Synthese ließ die Frage aufkommen, ob renale und extrarenale 1 α OHase eine identische DNA-Sequenz aufweisen. Dies konnte durch Klonierung des renalen (Monkawa et al., 1997) und des extrarenalen Enzyms (Fu et al., 1997) und den anschließenden Vergleich beider DNA-Sequenzen bestätigt werden. Im Gegensatz zu dem in der Niere synthetisierten Calcitriol unterliegt die lokale Calcitriol-Synthese in aktivierten Makrophagen nahezu keinem negativen Feedback-Mechanismus durch Calcitriol oder PTH. Calcitriol erhöht die 24OHase-Aktivität nicht (Wu et al., 2007), induziert jedoch dessen Expression (Monkawa et al., 2000). Als Mechanismus zur Regulierung der extrarenalen 24OHase-Aktivität wird u. a. alternatives Splicen diskutiert (Ren et al., 2005).

1.3.1 Einfluss extrarenalen Calcitriols auf das Immunsystem

Die Effekte von Calcitriol auf das Immunsystem sind komplex. Einzelne Mechanismen sind zum aktuellen Stand der Forschung noch unklar und einige Beobachtungen erscheinen paradox. Im Folgenden wird ein Überblick der grundlegenden Mechanismen gegeben.

Eine extrarenale Calcitriolsynthese konnte zuerst in Makrophagen nachgewiesen werden, welche entweder durch Entzündung (Adams et al., 1983) oder nach *in vitro* hervorgerufener Immunsystemantwort (Reichel et al., 1987) aktiviert waren. Das synthetisierte Calcitriol der

1 Einleitung

Makrophagen ist in der Lage, andere antigenpräsentierende Zellen (APs), insbesondere dendritische Zellen (DCs), parakrin zu aktivieren. Auch diese Zellen synthetisieren Calcitriol, welches die Aktivität von T-Zellen, die Expression von Th1- und Th2-Zytokinen und die Reifung anderer DCs hemmt und somit die Immunantwort dämpft (Townsend et al., 2005). Die große Bedeutung des extrarenal von CD_s produzierten Calcitriols zur Kontrolle des Immunsystems wird an 1 α OHase Knockout-Mäusen deutlich, die multiple Lymphknotenvergrößerungen mit stark erhöhter DC-vermittelter Antigenpräsentation und T-Zell-Proliferation aufweisen (Panda et al., 2001). Die Einbeziehung von Calcitriol in die Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie z. B. des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und der atopischen Dermatitis, zeigten bisher dennoch nicht die gewünschten Erfolge. In zukünftigen Therapieansätzen sollen die proinflammatorischen Effekte von Calcitriol berücksichtigt und gezielt unterdrückt werden (Reichrath, 2007). Im Gegensatz zur beschriebenen Dämpfung der Immunantwort unterstützt Calcitriol im Rahmen der Antitumor-Immunität initial die Differenzierung von Makrophagen und natürlichen Killerzellen (Ravid et al., 1993) und fördert damit initiale Immunprozesse. Diese differenzierten Wirkungen von Calcitriol auf das Immunsystem wurden in Untersuchungen von Hewison et al. an Immunzellen gezeigt, in denen Calcitriol und 25(OH)₂D₃ eine Erhöhung des Makrophagen-Antigens CD14 (Förderung der angeborenen Immunantwort) und eine Verminderung sämtlicher Antigene der DCs (Dämpfung der erworbenen Immunantwort) bewirkten (Hewison et al., 2007).

1.3.2 Bedeutung extrarenalen Calcitriols für die Barriereintegrität

In Keratinozyten synthetisiertes Calcitriol wirkt antiproliferativ und immunsuppressiv, was zum Einbezug von Vitamin D-Analoga in die Behandlung der hyperproliferativen Hautkrankheit Psoriasis führte (Reichrath, 2007). Außerdem induziert Calcitriol in der Epidermis die Differenzierung von Zellen und bewirkt damit, synergistisch mit Kalzium, in der Hornschicht eine Erhaltung der Barriereintegrität (Bikle et al, 2004). Auch in der Plazenta/Dezidua, im distalen Nephron, in Gefäßen, im Kolon und in Haarfollikeln wurde eine 1 α OHase-Expression nachgewiesen. Die Funktion von Calcitriol liegt auch hier in der Erhaltung der Barriereintegrität (Townsend et al., 2005).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass extrarenal synthetisiertes Calcitriol sowohl in immunologischen als auch in nicht immunologischen Zellen wichtige Funktionen erfüllt. Es wirkt dabei para- und autokrin.

1.4 Zusammenhang zwischen Vitamin D und Krebsentstehung

1.4.1 Antitumoreffekt von Calcitriol

Calcitriol zeigt beim Menschen eine Antitumoraktivität sowohl im Gewebe als auch in Zellen, wie Studien an squamösen Zellen sowie an Lunge, Pankreas, Prostata und Myelomen belegen. Es induziert eine Apoptose der Zellen durch Hochregulierung des Moleküls MEKK-1; außerdem induziert Calcitriol im Zellzyklus einen G0/G1-Arrest durch Modulation der Cyclin-abhängigen Kinasen p21 und p27 und führt zu einer Verminderung der für das Zellüberleben nötigen Kinasen Phospho-Erk (p-Erk) und Phospho-Akt (p-Akt). Ebenso wirken auch die Spaltungen von Kaspase 3, Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und der mitogen aktivierten Proteinkinase (MEK) wachstumshemmend (Johnson et al., 2006). Die Ergebnisse weiterer Studien an Zelllinien beschreiben einen durch Calcitriol vermittelten Zellzyklusarrest in G1/S und G2/M durch eine erhöhte Stabilität der Kinase p27 und durch eine Hochregulierung von GADD45 (growth arrest and DNA damage-inducible gene) sowie einen proapoptotischen Effekt durch eine verminderte Stabilität der Telomerase-mRNA (Zhang et al., 2006).

In humanen Prostatakarzinomzellen wurde eine statistisch hoch signifikant geringere 1α OHase-Aktivität relativ zu benignen Prostatazellen nachgewiesen ($p < 0,001$) (Hsu et al., 2001). Weiterhin reagierten die benignen Zellen auf eine Stimulation sowohl mit Calcitriol als auch mit $25(\text{OH})\text{D}_3$ mit einem verminderten Wachstum, die malignen Zellen zeigten dagegen ausschließlich eine Sensitivität für Calcitriol. Aus diesem verminderten Ansprechen der malignen Zellen auf $25(\text{OH})\text{D}_3$ resultiert eine eingeschränkte Proliferations- und Wachstumskontrolle der Zellen durch Calcitriol (Townsend et al., 2005). Untersuchungen an benignen und malignen Kolonzellen konnten die Hypothese einer in Tumoren generell verminderten 1α OHase-Aktivität nicht bestätigen (Ogunkolade, 2002). Die 1α OHase-Expression zeigt sich in unterschiedlichen Stadien des Kolonkarzinoms different: Im differenzierten Tumor ist das Enzym hoch-, im undifferenzierten Tumor dagegen herunterreguliert (Bareis et al., 2001). Untersuchungen von Miettinen et al. an der malignen Ovarialzelllinie OVCAR-3 zeigten einen wachstumshemmenden Effekt von Calcitriol in hohen Konzentrationen (10 nM, 100 nM), wohingegen niedrige Konzentrationen (0,1 nM) das Wachstum der Zellen induzierten (Miettinen et al., 2004).

Calcitriol und -Analoga zur Prävention und Therapie von Tumoren

Der systemische Einsatz von Calcitriol zur Therapie von Karzinomen ist limitiert. Durch eine hochdosierte bzw. dauerhafte Anwendung von Vitamin D-Präparaten kann eine Hypervitaminose D hervorgerufen werden, die mit Hyperkalzämie und Hyperkalzurie einhergeht. Die Folgen sind eine Nephrokalzinose mit verminderter glomerulärer Filtrationsrate (GFR), Polyurie und sekundärer Polydipsie bis hin zu funktioneller Niereninsuffizienz. Kalziumablagerungen in den Epiphysenfugen führen zu Wachstumsstörungen bei Kindern. Weitere Symptome, insbesondere bei chronischer Überdosierung, sind Übelkeit, Obstipation, Bauchkrämpfe, Bluthochdruck, Psychosen sowie Kopf-, Muskel- und Sehnenschmerzen.

Um diese hyperkalzämischen Nebenwirkungen zu vermeiden, wurden chemisch modifizierte Vitamin D-Analoga entwickelt. Das Deltanoid-Derivat EB1089 (19-nor,1,25(OH)₂D₂, Selocalcitol) mit einer strukturellen Veränderung in der Seitenkette von Calcitriol zeigt eine Wachstumshemmung bei Prostata-, Brust- und Kolontumoren sowie beim Retinoblastom. Auf die Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 zeigt EB1089 einen zehnmal höheren Wachstumseffekt als Calcitriol, eine Wachstumshemmung bei niedrigeren Konzentrationen und eine wesentlich geringere Erhöhung des Serum-Kalziumspiegels (Zhang et al., 2005). Im Rahmen eines Xenograft-Versuchs zeigte EB1089 eine statistisch signifikante Hemmung des Tumorwachstums ($p < 0,01$) bei einer Verminderung des Proliferationsindex ($p < 0,001$) und einer Erhöhung des Apoptoseindex ($p = 0,001$). Für das Ovarialkarzinom wird eine besonders hohe Sensitivität für die wachstumshemmenden Effekte von EB1089 angenommen, da im Vergleich zu anderen Tumoren diese Effekte bereits in niedrigeren Konzentrationen erzielt werden können (Audo et al., 2003). EB1089 ist weiterhin auch für eine Regulation der genomischen Stabilität (Chatterjee, 2001) und für eine Hemmung der Tumor-Angiogenese (Mantell et al., 2000) bekannt.

Bisherige Versuche, einige der unzähligen Vitamin D-Analoga (u. a. Paricalcitol (19-nor,1,25(OH)₂D₂) und 1alpha-Hydroxyl-Ergocalciferol) in die Karzinom-Therapie einzubeziehen, waren enttäuschend, was Untersuchungen von Trump et al. zufolge jedoch zumindest partiell mit falschen Dosierungsschemata zu erklären ist (Trump et al., 2005). Das noch in der Testung befindliche Vitamin D-Analogon DN-101 zeigte in einer Studie an Männern mit Prostatakarzinom eine Erhöhung der medianen Überlebenszeit von 16,4 Monaten (in der Kontrollgruppe) auf 23,5 Monate ($p = 0,035$) (Beer et al., 2005).

1 Einleitung

Ein weiterer Therapieansatz zielt auf einen verminderten Abbau von Calcitriol durch unspezifische Hemmung der 24OHase mit Ketokonazol (Peehl et al., 2002) sowie durch den 24OHase-Inhibitor VID400 (Miettinen et al., 2004). Weiterhin potenziert auch das Glukokortikoid Dexamethason den Antitumoreffekt von Calcitriol und vermindert die durch Calcitriol induzierte Hyperkalzämie (Johnson et al., 2006). Diese Effekte wurden bisher in Studien an verschiedenen Malignomzellen und -gewebe gezeigt, weitere Versuche stehen noch aus.

1.4.2 VDR in Tumoren

Die Höhe der VDR-Expression ist für die Sensitivität eines Karzinoms auf eine Therapie mit Calcitriol bzw. dessen Analoga relevant, da die wachstumshemmenden und antiproliferativen Effekte von Calcitriol über den VDR vermittelt werden (Welsh et al., 2002). Der VDR wird in 43-50 % aller Ovarialkarzinome exprimiert (Ahonen et al., 2000). In Untersuchungen zur Expression von VDR und 24OHase in Tumoren unterschiedlicher Organe wurde eine signifikant erhöhte VDR-Expression bei gleichzeitig erhöhter 24-Hydroxylase-Expression ausschließlich im Ovarialkarzinom nachgewiesen. Das Level an VDR-mRNA war in gesundem Ovargewebe relativ zum Ovarialkarzinom sehr niedrig. 24OHase-mRNA konnte in 10 von 13 gesunden Gewebeproben nicht nachgewiesen werden (Anderson et al., 2006). Studien zufolge haben hohe Calcitriolkonzentrationen einen wachstumshemmenden Effekt auf die maligne Ovarialzelllinie OVCAR-3, wenn diese den VDR exprimieren (Miettinen et al., 2004).

1.5 *1 α* OHase: Schlüsselenzym im Vitamin D-Metabolismus

1.5.1 Das Enzym 1 α OHase

Das Gen der humanen 1 α OHase ist auf dem langen Arm des Chromosoms 12 in der Region q13.1- q13.3 lokalisiert, beinhaltet neun Exons und weist eine Größe von 2,15 kb auf. Exon 6 enthält eine Bindungsstelle für das Eisen-Schwefel-Protein Ferredoxin, das einen für Hydroxylierungsreaktionen erforderlichen Elektronentransfer ermöglicht. Exon 8 beinhaltet eine Häm-Bindungsstelle. Das Häm-Molekül stellt die prosthetische Gruppe des Cytochrom P450-Proteins dar; es besteht aus einem Porphyrinring mit zentralem Eisen-Ion, welches für das Redoxpotential der 1 α OHase verantwortlich ist. Das normal gesplittede 1 α OHase-Enzym ist 56 kDa groß.

1.5.2 1 α OHase in Tumoren

Expressionsstärke und Aktivität

Eine erhöhte 1 α OHase-Expression in Tumorzellen relativ zu normalen Zellen schließt eine verminderte Enzymaktivität nicht aus, wie u. a. die Untersuchungen von Hsu et al. an Prostatakarzinomzellen zeigten (Hsu et al., 2001). Auch in Studien zum Mammakarzinom wurde z. T. eine signifikant erhöhte 1 α OHase-Expression in malignen relativ zu benignen Zellen beschrieben (Friedrich et al., 2006). Eine erhöhte 1 α OHase-Expression, z. B. im Mammakarzinom, B-Zell-Lymphom und Dysgerminom, kann weiteren Studien zufolge nicht ausschließlich den Tumorzellen zugeschrieben werden. In allen beschriebenen Tumoren korreliert das Ausmaß der 1 α OHase-Expression mit der Höhe an mRNA für den Makrophagenmarker CD14 und den Toll Like Rezeptor 4 (TLR4) (Townsend et al., 2005). Diese Marker sind spezifisch für die immunologischen Zellen des entzündlichen Infiltrates, welches insbesondere für die untersuchten Tumoren charakteristisch ist.

Expression von Splice-Varianten

Alternatives Splicing kommt in ca. 70% aller menschlichen Gene vor und spielt im Genom höherer Organismen eine wichtige Rolle (Lareau et al., 2004). Dabei entstehen Proteine, die entweder spezifische Funktionen erfüllen oder die aufgrund des abweichenden Splicemusters funktionell inaktiv sind (Sorek et al., 2004).

Splice-Varianten der 1 α OHase wurden bislang u. a. für das Melanom, das Glioblastoma multiforme (GBM), das Zervixkarzinom, für renale Zelllinien und für die maligne Endometrium-Zelllinie Ishikawa beschrieben (Diesel et al., 2004; Becker et al., 2007). Analysen zur 1 α OHase-Expression in Tumorbiopsien ergaben für alle untersuchten Gewebe, dass generell 1 α OHase-Splice-Varianten vorliegen, wenn vom Gewebe auch das normal gespligte Enzym exprimiert wird (Radermacher et al., 2006). Diese Varianten entstehen u. a. durch ein vorzeitiges Stoppcodon in der kodierenden Sequenz. So entsteht z. B. durch Insertion von Intron 1 ein 9 kDa großes, durch das Fehlen der Exons 4 und 5 ein 22,7 kDa großes Enzym; die normal gespligte 1 α OHase ist 56 kDa groß. Aus nahezu allen beschriebenen Splice-Varianten resultieren durch das Fehlen der Ferredoxin- und der Hämbindungsstelle katalytisch inaktive Enzyme (Diesel et al., 2004). Neueste Untersuchungen von Wu et al. an proximalen Tubuluszellen sowie an einer monozytischen Zelllinie führten zur Detektion Intron 2-enthaltender, nicht kodierender Splice-Varianten-mRNA der 1 α OHase (Wu et al.,

2007). Diese liegt relativ zur Wildtyp-mRNA nur geringfügig vor, bewirkt jedoch eine Expressionshemmung der Wildtyp-mRNA und damit eine verminderte Expression des normalen 1α OHase-Enzyms.

1.6 24OHase: Abbau und Inaktivierung der Vitamin D-Metaboliten

1.6.1 Das Enzym 24OHase

Das kodierende Gen der humanen 24OHase ist auf dem langen Arm von Chromosom 20 in der Region 2q12-q13 lokalisiert, umfasst 12 Exons und weist eine Gesamtlänge von 2,7 kb auf. Die Proteingröße der 24OHase beträgt 55 kDa. Neben der Niere wurde das Enzym bislang u. a. in Prostata, Intestinaltrakt und Ovar nachgewiesen (Miettinen et al., 2004). Die bei den Hydroxylierungsreaktionen aus Calcitriol entstehenden Metaboliten gelten überwiegend als inaktiv; die Aktivität der 24OHase bewirkt somit eine Hemmung der durch Calcitriol vermittelten Effekte. Untersuchungen führten jedoch zu der Annahme, dass der Metabolit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine wichtige Funktion bei Reparaturmechanismen nach einer Knochenfraktur und bei der epiphysialen Ossifikation erfüllt (Bland et al., 1999). Ein positiver Effekt von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Knochenbildung konnte in Studien an osteoporotischen Ratten belegt werden (Gal-Oscovici et al., 2005). Es wird darüber hinaus nicht ausgeschlossen, dass die durch die 24OHase entstehenden Metaboliten einen wachstumsfördernden Effekt auf Zellen ausüben (Campbell et al., 1999; Rashid et al., 2001).

1.6.2 24OHase in Tumoren

Expressionsstärke und Aktivität

Die Expression der 24OHase ist in verschiedenen Malignomen relativ zum gesunden Gewebe erhöht, so z. B. im Brust-, Kolon-, Lungen-, und Ovarialkarzinom (Anderson et al., 2006). Die Induktion der 24OHase-Expression durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann eine Erklärung für den Misserfolg der Calcitriol-Therapie beim Ovarialkarzinom sein. Eine Inhibition der 24OHase verstärkt hingegen eine Calcitriol-induzierte Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung (Miettinen et al., 2004).

Eine erhöhte Genamplifikation der 24OHase wurde zunächst im Mammakarzinom (Chromosom 20q13.2) (Albertson et al., 2000) und kurze Zeit später im Ovarialkarzinom (Chromosom 20q13.2) (Tanner et al., 2000) detektiert. Das Enzym erhielt die Bezeichnung

1 Einleitung

eines möglichen Onkogens, da es die antiproliferativen und zelldifferenzierenden Effekte von Calcitriol durch einen erhöhten Abbau reduziert. In weiteren Studien wurde im Ovar eine statistisch hoch signifikante Verstärkung sowohl der VDR- als auch der 24OHase-Expression ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$) nachgewiesen (Anderson et al., 2006), wodurch sich das Ovar von anderen untersuchten Organen unterscheidet. So wurde u. a. im Kolon-, Lungen- und Oesophaguskarzinom eine statistisch signifikante, inverse Korrelation zwischen den Expressionen von 24OHase und VDR beschrieben (Mimori et al., 2004).

Expression von Splice-Varianten

In einer Studie von Ren et al. wurde in aktivierten Makrophagen – welche u. a. im entzündlichen Infiltrat von Karzinome auftreten - eine alternativ gespligte 24OHase detektiert (Ren et al., 2005). Durch ein Fehlen der Exons 1 und 2 weist das Enzym keine mitochondriale Zielsequenz und damit keine katalytische Aktivität auf. Diese Splice-Variante wurde weiterhin auch in Niere, Plazenta und Haut detektiert. Eine dennoch beobachtete Hemmung der Calcitriolsynthese durch die alternativ gespligte 24OHase ist den Untersuchungen zufolge auf dessen Bindung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ – dem Substrat der $1\alpha\text{OHase}$ - zurückzuführen.

1.7 Relevanz der untersuchten Thematik

1.7.1 Das Ovarialkarzinom

Tumoren des Ovars werden den verschiedenen Gewebekomponenten entsprechend in drei Hauptgruppen unterteilt: epitheliale Tumoren, Keimstrang-Stroma- und Keimzelltumoren, wobei die epithelialen Tumoren mit 80-90% überwiegen. Die genauen Prozesse, die zur Initiation und Progression der Karzinogenese führen, sind noch immer nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung (Aletti et al., 2007; Stanojevic et al., 2009).

Epitheliale Tumoren des Ovars werden ihrem Dignitätsgrad entsprechend in benigne Tumoren (z.B. Zystadenome und Oberflächenpapillome), Borderline-Tumoren (zelluläre Atypien, jedoch keine Stromainfiltration) und maligne Tumoren (Adenokarzinome) unterteilt. Eine weitere Differenzierung der epithelialen Ovarialtumoren berücksichtigt die histogenetische Differenzierung der Tumorzellen. Es werden seröse, muzinöse, endometrioide, klarzellige, urotheliale, undifferenzierte und gemischte Formen unterschieden, wobei seröse (53%) und muzinöse (31%) Differenzierungen am häufigsten beobachtet werden (Lax et al., 2004).

Epidemiologie

Epitheliale Ovarialkarzinome sind in der westlichen Welt die am häufigsten tödlich verlaufenden gynäkologischen Tumoren. In Europa und den USA treten 15 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner im Jahr auf, in Japan dagegen nur drei auf 100.000 Einwohner. Diese viel höhere Inzidenz des Ovarialkarzinoms in westlichen Staaten im Vergleich zu Asien und auch Afrika wird auf unterschiedliche Charakteristiken in der Reproduktion und im Lebensstil sowie auf spezifische medizinische Bedingungen zurückgeführt (El-Khwsy et al., 2006). Es sind vor allem Frauen zwischen dem 40. und 65. Lebensjahr betroffen, wohingegen benigne und Borderline-Tumoren vor allem bei Patientinnen zwischen dem 20. und 45. Lebensjahr auftreten.

Ätiologie

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist bisher weitgehend unklar. Einige Risikofaktoren sind jedoch bekannt, so z.B. häufige ovulatorische Zyklen durch Nulliparität, eine frühe Menarche und eine späte Menopause. Jede Ovulation ist mit Mikrotraumen des ovariellen Epithels assoziiert. Dementsprechend reduzieren die Einnahme von Ovulationshemmern sowie eine hohe Anzahl an Schwangerschaften das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (El-Khwsy et al., 2006). Der protektive Effekt durch eine Ovulationshemmung wird dabei vermutlich noch durch proapoptotische Mechanismen des v. a. während einer Schwangerschaft erhöhten Gestagens Progesteron unterstützt. Durch ähnliche Wirkmechanismen wird ein protektiver Effekt von Retinoiden und Vitamin D vermutet. Androgenen wird hingegen ein wachstumsstimulierender und somit negativer Effekt auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms zugesagt (Rodriguez, 2003). Ein Einfluss diätischer Faktoren, wie z. B. der Verzehr von Fleisch, Fett und faserreicher Nahrungsmittel sowie der Zufuhr von Vitamin A und C, ist nicht gesichert (Aletti et al., 2007). Auch Übergewicht wird in verschiedenen Studien als Risikofaktor deklariert. Eine positive Assoziation zwischen Körpergröße und -gewicht und der Entwicklung eines Ovarialkarzinoms konnte in verschiedenen Kohortenstudien aufgezeigt werden (Schouten et al., 2003; Reeves et al., 2007). Einer aktuellen Analyse von insgesamt zwölf Kohortenstudien zufolge gilt dies v. a. für prämenopausale Frauen (Schouten et al., 2008). Eine Risikoerhöhung durch Karzinogene wie z. B. Talkum oder Asbest, konnte in einer Metaanalyse aus insgesamt 16 Studien beobachtet werden (Huncharek et al., 2003), in einer weiteren Studie konnte ein erhöhtes Risiko durch Talkumkontakt hingegen ausschließlich für die Subgruppe der serösen Ovarialkarzinome festgestellt werden (Gertig et al., 2000). Ein erhöhtes Risiko durch Rauchen konnte in

1 Einleitung

einzelnen Studien nachgewiesen werden, mehrfach wurde jedoch ein signifikanter Zusammenhang ausschließlich für muzinöse Ovarialkarzinome beobachtet (Zhang et al., 2004; Tworoger et al., 2008).

Mehr als 90% der Ovarialkarzinome entstehen sporadisch, 5-10% sind hingegen genetisch bedingt (Engel et al., 2001). Dabei liegen meist Keimbahnmutationen in den für DNA-Reparaturproteine kodierenden Genen BRCA-1 und BRCA-2 vor. Das Ovarialkarzinom tritt dann gehäuft als Syndrom des familiären Brust- und Eierstockkarzinoms auf (King et al., 2003). Bei Frauen mit bekannter Mutation in diesen Genen kann eine bilaterale Adnexektomie das Erkrankungsrisiko senken (Dowdy et al., 2004; Batista et al., 2008). Einer aktuellen Studie zufolge sollte diese Option für beide Gene differenziert in Betracht gezogen werden. Ein statistisch relevant reduziertes Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, ergibt sich demnach ausschließlich bei einer Mutation im BRCA-1-Gen, wohingegen bei einer BRCA-2-Mutation das Brustkrebsrisiko durch eine prophylaktische Mastektomie reduziert werden könne (Kauff et al., 2008).

Klinik

Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigen oft erst spät Symptome, wodurch die Diagnosestellung in über 70% der Fälle in einem fortgeschrittenen Stadium erfolgt. In den Stadien III und IV können Tumoren durch ein großes Volumen gastrointestinale Symptome wie Durchfall und Übelkeit oder auch Störungen bei der Miktion verursachen. Es kann zu einer Zunahme des Bauchumfangs kommen, entweder durch das Tumolvolumen oder als Folge eines vorliegenden Aszites. Die „Facies ovarica“ beschreibt die im Gesicht der Patientinnen erkennbare Tumorkachexie bei gleichzeitig erhöhtem Leibesumfang. Eine Metastasierung erfolgt zunächst intraperitoneal (Omentum majus, kleines Becken, Darm) und lymphogen (pelvine und paraaortae Lymphknoten), später auch hämatogen. Der retroperitoneale Lymphknotenstatus stellt neben dem Tumorstadium, der Größe des postoperativen Tumorrests und dem Ausmaß des Aszites einen wichtigen Prognosefaktor dar (Jonat et al., 2007).

Diagnostik, Therapie, Prognose

Trotz der Bemühungen, das Ovarialkarzinom in einem möglichst frühen Stadium zu diagnostizieren, wird eine routinemäßige Screening-Untersuchung, z. B. durch Sonographie des kleinen Beckens, nicht empfohlen (Battegay et al., 2005). Eine amerikanischen Studie im

1 Einleitung

Zeitraum von 1987 bis 2005 zur Effizienz einer jährlichen Screening-Untersuchung durch transvaginale Sonographie (TVS) zeigte insgesamt eine frühere Diagnosestellung und eine dadurch fallspezifisch gesenkte Mortalität, jedoch wurde ein Ovarialkarzinom bei normal großen Ovarien durch die TVS nicht detektiert (Van Nagell et al., 2007). Auch die Bestimmung des Tumormarkers CA-125 hat aufgrund geringer Spezifität (Erhöhung über den Normwert z. B. auch bei Peritonitis und Endometriose) kaum diagnostischen Wert, wird jedoch zur Verlaufskontrolle herangezogen (Jonat et al., 2007). Nach operativer Entfernung des Ovarialkarzinoms sowie nach adjuvanter Chemotherapie hat der Verlauf des Tumormarkers prognostischen Wert (Høgdall, 2008; Kim et al., 2008).

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht, soweit ein postoperativer Tumorrest von <1cm erreicht werden kann, in einer radikalen Operation mit Hysterektomie, Adnexektomie, Resektion des Omentum majus, paraaortaler und pelviner Lymphonodektomie und ggf. der Entfernung befallener Organbereiche durch Darmteilresektion oder Deperitonealisierung des gesamten Abdomens. An die chirurgischen Maßnahmen wird eine aggressive Chemotherapie angeschlossen. Die Prognose des Ovarialkarzinoms ist durch häufige Diagnosestellung in den Stadien FIGO III und IV trotz dieser radikalen Maßnahmen schlecht, die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 15% im Stadium III und 4% im Stadium IV (Engel et al., 2001). Zur FIGO-Klassifikation siehe Tab. A.2 im Anhang.

1.7.2 Inzidenz des Ovarialkarzinoms in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vitamin D-Status und der Inzidenz des Ovarialkarzinoms ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Neuprez et al. stellten bei postmenopausalen Frauen eine statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen dem Alter der Frauen und ihrem Vitamin D-Serumspiegel fest (Neuprez et al., 2007). Im Jahr 2006 ergab die Auswertung der Daten von 175 Ländern eine inverse Korrelation zwischen der Höhe der UVB-Strahlenexposition und der Inzidenz des Ovarialkarzinoms (Garland et al., 2006). Eine Untersuchung aus dem Jahr 2002 ergab eine inverse Korrelation zwischen Vitamin D-haltiger Diät und der Entstehung des Ovarialkarzinoms (Salazar-Martinez et al., 2002). Eine aktuelle prospektive Kohortenstudie stellte eine Tendenz, jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Vitamin D-Plasmaspiegel und der Inzidenz des Ovarialkarzinoms fest (Tworoger et al., 2007). Ebenfalls aktuelle Untersuchungen aus den USA ergaben eine Reduktion des relativen Risikos, generell an einem Karzinom zu

1 Einleitung

erkranken, bei Einnahme von Kalzium auf $RR=0,532$ ($p = 0,06$) sowie bei Einnahme von Kalzium und Vitamin D₃ auf $RR=0,402$ ($p = 0,01$) (Lappe et al., 2007).

1.7.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll ein möglicher Zusammenhang zwischen dem lokalen Vitamin D-Metabolismus und der Entstehung des Ovarialkarzinoms aufgezeigt werden. Die Untersuchung des Vitamin D-Metabolismus wurde dabei sowohl an malignen Ovarialzelllinien als auch an einer Reihe von Gewebeproben epithelialer Ovarialkarzinome durchgeführt. Es wurde die Expressionsstärke der Enzyme 1α OHase und 24 OHase sowohl auf Protein- als auch auf Genomebene bestimmt; weiterhin wurde untersucht, ob die 1α OHase im Ovarialkarzinom durch alternatives Splicen in ihrem Genom verändert ist. Eine verminderte Funktionalität und Aktivität des Schlüsselenzyms mit einem dadurch herabgesetzten Antitumor-Effekt durch Vitamin D könnte für die Entstehung des Ovarialkarzinoms mit verantwortlich sein.

Im Fall eines Zusammenhangs zwischen dem Vitamin D-Metabolismus im Ovar und der Entstehung des Ovarialkarzinoms könnten sich neuartige Ansätze der Prävention und Therapie durch Vitamin D und -Analoga ergeben. Aktuell werden insbesondere mögliche krebsvorbeugende Wirkungen von Vitamin D intensiv und vielseitig diskutiert und erforscht (Schwartz und Skinner, 2007; Luong und Nguyen, 2009). Relevante Ergebnisse auf diesem Gebiet könnten demnach auf breites Interesse stoßen und in die Erkenntnisse eines umfangreichen Forschungsgebietes integriert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

OVCAR-3 (Humane Ovarialkarzinomzellen)	ATCC, Catalog No. HTB-161, American Type Culture Collection, P.O. Box Manassas, VA 20108 USA
COV-434 (Humane Zellen eines Granulosazelltumors)	Erhalten von Frau Sonntag, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster
HGL5 (Immortalisierte, luteinisierte, humane Granulosazellen)	Erhalten von Frau Sonntag, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster
GLZ (Humane Granulosazellen)	Erhalten aus der Abteilung für Reproduktionsmedizin der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Lübeck (Aufarbeitung s. u.)

Tab. 2.1: Zellen

2.1.2 Geräte

Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Mini spin plus	Eppendorf, Hamburg
Butterfly Rotor	Roth, Karlsruhe
Pipetten Typ Research & References	Eppendorf, Hamburg
Reax 2000 (Vortexer)	Heidolph, Schwabach
Thermostat Plus 2 ml Rocker	Eppendorf, Hamburg
Platform (Schüttler)	Bellco Glass, Vineland, NJ, USA
Ultra-Turrax T25 (Homogenisator)	Janke&Kunkel, Staufen
Photometer Helios γ Cycler	Unicam, Niederlande
PTC-200 DNA Engine	MJ Research, Ramsey, MI, USA
Opticon 2	MJ Research, Ramsey, MI, USA
UV-Licht	MWG-Biotech, Ebersberg
Electrophoresis Photosystem	Kodak IBI, New Haven, CT, USA

2 Material und Methoden

Photometer (BCA Assay)	Dynatech Laboratories, Chantilla, VA USA
Bio-Rad Power Pac	Bio-Rad, München

Tab. 2.2: Geräte

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen Cell Bind Surface T25; T75 cm ²	Corning, Lowell, MA, USA
Zellkulturflaschen T25; T75; T125 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere Filter Tips 2,5; 10; 100; 200; 1000 µl Typ Eppendorf/Gilson	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen (PP)-Röhrchen (steril) 15; 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Pasteurpipetten (steril)	Assistent, Sondheim
Costar Stripette 5; 10; 25 ml	Corning, Lowell, MA, USA
Reaktionsgefäße 1,5; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Culture Plate 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Einweg-Skalpelle	Feather, Japan
Petrischalen 92 x 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Hard-Shell 96-Well Microplates	MJ Research, Ramsey, MI, USA
Combitips plus 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier	Bio-Rad, München
Trans-Blot Transfer Medium (Nitrozellulosemembran)	Bio-Rad, München
Lumocolor Photocop Film	Staedtler, Nürnberg
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Parafilm	American Nat. Can, Baltimore, MD, USA
Einweghandschuhe Peha-Soft	Hartmann, Heidenheim

Tab. 2.3: Verbrauchsmaterialien

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

RPMI 1640 + 25 mM HEPES und L-Glutamin	ATCC, Wesel
Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

2 Material und Methoden

Insulin (bovine)	Sigma, Deisenhofen
Penicillin Streptomycin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Ca&Mg (PBS)	PAA GmbH, Cölbe
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA GmbH, Cölbe
Accutase	PAA GmbH, Cölbe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Tryptan Blau Lösung (0,4%)	Sigma, Deisenhofen

Tab. 2.4: Chemikalien und Reagenzien

Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Fischer, Saarbrücken
Ethanol	J.T.Baker, Niederlande
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
10x TBE-Puffer (1,0 M Tris; 0,9 M Borsäure; 0,01 M EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Marker (Gene Rule 1 kb DNA Ladder; 0,5 mg DNA/ml)	Fermentas, Kanada

Tab. 2.5: In der PCR verwendete Reagenzien

Western Blot

30% Acrylamid/Bis Solution 37,5:1	Bio-Rad, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Bio-Rad, München
Chlorwasserstoffsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Kodak, Stuttgart
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Glycine	Sigma, Deisenhofen

2 Material und Methoden

2-Propanol 70%	Fisher Scientific, Schwerte
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Precision Plus Protein, Dual Color Standards	Bio-Rad, München
Tween 20	Bio-Rad, München
Glycerol	Kodak, Stuttgart
Immobilien Western Chemiluminescent HRP Substrat	Millipore, Billerica, MA, USA
Re Blot Plus Strong 10x	Chemicon, Hofheim

Tab. 2.6: Im Western Blot verwendete Reagenzien

Primär-Antikörper

25(OH)Vitamin D ₃ -1-alpha-Hydroxylase, polyklonaler Schaf-Antikörper	Biologo, Kronshagen
CYP 24 (S-20), sc-32164, polyklonaler Ziegen-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti- β -Aktin, Clone AC-15, ascites fluid, monoklonaler Maus-Antikörper	Sigma, Deisenhofen

Tab. 2.7: Im Western Blot verwendete Primär-Antikörper

Sekundär-Antikörper

Kaninchen anti Schaf IgG, HRP konjugiert, sc 2770	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Esel anti Ziege IgG, HRP konjugiert, sc 2020	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
ECL HRP anti Maus IgG, kompletter Antikörper, an Peroxidase gebunden	Amersham, Freiburg

Tab. 2.8: Im Western Blot verwendete Sekundär-Antikörper

Immunhistochemie

Xylol	J.T. Baker, Niederlande
2-Propanol 100%	Fischer, Saarbrücken
Citratpuffer Target Retrieval Solution 10x	Dako, Hamburg

2 Material und Methoden

Normalserum (Kaninchen)	Dako, Hamburg
Strept Avidin Biotin (StreptAB)-Complex/HRP	Dako, Hamburg
Cytomation Antikörperlösung	Dako, Hamburg

Tab. 2.9: In der Immunhistochemie verwendete Reagenzien

Primär-Antikörper

25(OH)Vitamin D ₃ -1- alpha-Hydroxylase, polyklonaler Schaf-Antikörper	Biologo, Kronshagen
--	---------------------

Tab. 2.10: In der Immunhistochemie verwendete Primär-Antikörper

Sekundär-Antikörper

Kaninchen anti Schaaf IgG (H + L), biotinyliert	Vector, Burlingame, CA, USA
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Peroxidase Substrat Kit DAB	Vector, Burlingame, CA, USA
Hämalaun sauer, nach Mayer	Division Chroma, Münster
Eukitt	Kindler, Freiburg

Tab. 2.11: In der Immunhistochemie verwendete Sekundär-Antikörper

Klonierung

LB-Agar	MP Biomedicals, Solon, OH, USA
LB-Medium	MP Biomedicals, Solon, OH, USA
Kanamycin (50 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen
10x Ladepuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Bakterien TOP10	Invitrogen, Karlsruhe
Taq Polymerase (5 U/ml)	Biolabs, Frankfurt
10x Puffer aus Taq Polymerase	Biolabs, Frankfurt
EcoR1 (10 U/μl)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
10x Puffer React 3	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Vektor pCR 4-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
S.O.C.-Mediums	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2.12: Für die Klonierung verwendete Reagenzien

2.2 Methoden

2.2.1 Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer

75% Ethanol

Ethanol	75 ml
Aqua dest.	25 ml

Tab. 2.13: Zusammensetzung 75% Ethanol

PBS + 0,1% Tween 20

1x PBS	2000 ml
Tween 20	2 ml

Tab. 2.14: Zusammensetzung PBS + 0,1% Tween 20

1x TBE-Puffer

10x TBE-Puffer	100 ml
Aqua dest.	900 ml

Tab. 2.15: Zusammensetzung 1x TBE-Puffer

5% Block-Milch (5% Milch, 0,1% Tween, PBS)

Milchpulver	25 g
1x PBS	500 ml
Tween 20	0,5 ml

Tab. 2.16: Zusammensetzung 5% Block-Milch

10x Laufpuffer (250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3)

Tris	15 g Glycin
Glycin	72 g
SDS	5 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Tab. 2.17: Zusammensetzung 10x Laufpuffer

1x Laufpuffer

2 Material und Methoden

10x Laufpuffer	100 ml
Aqua dest.	900 ml

Tab. 2.18: Zusammensetzung 1x Laufpuffer

10x Transferpuffer (250 mM Tris, 1,92 M Glycin, pH 8,3)

Tris	30 g
Glycin	144 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Tab. 2.19: Zusammensetzung 10x Transferpuffer

1x Transferpuffer

10x Transferpuffer	100 ml
Methanol 100% (4 °C)	200 ml
Aqua dest.	700 ml

Tab. 2.20: Zusammensetzung 1x Transferpuffer

Zellysepuffer (Lämmli) (125 mM Tris, 30% Glycerol, 8% SDS, pH 6,8)

Tris	62,5 ml (60,55 g/500 ml)
Glycerol (60%)	250 ml
SDS	40 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Tab. 2.21: Zusammensetzung Zellysepuffer

10% SDS

SDS	10 g
Aqua dest.ad	100 ml

Tab. 2.22: Zusammensetzung 10% SDS

10% APS

APS	0,1 g
Aqua dest.	ad 1 ml

Tab. 2.23: Zusammensetzung 10% APS

4x Trenngelpuffer (1,5 M TrisCl, pH 8,8)

Tris	36,3 g
HCl	auf pH 8,8 einstellen
Aqua dest.	ad 200 ml

Tab. 2.24: Zusammensetzung 4x Trenngelpuffer

4x Sammelgelpuffer (0,5 M TrisCl, pH 6,8)

Tris	3 g
HCl	auf pH 6,8 einstellen
Aqua dest.	ad 50 ml

Tab. 2.25: Zusammensetzung 4x Sammelgelpuffer

4x Ladepuffer (0,125 M TrisCl, 4% SDS, 20% Glycerol, 2% β -Mercaptoethanol, pH 6,8)

Tris	1 ml
HCl	auf pH 6,8 einstellen
SDS (10%)	1,6 ml
Glycerol	1,2 ml
β -Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenol Blau (1%)	0,6 ml
Aqua dest.	ad 6 ml

Tab. 2.26: Zusammensetzung 4x Ladepuffer

2.2.2 Probengewinnung

Zellkultur

Die Zelluntersuchungen wurden mit den Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3, der nicht luteinisierten Zelllinie COV 434 und immortalisierten, luteinisierten Granulosazellen (HGL5) durchgeführt. Diesen malignen Zelllinien wurden benigne Granulosazellen (GLZ) gegenübergestellt.

2 Material und Methoden

OVCAR-3 wurden im Medium RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FBS), 1% Penicillin-Streptomycin und 0,1% Insulin kultiviert. Dieses Zellkulturmedium stellt ein Hydrogenkarbonat-Puffersystem dar, das auf einer Lösung aus Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen basiert. Die Kultivierung von COV434 erfolgte im Medium DMEM, welches Glutamin, Glukose und Pyruvat enthält und mit zusätzlich 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin versetzt wurde.

GLZ wurden aus Follikelflüssigkeit von Patientinnen gewonnen, die sich im Rahmen einer In Vitro Fertilisation (IVF) oder einer Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) einer hormonellen Stimulation der Ovarien unterzogen hatten. Dazu wurde den Frauen rekombinantes Follikel stimulierendes Hormon (Gonal F, Serono, Schweiz) gegeben, nachdem eine Desensibilisierung und Downregulation der hypophysär-gonadalen Achse mit Nafarelin (Synarela, Pharmacia, Freiburg) stattgefunden hatte. Nachdem mindestens drei Follikel eine Größe von 18 mm erreicht hatten, wurde die Ovulation durch Verabreichung von 10000 IU humanen Gonadotropins (Choragon, Ferring, Kiel) ausgelöst. Nach 36 h wurde die Follikelflüssigkeit transvaginal aspiriert. Die Flüssigkeit wurde zentrifugiert (5 min, 1500x g), das Zellpellet gewaschen (PBS + 0,1% FBS), anschließend in PBS resuspendiert und über eine Lösung zur Auftrennung des Dichtegradienten geschichtet (Ficoll-paque Plus, Amersham Biosciences, Freiburg). Nach Zentrifugation (20 min, 800x g) wurde die Interphase entnommen, zweimal gewaschen (PBS + 0,1% FBS) und zur vollständigen Entfernung aller Erythrozyten für 5 min in Hämolysepuffer (NH_4Cl 155 mmol/l, KHCO_3 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, pH 7,2) inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die GLZ wie auch die HGL5 im Medium RPMI (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe) mit zusätzlich 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin und 2% Ultrosor G (PALL, France) in Kultur genommen.

Die anderen Zelllinien sowie nicht unmittelbar verwendete GLZ wurden bis zur Kultivierung bei -80 °C mit zusätzlich 5-10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kryotubes gelagert. Aufgetaut wurden sie im 37 °C-Wasserbad, in dem auch das jeweilige Medium, 1x PBS zum Waschen der Zellen und Accutase aufgewärmt wurden. Die aufgetauten Zellen wurden aus den Kryotubes in 15 ml-Falconröhrchen überführt und 5 min bei 1500x g pelletiert. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte grundsätzlich bei Raumtemperatur (RT). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in Medium resuspendiert und in Kulturflaschen transferiert. Die Zellen wurden je nach verwendeter Größe der Zellkultur-Flaschen in ca. 6, 10 oder 40 ml kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS erneuert. Zum Ernten der Zellen wurde nach dem Waschschrift

2 Material und Methoden

3 ml Accutase in die (T75-) Flaschen gegeben, diese ca. 10 min bis zum vollständigen Ablösen der Zellen bei 37 °C inkubiert, die Zellen anschließend mit dem jeweiligen Nährmedium suspendiert und in 15 ml-Falconröhrchen pelletiert (5 min, 1500x g). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet zum Passagieren auf mehrere neue Flaschen aufgeteilt, meist in einer Ratio von ca. 1:3.

Bestimmung der Zellzahl

Für einige Versuche war es erforderlich, eine genau definierte Anzahl an Zellen auszusähen. Um die Zellen zu zählen, wurden diese zunächst wie gewohnt geerntet, in Medium resuspendiert und 50 µl der Suspension mit 50 µl Tryptanblau gemischt. Von dieser Lösung wurden ca. 8 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden die vier Großquadrate ausgezählt, der Mittelwert gebildet und die Zellzahl/ml Suspension ermittelt.

Mathematische Darstellung zur Ermittlung der Zellzahl/ml Suspension:

$$X = X_n / 4 * 2 * 10^4$$

Wobei gilt: X = Zellzahl/ml Suspension und X_n = Gesamtzahl der Zellen aller vier Quadranten.

Verarbeitung der Zellpellets

- Aufnahme in Trizol

Die erhaltenen Zellpellets wurden zur Vorbereitung auf die RNA-Isolierung in 1 ml Trizol resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgläsern bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

- Herstellung von Proteinlysat

Je nach Größe der geernteten Zellpellets wurden diese in 0,1-1 ml Lämmli-Puffer resuspendiert. Nach 5 min Denaturierung bei 96 °C wurden die Proben kurz auf Eis gestellt, um den denaturierten Zustand der Proteine zu erhalten und anschließend zentrifugiert (15 min, 14000x g). Das im Überstand befindliche Protein wurde bei -80 °C gelagert.

Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden Patientinnen der Tumorbank entnommen, die am Ovarialkarzinom erkrankt waren oder bei denen aus anderen Gründen eine Entfernung von Ovargewebe notwendig war. Alle Patientinnen stimmten der Überlassung von Gewebe zu Forschungszwecken schriftlich nach entsprechender Aufklärung zu. Das intraoperativ entnommene Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff bei -80 °C eingefroren und gelagert. Zur Auswahl der Proben und für die Zuordnung maligner und benigner Gewebe wurden die histologischen Befunde aus der Pathologie herangezogen. Eine Auflistung der verwendeten Proben, aus der Alter und Diagnose der Patientinnen hervorgeht, befindet sich im Anhang (siehe Tab. A.1).

Verarbeitung der Gewebeproben

- Aufnahme in Trizol

Zur Vorbereitung der RNA-Isolierung wurden die Gewebestücke dem Stickstofftank entnommen und auf Eis gestellt. Sie wurden dann unmittelbar, in noch leicht gefrorenem Zustand, mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, in je 1-2 ml Trizol mit einem Homogenisator aufgearbeitet und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

- Herstellung von Proteinlysat

Zur Proteingewinnung wurden die Proben in je 0,5-1 ml Lysispuffer und 5 μ l PMSF/ml Lysispuffer homogenisiert. Nach 30 min Lagerung auf Eis wurde zentrifugiert (10 min, 13000x g, 4 °C), um feste Gewebereste vom Proteinlysat zu trennen. Der Überstand (Protein) wurde in ein Eppendorfgefäß transferiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 PCR

RNA-Isolierung

Die in Trizol aufgenommenen, bei -80 °C gelagerten Proben wurden bei RT aufgetaut, mit je 200 μ l Chloroform/ml Trizol versetzt und kurz invertiert. Nach anschließender Zentrifugation (15 min, 12000x g, 4 °C) bildete sich eine untere Trizol- und eine obere Chloroformphase, getrennt von einer Proteinschicht. Die obere, die RNA enthaltene Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Nach Zusatz von 0,5 ml 2-Propanol zur Fällung der RNA, Mischen durch Vortexen und zehnmütiger Inkubation bei RT wurde die RNA pelletiert (15 min, 12000x g, 4 °C), der Überstand wurde verworfen. Zum Waschen des Pellets wurde je 1 ml 75% Ethanol zugegeben, der Überstand nach Mischen durch Vortexen und Zentrifugation (5 min, 12000x g, 4 °C) erneut vom Pellet abgenommen und dieses schließlich je nach Größe des Pellets in 50-500 μ l RNase freiem DEPC-Wasser resuspendiert. Die quantitative RNA-Messung erfolgte nach 1:50 Verdünnung (2 μ l RNA/98 μ l DEPC-Wasser) im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die RNA-Konzentration (μ g/ml) errechnete sich aus der optischen Dichte bei 260 nm, der Verdünnung und einem RNA-spezifischen Multiplikationsfaktor.

mRNA-Isolierung

Für die mRNA-Isolierung wurde ein Oligotex-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip beruht auf der Haftung der RNA an mit Oligo-dT beschichteten Partikeln aus Polystyren-Latex, die spezifisch an polyA⁺ Bereiche der mRNA hybridisieren. Nach Bindung der mRNA auf einer Säule wird diese gereinigt, wieder von den Partikeln gelöst und mit RNase freiem Wasser eluiert.

Es wurden je 100 μ g RNA eingesetzt. Die nötige Menge an RNA-Lösung wurde zunächst mit RNase freiem Wasser auf 250 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 250 μ l OBB-Puffer (20 mM

2 Material und Methoden

Tris-Cl, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% SDS) und 15 µl Oligotex-Suspension (10% (1 mg/10 µl) Oligotex-Partikel in 10 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS 0,1% NaN₃) wurden die Proben gemischt und zunächst für 3 min bei 70 °C im Heizblock, anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (2 min, 14500x g) bildete sich ein Pellet, das nach Entfernen des Überstandes in 400 µl OW2-Puffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert wurde. Im Kit enthaltene Säulen wurden mit den Proben beladen und zentrifugiert (1 min, 14500x g). Der Durchlauf wurde verworfen und der Vorgang mit je 400 µl OW2-Puffer wiederholt. Die Elution der mRNA erfolgte mit 18 µl des bei 70 °C im Heizblock erhitzten OEB-Puffers (5 mM Tris-HCl). Nach Zentrifugation (1 min, 14500x g) wurde noch einmal mit 10 µl der durchgelaufenen mRNA-Lösung eluiert und erneut zentrifugiert. Das Eluat wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

DNA-Synthese

Die Synthese der cDNA aus der isolierten mRNA erfolgte mit einem Omniscript-Kit (Qiagen, Hilden). Das Endvolumen jeder Probe betrug 21 µl, zur Zusammensetzung siehe Tab. 2.27. Die Proben wurden gemischt, anzentrifugiert und im PCR-Cycler für 1 h bei 37 °C inkubiert.

10x Puffer	2 µl
dNTP Mix (5 mM je dNTP)	2 µl
Oligo-dT Primer (10 µM; 0,5 µg/µl; Invitrogen, Karlsruhe)	2 µl
RNase-Inhibitor (40 units/µl; Invitrogen, Karlsruhe)	1 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl
mRNA.	13 µl

Tab. 2.27: Pipettieransatz cDNA-Synthese, Nested Touchdown-PCR

Nested Touchdown-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA. Der Prozess besteht aus 25-50 Zyklen. Diese beginnen jeweils mit der Denaturierung der DNA durch Erhitzen, gefolgt von der Anlagerung spezifischer Primer an die einzelnen DNA-Stränge (Primerhybridisierung) nach Absenken der Temperatur auf 2-3 °C unter den Schmelzpunkt der eingesetzten Primer (Annealing-Temperatur). Im Elongationsschritt füllt die DNA-

2 Material und Methoden

Polymerase schließlich die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Die Amplifikation der cDNA erfolgt exponentiell.

Für die Amplifizierung der 1 α OHase-DNA wurde eine etablierte und bereits im Vorfeld publizierte Nested-Touchdown-PCR (Diesel et al., 2004) eingesetzt. Die Nested-PCR erhöht die Spezifität der PCR: Nach einem ersten Programm (hier 10 Zyklen) und anschließender Aufreinigung des PCR-Produktes werden in einem zweiten Programm (hier 12 + 18 Zyklen) neue Primer eingesetzt. Diese binden weiter innen im DNA-Abschnitt des zu amplifizierenden Gens als die ersten Primer, so dass nur noch die spezifischen DNA-Abschnitte des ersten Programms amplifiziert werden. Die Touchdown-PCR erhöht die Spezifität der Primerbindung dadurch, dass die Annealing-Temperatur pro Zyklus an die zu erwartende Schmelztemperatur des Primers angenähert wird. Im ersten Zyklus liegt sie über dem zu erwartenden Schmelzpunkt und wird dann in den folgenden Zyklen um jeweils 1-2 °C bis zu dessen Unterschreitung gesenkt.

- PCR 1
 - 96 °C, 30 sec
 - 94 °C, 10 sec
 - 62 °C, 20 sec
 - 68 °C, 4 min, 10 Wdh. der Zyklen 1-4
 - 68 °C, 20 min
 - 4 °C
- PCR 2
 - 96 °C, 30 sec
 - 94 °C, 10 sec
 - 68 °C*, 20 sec; *-0,5 °C je Zyklus
 - 68 °C, 4 min; 12 Wdh. der Zyklen 1-3
 - 94 °C, 10 sec
 - 62 °C, 20 sec; 18 Wdh. der Zyklen 4-6
 - 68 °C, 4 min
 - 68 °C, 20 min
 - 4 °C

In beiden PCRs betrug das Endvolumen jeder Probe 50 μ l, die Zusammensetzung geht aus

2 Material und Methoden

Tab. 2.28 hervor.

10x Puffer (500 mM Tris-HCl, 150 mM (NH ₄)SO ₄ , 25 mM MgCl ₂ , 1% Tween 20)	5 µl
dNTPs	2,5 µl (5 mM)
Primer 1	5 µl (6 µM)
Primer 2	5 µl (6 µM)
HPLC-Wasser	25 µl
cDNA (PCR 1) bzw. aufgereinigtes PCR-Produkt (PCR 2)	5 µl
Red Accu Taq LA DNA-Polymerase (SIGMA, Taufkirchen) (1unit/µl mit jeweils 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Tween 20, 0,5% IGEPAL CA-630, 50% Glycerol)	2,5 µl

Tab. 2.28: Pipettieransatz Nested Touchdown-PCR

Folgende Primer (Metabion, Martinsried) wurden eingesetzt:

- PCR 1
 - Forward: 5'-GGA GAA GCG CTT TCT TTC G-3'
 - Reverse: 5'-TGG GGC AAA CCC ACT TAA TA-3'

- PCR 2
 - Forward: 5'-CAG ACC CTC AAG TAC GCC-3'
 - Reverse: 5'-AAA CCA GGC TAG GGC AGA TT-3'

Für die Aufreinigung des PCR-Produktes zwischen den einzelnen PCR-Programmen wurde das Nucleospin Extract 2-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wird die cDNA an eine Silicia-Membran der im Kit enthaltenen Säulen gebunden, mithilfe eines Waschpuffers aufgereinigt und anschließend eluiert.

Zunächst wurden jeweils die 50 µl PCR-Produkt mit 200 µl NT-Puffer und 50 µl NE-Elutionspuffer (5 mM Tris/HCl, pH 8,5) gemischt, die Proben in die Säulen transferiert und diese zentrifugiert (1 min, 11000x g); der Durchlauf wurde verworfen. Das Waschen der Silicia-Membran erfolgte mit je 600 µl NT3-Puffer, wobei nach erster Zentrifugation (1 min,

2 Material und Methoden

11000x g) der Durchlauf verworfen und der Waschpuffer durch eine zweite Zentrifugation (2 min, 11000x g) vollständig entfernt wurde. Die Säulen wurden in neue Eppendorfgläser transferiert, mit je 50 µl NE-Puffer versetzt, 1 min bei RT inkubiert und zentrifugiert. Das erhaltene aufgereinigte Produkt wurde in der zweiten PCR eingesetzt.

Vom endgültigen PCR-Produkt wurden 5-20 µl in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei dieser Methode wandern die zu trennenden Moleküle unter Einfluss eines elektrischen Feldes unterschiedlich schnell durch ein Gel, wobei die Geschwindigkeit umso höher ist, je kleiner und negativ geladener die Moleküle sind. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose durch Aufkochen in 1x TBE-Puffer gelöst. Anschließende Zugabe von 6 µl Ethidiumbromid, einem roten Phenanthridin-Farbstoff, machte die cDNA unter ultraviolettem Licht sichtbar. Zusätzlich wurde ein Marker aufgetragen, um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmen zu können. Das Gel wurde in eine ionische Pufferlösung (1x TBE) eingebettet und für vier Stunden bei 75 V angeschlossen. Fotografiert wurde das Gel mit einer Polaroid-Kamera unter UV-Licht.

2.2.4 Western Blot

Beim Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf eine Trägermembran übertragen. Die Auftrennung der Proteingemische fand in einem Polyacrylamid-Gel durch die Technik der Gelelektrophorese (siehe Agarose-Gelelektrophorese) statt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine hängt im Wesentlichen von ihrer Größe, Masse und Ladung ab. Der bei der Herstellung der Proteinlysate verwendete Lämmli-Puffer enthält SDS (Natriumdodecylsulfat), das sich an Proteine anlagert und diese denaturiert. Es entstehen Komplexe, die durch die Sulfatgruppen des SDS eine gleichmäßige negative Ladung aufweisen; dadurch war die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur noch von ihrer relativen Molekülmasse abhängig. Über dem Trenngel befand sich ein Sammelgel mit Taschen, in die die Proteingemische geladen wurden. Das Sammelgel wies einen anderen pH-Wert und größere Poren als das Trenngel auf, wodurch die Proteine schneller und ohne Auftrennung als scharfe Banden liefen. Im Trenngel verringerte sich die Laufgeschwindigkeit dann abhängig von der Molekülgröße. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte elektrophoretisch, wobei das elektrische Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt wurde. Gel und Membran wurden dabei, von Filterpapier und Filtermatten sandwichartig eingerahmt, zwischen die Elektroden eingespannt. Das Filterpapier diente als

2 Material und Methoden

Ionenreservoir. Der Transfer fand für 2 h bei 300 mA in einem 1xTransferpuffer statt. Methanol im Puffer entfernt das SDS von den Proteinen, wodurch diese renaturieren und stärker an die Membran binden. Die Bindung erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Das durch die Auftrennung entstandene Muster wurde beim Transfer auf die Membran erhalten. Nach dem Transfer wurden zunächst unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch Milch blockiert. Es folgten die Inkubation mit dem in Milch verdünnten Primär-Antikörper und daran anschließend mehrere Waschschriffe (3x 20 min) in 1x PBS + 0,1% Tween 20, um überschüssigen und unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Horseradishperoxidase (HRP)-Konjugation des gegen den Primär-Antikörper gerichteten Sekundär-Antikörpers ermöglichte die Detektion und Visualisierung der gesuchten Bande. In der Chemolumineszenzlösung enthaltenes Luminol wird durch HRP oxidiert. Dabei wird Licht emittiert, das über einen Chemolumineszenzfilm detektiert wird und so die Proteinbanden sichtbar macht.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Von den aus Zellen und Gewebe gewonnenen Proteinen wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay mit einem Kit der Firma Pierce bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf der Biuret-Reaktion von Peptiden und Proteinen mit Kupfer-Ionen, aus der ein roter Farbkomplex hervorgeht. Die Farbintensität ist proportional der Proteinkonzentration und wurde im Photometer bei 560 nm gemessen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Verhältnis zu einer Standardreihe, die durch Verdünnung einer Albumin-Stammlösung (2 mg/ml) hergestellt wurde und die Konzentrationen 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml beinhaltete. Auf eine Microtiterplatte wurden erst vom Standard und von den 1:10 verdünnten Proteinproben je 25 µl in dreifacher Bestimmung pipettiert und im Anschluss mit je 200 µl der BCA-Lösung versetzt. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und danach für 2 min bei RT equilibriert. Die Extinktion wurde bei 560 nm im Photometer gemessen und die Proteinkonzentrationen nach linearer Regressionsanalyse der Standardkurve bestimmt.

Gießen und Laden der Gele

Die gereinigten Glasscheiben wurden übereinandergelegt (Abstand 1 mm), seitlich durch Klammern fixiert und in einem vorgesehenen Ständer befestigt, so dass sie nach unten hin

2 Material und Methoden

durch Gummipplatten abgedichtet waren. Zur Zusammensetzung des Trenngels (12,5%) siehe Tab. 2.29.

Acrylamid 30%	2,08 ml
4x Puffer (1,5 M TrisCl, pH 8,8)	1,25 ml
H ₂ O	1,56 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	30 µl
TEMED	10 µl

Tab. 2.29: Zusammensetzung Trenngel (12,5%)

Das Gel wurde bis ca. 2cm unter den später einzusetzenden Kamm gegossen und mit Isopropanol beschichtet, um die Gele mit den verschiedenen pH-Werten zu trennen. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde der Alkohol abgesaugt, das Sammelgel gegossen und der Kamm umgehend eingesetzt. Zur Zusammensetzung des Sammelgels (4%) siehe Tab. 2.30.

Acrylamid 30%	0,27 ml
4x Puffer (0,5 M TrisCl, pH 6,8)	0,5 ml
H ₂ O	1,19 ml
10% SDS	20 µl
10% APS	10 µl
TEMED	5 µl

Tab. 2.30: Zusammensetzung Sammelgel (4%)

PAGE

Für die Elektrophorese wie auch für den späteren Transfer wurde das Bio-Rad Power Pac (Bio-Rad, München) verwendet. Die Glasscheiben wurden im Gelhalter fixiert und in den mit 1x-Laufpuffer gefüllten Geltank eingebaut. Je 20 µg Protein wurden mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und mit 5 µl eines 4x Ladepuffers versetzt. Das darin enthaltene 2-Mercaptoethanol bewirkt eine zusätzliche Spaltung von Disulfidbrücken. Nach Mischen durch Vortexen wurden die Proteine für 5 min bei 96 °C im Heizblock denaturiert, anschließend wurden je 15 µl in die Taschen pipettiert. In die erste Tasche wurden 10 µl eines Markers aufgetragen,

der aus gefärbten Proteinen verschiedener Größen bestand und der späteren Zuordnung der aufgetrennten Proteine diente. Zunächst wurde eine Spannung von 65 V angelegt, bis die Proben durch das Sammelgel gewandert waren; durch Erhöhung der Spannung auf 110 V wurden die Proteine aufgetrennt.

Blotten

Das Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und, beiderseits mit einem Filterpapier und einer Filtermatte abgedeckt, in die Gelhalter-Kassette eingespannt. Der Zusammenbau sowie der anschließende Transfer wurden in 1xTransferpuffer durchgeführt. Der Transfer erfolgte bei 300 mA für 2 h; zur Reduktion der dabei entstehenden Hitze wurde die Kassette in einen Behälter mit Eis gestellt. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Milch inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren.

Markierung der Membran mit Antikörpern

Die Primär-Ak gegen die 1 α OHase bzw. gegen die 24OHase wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:2000 in 5%iger Blockmilch auf die Membran gegeben. Die Sekundär-Ak-Konzentration war sowohl zwischen 1 α OHase und 24OHase als auch für die verschiedenen Zelllinien und Gewebeproteine verschieden.

Die Inkubation mit dem Primär-Ak erfolgte bei leichtem Schütteln bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde nach 5 min Waschen in PBS + 0,1% Tween 20 der Sekundär-Ak in Blockmilch verdünnt und für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen (3x 20 min) und anschließend für 5 min mit ECL-Lösung beschichtet. Für die Entwicklung wurden die Membranen zwischen zwei Folien gelegt und Filme für mindestens zwei unterschiedliche Zeiten in der Dunkelkammer aufgelegt. Anschließend wurden die Ak mit Hilfe von Reblot-Lösung wieder von der Membran entfernt, um in einem nächsten Schritt das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen β -Aktin nachzuweisen. Dieses nicht regulierte Protein diente dem Abgleich der tatsächlich aufgetragenen Proteinmenge. Die Inkubation mit den Ak erfolgte dabei nacheinander jeweils für 1 h bei RT, wobei der Primär-Ak 1:20000 und der Sekundär-Ak 1:10000 in Milch verdünnt wurde. Die Membranen wurden gewaschen und die Filme wie oben beschrieben entwickelt.

Quantitative Auswertung

Im Vorfeld der statistischen Auswertung wurde eine biometrische Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik (IMBS) der Universität zu Lübeck in Anspruch genommen.

Es wurde eine quantitative Auswertung der im Western Blot erhaltenen Signale relativ zu β -Aktin durchgeführt und die Expressionsstärken zwischen malignem und benignem Gewebe bzw. zwischen den untersuchten malignen Zelllinien und benignen GLZ verglichen. Zunächst wurde dazu mit Hilfe des Computer-Programms E.A.S.Y Win32 (Herolab, Wiesloch) die Pixeldichte einzeln ausgewählter Banden sowie der jeweils entsprechenden β -Aktin Bande bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Programms GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Der Vergleich von malignem und benignem Gewebe wurde mit einem t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Dieser Test ist für die Analyse zweier voneinander unabhängiger Messreihen geeignet, wenn die Zielvariable - hier die Expression eines Enzyms – stetig und normalverteilt ist.

Die Ergebnisse der Zelllinien wurden untereinander mit Hilfe des One Way ANOVA Tests, mit dem mehr als zwei Probengruppen miteinander verglichen werden können, analysiert. Dabei wurde der Dunnett's Test als Post-Test ausgewählt, wobei die benignen GLZ die standardisierte Kontrollgruppe darstellten und die untersuchten malignen Zelllinien einzeln mit dieser verglichen wurden. Bei beiden angewandten Verfahren wurde zweiseitig mit einem p-Wert von 0,05 getestet.

2.2.5 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie werden bestimmte Antigene im histologischen Schnitt durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht. Dabei bindet der Primär-Ak nach vorheriger Blockierung unspezifischer Bindungsstellen an das gesuchte Antigen und wird anschließend durch einen HRP-konjugierten Sekundär-Ak sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 2.2.4).

Um die Empfindlichkeit des Nachweises zu erhöhen, wird die Streptavidin-Biotin-Methode eingesetzt, bei der die starke Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) bzw. Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) für das Vitamin Biotin genutzt wird. Der Sekundär-Ak ist an Biotin gekoppelt, hieran bindet Avidin mit wiederum drei weiteren Biotinbindungsstellen. Diese

2 Material und Methoden

dienen HRP zur Bindung, das mittels H_2O_2 das im Anschluss zugegebene 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in ein rötlich-braunes Endprodukt umwandelt. Die vorherige Inkubation mit H_2O_2 dient der Blockierung unspezifischer Peroxidasen des Gewebes. Die Gegenfärbung mit Hämalaun färbt Zellkerne blau, so dass positive Reaktionen in rötlich-braun (DAB) mit blauen Kernen erscheinen. Zellen ohne das gesuchte Antigen werden durch ausschließlich blau gefärbte Zellkerne detektiert.

Die Gewinnung von Gewebeproben für die immunhistochemische Färbung entspricht dem Vorgehen wie in 2.2.2.3 beschrieben. Die Gewebestücke wurden in heißem Paraffinwachs getränkt, um dünne und gleichmäßige Schnitte herstellen zu können. Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, wurde das Gewebe zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Der Alkohol wurde mithilfe von Xylol entfernt und durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Die zu Paraffinblöcken verarbeiteten Gewebeproben wurden nach Erkalten des Paraffins mithilfe eines Schlittenmikrotoms zu 4 μm dicken Schnitten verarbeitet. In einem Warmwasserbad wurden die Schnitte gestreckt und von Falten befreit und anschließend auf fettfreie und saubere Objektträger aufgezogen, welche in einem Brutschrank bei 37 °C getrocknet wurden.

Als Vorbereitung für die immunhistochemische Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert. Dazu wurden sie mithilfe eines Objektträger-Halters nacheinander in Küvetten mit verschiedenen Lösungen eingetaucht:

- 2x 5 min in frisches Xylol
- 2x 5 min in Isopropylalkohol 100%
- 2x 5 min in Ethanol 96%
- 2x 5 min in Ethanol 70%
- 2x 5 min in Aqua dest.
- 2x 5 min in PBS Puffer

Im Anschluss daran wurden die Objektträger in einer Küvette vollständig mit Citratpuffer zur Antigendemaskierung bedeckt. Der Puffer wurde mitsamt den Objektträgern in der Mikrowelle 3x 5 min aufgeköcht, wobei verdunsteter Puffer nach dem Aufkochen mit Aqua dest. aufgefüllt wurde. Nach einer Abkühlungszeit von ca. 20 min wurden die Objektträger in Küvetten zunächst mit Aqua dest. und anschließend für 3x 5min mit jeweils erneuertem 1x PBS gespült. Das Normalserum wurde 1:80 in 1x PBS verdünnt und die Schnitte zur

2 Material und Methoden

Blockierung unspezifischer Ak-Bindungen für 20 min bei RT mit der Lösung inkubiert. Die Blockierlösung wurde dekantiert und die Schnitte anschließend mit dem 1:1000 verdünnten Primär-Ak über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Ak wurde dabei in einer Ak-Verdünnungslösung mit Hintergrund reduzierenden Komponenten verdünnt. Als Negativkontrolle wurde je Färbung ein Schnitt ausschließlich mit dieser Lösung ohne Primär-Ak inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend 3x 5 min mit 1x PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit einer Peroxidase-Lösung (3% H₂O₂ in PBS) blockiert. Nach einem weiteren Waschvorgang von 3x 5 min mit 1x PBS wurden die Schnitte mit dem Sekundär-Ak in einer Verdünnung von 1:1000 für 30 min bei RT inkubiert. Es wurde wiederholt 3x 5 min mit 1x PBS gewaschen und die Schnitte anschließend mit HRP-markiertem Streptavidin nach Herstellerangaben für 30 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde 30 min vor Gebrauch angesetzt, um ein vollständiges Vermischen der einzelnen Komponenten zu gewährleisten. Es folgten weitere Waschschrte, zunächst 3x 5 min mit 1x PBS, gefolgt von 1x 30 sec mit PBS + 0,25% Triton X-100. Triton X-100 macht Membranen porös und den Waschschrte dadurch effizienter. Die Schnitte wurden mit DAB bedeckt und für 20 min bei RT inkubiert, 3x mit Aqua dest. gewaschen und im Anschluss mit Hämatoxyllin nach Meyer für 7 min gegengefärbt. Nach einem Waschschrte mit Aqua dest. wurden die Schnitte für 20 min unter laufendem Wasser gebläut. Die Dehydrierung erfolgte durch Eintauchen der Objektträger in Küvetten mit verschiedenen Lösungen. Zunächst wurden sie je 2x 10 sec in eine Küvette mit 96% Ethanol und 100% Ethanol gestellt, bevor sie in einer Küvette mit Xylol bis zur Einbettung verblieben. Für diesen letzten Schrrte wurden die Schnitte mit Eukitt beschichtet und eingedeckelt.

2.2.6 Real Time-PCR

Bei der Real Time-PCR werden Nukleinsäuren nach dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion amplifiziert, um eine quantitative Aussage über die Expression eines bestimmten Gens machen zu können. Zur relativen Quantifizierung wird zusätzlich ein Referenz-Gen, hier Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT), bestimmt, um die Menge der eingesetzten cDNA zu überprüfen und Schwankungen zwischen den einzelnen Proben zu detektieren. Die Expression des zu untersuchenden Gens wird also auf die eines zweiten, konstitutiv exprimierten Gens bezogen. Diese interne Kontrolle wird als Normalisierung bezeichnet.

Bei der Real Time-PCR wird total RNA direkt in cDNA umgeschrieben und diese durch Fluoreszenzmessung während eines Zyklus quantifiziert. Dabei wird ein DNA-Farbstoff eingesetzt, der in die DNA interkaliert und sie dadurch sichtbar macht. Die Stärke der Fluoreszenz nimmt im Laufe der DNA-Amplifikation proportional der DNA-Menge zu. Nach Beendigung der PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Qualität der PCR beurteilen zu können. Die Temperatur wird kontinuierlich erhöht, bis die Doppelstrang-DNA aufbricht und der fluoreszierende Farbstoff freigesetzt wird. Nach einem Fluoreszenz-Peak, der zur Quantifizierung herangezogen wird, kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Spezifische Primerdimere haben eine höhere Schmelztemperatur als unspezifisch gebildete Dimere und lassen sich somit von diesen unterscheiden.

Auswertung der Real Time-PCR

Die Berechnung erfolgt im Anschluss mithilfe des $\Delta\Delta CP$ - Berechnungsmodells (Livak und Schmittgen, 2001). Der Wert am sogenannten Crossing Point (CP) entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die zum Erreichen eines konstant definierten Fluoreszenzniveaus nötig ist. Die DNA-Menge aller Proben ist zu diesem Zeitpunkt identisch. Beim $\Delta\Delta CP$ -Berechnungsmodell wird zunächst der CP-Wert des Referenzgens vom CP-Wert jeder einzelnen Probe subtrahiert, man erhält den ΔCP -Wert. Man berechnet im Anschluss den $\Delta\Delta CP$ -Wert, indem der ΔCP -Wert einer Kontroll-Probe (z. B. der Wert einer unbehandelten im Gegensatz zu einer experimentell behandelten oder der einer benignen im Vergleich zu einer malignen Probe) bestimmt und dieser vom ersten ΔCP -Wert subtrahiert wird. Werden mehrere Proben einer Kategorie einbezogen, wird aus den einzelnen Ergebnissen der Kontrollproben ein Mittelwert gebildet und die einzelnen Werte der damit zu vergleichenden Proben dazu in Bezug gesetzt. Schließlich berechnet man den relativen Expressionsunterschied (die Ratio) zwischen den Proben und Kontrollproben in Bezug auf eine Standardprobe und in Normalisierung zum Referenzgen. Dazu dient die Formel: $2^{-\Delta\Delta CP}$. Dabei sagt die Ziffer 2 aus, dass eine Effizienz von 100%, also eine Verdopplung der DNA nach jedem PCR-Zyklus, vorausgesetzt wird. Diese optimale Effizienz wird praktisch nicht erreicht, unter optimalen Versuchsbedingungen wird ein Wert zwischen 1,7 und 1,9 erzielt. Zur Ermittlung der tatsächlich gegebenen Effizienz existieren verschiedene Berechnungsmodelle. Meist wird anhand einer cDNA-Verdünnungsreihe eine Standardkurve erstellt, die die eingesetzte Menge an cDNA der nötigen Zyklenzahl zum Erreichen des CP-Wertes in einer logarithmischen Funktion gegenüberstellt. Die Effizienzberechnung erfolgt mithilfe der Formel: $E=10^{(-1/Steigung)}$. Die Methode ist aufwendig, berücksichtigt keine

2 Material und Methoden

probenindividuellen Unterschiede und führt häufig zu sehr hohen, unplausiblen Effizienzwerten. Eine Standardkurve oder ein anderes Verfahren zur Effizienzberechnung wurde bei der hier durchgeführten Real Time-PCR nicht herangezogen.

DNA-Synthese

Vor Durchführung der Real Time-PCR wurde die RNA mit dem Kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben, wobei jede Probe 2 µg RNA enthielt. Der pipettierte Ansatz geht aus Tab. 2.31 hervor.

RNA	2 µg, mit HPLC-Wasser ad 10 µl
Random Primer (3 µg/µl; 3 mM Tris-HCl pH 7,0; 0,2 mM EDTA)	1 µl

Tab. 2.31: Pipettieransatz cDNA-Synthese Real Time-PCR (1)

Die Proben wurden durch Vortexen gemischt, kurz zentrifugiert und für 10 min bei 70 °C im PCR-Cycler inkubiert. Die Zugabe der weiteren Reagenzien erfolgte durch je 8 µl eines Mastermixes. Die Zusammensetzung geht aus Tab 2.32 hervor.

5x Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)	4 µl
0,1M DTT	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
RNase-Inhibitor (40 units/µl)	1 µl

Tab. 2.32: Pipettieransatz cDNA-Synthese Real Time-PCR (2)

Die Proben wurden gemischt und nach kurzer Zentrifugation im Cycler inkubiert (25 °C für 10 min, 42 °C für 2 min). Nach anschließender Zugabe von 1 µl SuperScript II Reverse Transcriptase wurde erneut im Cycler inkubiert (42 °C für 50 min, 70 °C für 15 min) und die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Als Negativkontrolle wurde in einer Probe das Enzym durch 1 µl HPLC-Wasser ersetzt.

Für die Real Time-PCR wurde das Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der in diesem Kit enthaltene zweifach konzentrierte Super-Mix enthält: SYBR Green I Fluoreszenzlösung; 60 U/ml Platinum Taq DNA Polymerase; 40 mM

2 Material und Methoden

Tris-HCl (pH 8,4); 100 mM KCl; 6 mM MgCl₂; 400 μM dGTP; 400 μM dATP; 400 μM dCTP; 400 μM dUTP; 40 U/ml UDG; Stabilisatoren

Der Mix enthält dUTP anstelle von dTTP, so dass in der Real Time-PCR Uracil bei der Amplifikation des Zielgens in alle PCR-Produkte eingebaut wird. Das ebenfalls enthaltene Enzym UDG (Uracil-N-Glycosylase) verhindert ein Verschleppen von DNA aus früheren Zyklen (sog. Carry-over-Kontamination) durch einen spezifischen Abbau der Uracil-haltigen DNA. Nach diesem Schritt der Dekontamination wird die hitzelabile UDG durch hohe Temperaturen zerstört und dadurch die Amplifizierung der Zielsequenz unter Einbau von dUTP ermöglicht.

Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug jeweils 25 μl, zur Zusammensetzung siehe Tab. 2.33.

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	12,5 μl
cDNA	2 μl
10 mM Primer	1 μl
HPLC	9,5 μl

Tab. 2.33: Pipettieransatz Real Time-PCR

Folgende Primer wurden eingesetzt:

- 1αOHase forw. 5'-TGT TTG CAT TTG CTC AGA -3'
- 1αOHase rev. 5'- CCG GGA GAG CTC ATA CAG- 3'
- 24OHase forw. 5'-ATT CAC CCA GAA CTG TTG -3'
- 24OHase rev. 5'-GCA GCC TAG TGC AGA TTT -3'
- HPRT forw. 5'-CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT -3'
- HPRT rev. 5'-CCA GCA GGT CAG CAA AGA ATT TA -3'

Die Proben wurden in Hard-Shell 96-Well-Microplatten pipettiert und in den Real Time-PCR-Cycler gestellt. Die PCR-Programme für die zu untersuchenden Gene bestanden aus folgenden Zyklen:

- 24OHase
 - 50 °C, 2 min
 - 95 °C, 2 min
 - 95 °C, 15 sec
 - 57,3 °C, 15 sec
 - 72 °C, 15 sec
 - Fluoreszenzmessung, 49 Wdh. der Zyklen 1-6
 - 50 °C, 1 sec
 - Schmelzkurvenanalyse von 65 °C bis 95 °C, Messung nach je 0,5 °C für 1 sec

- HPRT
 - 50 °C, 2 min
 - 95 °C, 2 min
 - 95 °C, 15 sec
 - 60 °C, 15 sec
 - 72 °C, 15 sec
 - Fluoreszenzmessung, 39 Wdh. der Zyklen 1-6
 - 50 °C, 1 sec
 - Schmelzkurvenanalyse von 65 °C bis 95 °C, Messung nach je 0,3 °C für 1 sec

2.2.7 Klonierung und Sequenzierung von 1 α OHase-Splice-Varianten aus Zellen und Gewebe

Die Klonierung ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem eine zu untersuchende DNA-Sequenz mithilfe eines Vektors in eine Wirtszelle transformiert wird, um sie durch das schnelle Wachstum der Wirtszelle stark vermehren und anschließend untersuchen zu können. Durch die Sequenzierung ausgewählter Klone kann festgestellt werden, ob und in welcher Form die DNA-Sequenz des untersuchten Gens verändert ist. Die typische Wirtszelle ist ein Stamm des Bakteriums *Escherichia coli* (E.coli). Der Vektor, ein aus Bakterien gewonnenes

2 Material und Methoden

Plasmid, dient als Transportvehikel zur Einschleusung des zu untersuchenden Gens in die Wirtszelle.

Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der darin enthaltene, linearisierte Vektor PCR 4-TOPO enthält einen 3'-Desoxy-Thymidin-Überhang, komplementär zu einem an das PCR-Produkt angehängten 3'-Desoxy-Adenosin-Überhang. Der Vektor enthält für diese Ligation zusätzlich eine Topoisomerase, die das Phosphodiester-Rückgrat der Doppelstrang-DNA nach einer 5'-CCCTT-Sequenz spaltet und sich mithilfe der dabei freigesetzten Energie zunächst kovalent an den 3'-Phosphatrest bindet. Die entstandene Bindung kann durch einen 5'-Hydroxylrest des DNA-Stranges angegriffen und die Topoisomerase wieder freigesetzt werden. Daraus resultiert eine kovalente Bindung zwischen PCR-Produkt und Vektor, ohne dass hierfür die Aktivität einer Ligase notwendig ist.

PCR

Im Vorfeld der Klonierung wurden ein LB-Medium (engl. lysogeny broth) für die spätere Kultivierung der Bakterienkolonien und LB-Agar zum Gießen von Agarplatten unter Verwendung spezifischer Kapseln hergestellt. Dabei wurden für das Medium 25 Kapseln in 1l Aqua dest., für den Agar 40 Kapseln in 1l Aqua dest. gegeben und die Lösungen für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlung auf RT wurde jeweils 0,1% Kanamycin zugegeben. Der Agar wurde in Petrischalen gegossen und nach vollständiger Polymerisation bei 4 °C gelagert. Die Lagerung erfolgte grundsätzlich mit dem Deckel nach unten, damit entstandenes Kondenswasser nicht auf den Agar tropfen konnte. Das Medium wurde ebenfalls bei 4 °C gelagert.

Durch Auswertungen vorhandener PCR-Bilder wurden Proben der Zelllinien und Gewebe ausgesucht, deren Bandenmuster nach im Vorfeld durchgeführter PCR die Detektion möglicher Splice-Varianten des 1 α OHase -Gens erwarten ließen. Aus der bei -20 °C gelagerten cDNA wurde die Nested Touchdown-PCR inklusive der Aufreinigung zwischen den PCR-Programmen wie oben beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.3). Die anschließenden Versuchsschritte wurden durchgeführt, ohne das erhaltene PCR-Produkt bei -80 °C zwischenzulagern.

2 Material und Methoden

Von den 50 µl PCR-Produkt wurden 10 µl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 75 V vier Stunden aufgetrennt, um die Amplifikation des zu klonierenden DNA-Fragments sicherzustellen. 20 µl der restlichen 40 µl wurden mit dem Nucleospin Extract 2-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für die Elution wurden entsprechend 20 µl des Elutionspuffer eingesetzt. Der Vorgang wurde mit dem erhaltenen Eluat wiederholt. Die zur Elution erforderliche Inkubationszeit nach Zugabe des Elutionspuffers wurde jeweils auf 5 min bei RT erhöht, um die Effizienz zu steigern. Die nicht aufgereinigten 20 µl des PCR-Produktes wurden auf Eis gelagert. Dieses Verfahren sollte dazu dienen, durch den Vergleich der späteren Resultate die Notwendigkeit und Effizienz der Aufreinigung zu überprüfen.

Parallel zur Nested Touchdown-PCR wurde eine Kontroll-PCR mithilfe des TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Endvolumen betrug 50 µl, zur Zusammensetzung siehe Tab. 2.34.

Kontroll-DNA (0,1 µg/µl in TE-Puffer, pH 8,0)	1 µl
10x Puffer aus Taq Polymerase	5 µl
50 mM dNTPs (je 12,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; in Wasser zu pH 8,0 neutralisiert)	0,5 µl
Kontroll PCR-Primers (0,1 µg/µl each in TE-Puffer, pH 8,0)	1 µl
HPLC-Wasser	41,5 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/ml)	1 µl

Tab. 2.34: Pipettieransatz Klonierung, Kontroll-PCR

Die PCR bestand aus folgenden Zyklen:

- 94 °C, 2 min
- 94 °C, 1 min
- 55 °C, 1 min
- 72 °C, 1 min; 25 Wdh. der Zyklen 1-4
- 72 °C, 7 min
- 4 °C

Das PCR-Produkt wurde im Agarosegel überprüft. Als Negativkontrolle wurde bei beiden PCRs das DNA-Template durch steriles Wasser ersetzt.

A-Overhang

Dieser Schritt wurde von jeder Probe jeweils mit aufgereinigtem und nicht aufgereinigtem PCR-Produkt sowie mit dem Produkt der Kontroll-PCR durchgeführt. Der Ansatz wurde pipettiert wie in Tab. 2.35 beschrieben.

PCR-Produkt	16,5 µl
10x Puffer aus Taq Polymerase	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/ml)	0,5 µl

Tab. 2.35: Pipettieransatz Klonierung, A-Overhang

Die Ansätze wurden im PCR-Cycler für 20 min bei 72 °C inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Ligation

Für die Ligation des Vektors an das PCR-Produkt wurde das TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet. Die Ansätze der Proben bestanden aus je 6 µl, zur Zusammensetzung siehe Tab. 2.36.

PCR-Produkt	4 µl
Salz-Lösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1 µl
Vektor pCR 4-TOPO (10 ng/µl Plasmid-DNA in 50% Glycerol; 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,1% Triton X-100; 100 µg/ml BSA; 30 µM Phenolrot)	1 µl

Tab. 2.36: Pipettieransatz Klonierung, Ligation

Für die Ligation der Kontroll-PCR wurde ein Ansatz hergestellt, wie in Tab. 2.37 beschrieben.

Aqua dest., DNase und RNase frei	3 µl
Salz-Lösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1 µl
PCR-Produkt	1 µl

2 Material und Methoden

Vektor pCR 4-TOPO	1 μ l
-------------------	-----------

Tab. 2.37: Pipettieransatz Klonierung, Ligation Kontroll-PCR

Als Negativkontrolle für die Ligation wurde der linearisierte Vektor ohne PCR-Produkt eingesetzt, zur Zusammensetzung siehe Tab. 2.38.

Aqua dest, DNase und RNase frei	4 μ l
Salz-Lösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1 μ l
Vektor pCR 4-TOPO	1 μ l

Tab. 2.38: Pipettieransatz Klonierung, Ligation Negativkontrolle

Die Proben wurden gemischt, für 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Die bei -80 °C gelagerten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, anschließend wurden 2 μ l jedes Ligationsansatzes in die Bakteriensuspension transferriert, diese gemischt und 30 min auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden für 30 sec in einem Heizblock bei 42 °C inkubiert und im Anschluss für 5 min auf Eis gestellt. In jede Bakteriensuspension wurden 250 μ l eines S.O.C.-Mediums (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) gegeben und im Heizblock bei 37 °C bei 300 U/min für 1 h inkubiert. In der Zwischenzeit wurden je 40 μ l 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) mithilfe eines Drigalskispatels auf die Agarplatten ausplattiert. Diese Substanz dient durch ein Blau-Weiß-Screening der Überprüfung, ob das PCR-Produkt mithilfe des Vektors in die Bakterienplasmide integriert wurde. Dabei stellt das β -Galaktosidase-Gen (lacZ) der Bakterien ein Markergen dar, dessen Ausprägung bei Insertion eines DNA-Fragmentes gestört ist, wodurch im Plasmid keine funktionelle β -Galaktosidase mehr gebildet werden kann. Die Aktivität der β -Galaktosidase ist auf den Platten durch den Indikator X-Gal nachweisbar, da das Enzym die Substanz unter Freisetzung der blauen Substanz Indigo spaltet. Blaue Bakterienkolonien enthalten demnach ein Plasmid ohne kloniertes DNA-Fragment, Bakterien mit enthaltenem rekombinantem Plasmid sind durch das X-Gal auf den Platten weiß und für weitere Untersuchungen geeignet.

Der Drigalskispatel wurde zur Sterilisation in ein Becherglas mit 70%igem Ethanol gestellt, kurz in die Flamme eines Bunsenbrenners gehalten und nach ca. 30 sec Abkühlung wurde das

2 Material und Methoden

auf die Agarplatte pipettierte X-Gal damit verstrichen. Die Platten wurden nach vollständigem Einziehen des X-Gal bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Die Ausplattierung der Bakterien erfolgte analog, wobei jeweils einmal 50 µl und einmal 150 µl aufgetragen wurden. Dadurch sollten einerseits ausreichend Bakterien ausplattiert, andererseits das Wachsen einzelner Kolonien sichergestellt werden. Von den Bakterien, die ausschließlich den Vektor enthielten, wurden 100 µl aufgetragen. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert. Solche, auf denen ausreichend weiße Kolonien gewachsen waren, wurden anschließend bei 4 °C gelagert. Vom angesetzten LB-Medium wurden je 3 ml in ein 15 ml-Falconröhrchen pipettiert und in dieses je eine mit einer Pipettenspitze gepickte Bakterienkolonie gegeben. Die Röhrchen wurden im Bakterienschüttler bei 37 °C und 220 U/min über Nacht inkubiert.

Plasmid-Präparation und EcoR1-Verdau

Zur Amplifizierung der isolierten Plasmide wurden 2 ml der Bakteriensuspension in ein 2 ml-Eppendorfgefäß transferiert, um im Anschluss die Plasmid-Isolation mithilfe des Nucleo Spin Plasmid-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchzuführen. Dazu wurden die Bakterien zunächst pelletiert (13000x g, 5 min, RT), der Überstand dekantiert und das Pellet in 250 µl Puffer A1 (25 mmol/l Tris-HCL, 50 mmol/l Glucose, 10 mmol/l EDTA, 50 mg/125 ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl des Puffers A2 (0,2 mol/l NaOH, 1% SDS) wurden die Proben durch mehrfaches Konvertieren gemischt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Der Puffer A2 ist stark alkalisch, so dass er die Zellen lysiert und die Plasmid-DNA freisetzt. Es wurden 300 µl des Neutralisationspuffers A3 (3 mol/l Kaliumacetat, 2 mol/l Essigsäure) zugegeben, erneut mehrfach konvertiert und im Anschluss zentrifugiert (13000x g, 10 min, RT). Die Lösung hat eine hohe Salzkonzentration, wodurch die Proteine und die chromosomalen DNA gefällt werden, die Plasmid-DNA hingegen gelöst bleibt. Der Überstand wurde auf im Kit enthaltene Säulen geladen und diese zentrifugiert (13000x g, 1 min, RT). Der Durchlauf wurde verworfen und die Säulen nach Zugabe von 600 µl des Waschpuffers A4 (Tris-EDTA mit 80% (v/v) Ethanol) erneut zentrifugiert (13000x g, 1 min, RT). Nach erneutem Verwerfen des Durchlaufs wurden die Säulen noch einmal zentrifugiert (13000x g, 2 min, RT), um den Puffer A4 vollständig zu entfernen. Die Säulen wurden in neue 1,5 ml-Eppendorfgefäße transferiert und nach Zugabe von 50 µl Elutionspuffer AE (5 mM Tris-Cl, pH 8,5) 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13000x g, 1 min, RT) wurde dieser Vorgang mit dem erhaltenen Eluat noch einmal wiederholt, um die Effizienz des Vorgangs zu erhöhen.

2 Material und Methoden

Zur Fragmentierung der in den Vektor inserierten Plasmid-DNA, die für jeden einzelnen Klon spezifisch ist, wurde die Restriktionsendonuclease EcoR1 verwendet. Diese setzt an der Erkennungssequenz G/AATTC der geklonten DNA an und schneidet sie spezifisch. Für den EcoR1-Verdau wurde der in Tab. 2.39 dargestellte Ansatz in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert.

Eluiertes Plasmid	8 µl
10x Puffer React3	1 µl
EcoR1 (10U/µl)	1 µl

Tab. 2.39: Pipettieransatz Klonierung, EcoR1-Verdau

Die Proben wurden für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert, auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und für 1,5 h bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Sequenzierung

Die Sequenzierung der ausgewählten Proben wurde von der Firma MWG Biotech in Martinsried durchgeführt. Zunächst wurde die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch bestimmt. Für jede Probe wurde die Sequenzierung mit sechs verschiedenen Primern durchgeführt, wobei je Primer und Probe 1 µg DNA in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß verschickt wurde. Folgende Primer wurden für die Sequenzierung eingesetzt:

- Exon 6 (reverse Primer): AGAACAGTGGCTGAGGGGTAG
- Exon 9 (reverse Primer): ACTTCACTATGGTGGTTCTATC
- Exon 3(reverse Primer): AGACTACGTTGTTTCAGGGTTCC
- Intron 1(forward Primer): GGAGATCCTGCAGATAAAGTA
- T3-Primer (Invitrogen, Karlsruhe): ATTAACCCTCACTAAAGGGA
- T7-Primer (Invitrogen, Karlsruhe): CCCTATAGTGAGTCGTATTA

Auswertung der sequenzierten PCR-Produkte

Zur Auswertung des sequenzierten 1αOHase-Gens wurde die Anwendung ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, QLD, Australien) herangezogen. In diesem Computer-Programm wurden die von der Firma MWG Biotech ermittelten Sequenzen mit den bei der Sequenzierung verwendeten Primern und allen im 1αOHase-Gen enthaltenen Exons und

2 Material und Methoden

Introns zusammengefügt. Durch einen Abgleich der Sequenzen konnten so ggf. fehlende Exons bzw. die Insertion von Introns ermittelt werden.

3 Ergebnisse 1 α OHase

3.1 Untersuchung zur Expression der 1 α OHase mittels Nested Touchdown-PCR im Gewebe

3.1.1 Bestimmung der optimalen total RNA-Menge zur mRNA-Isolierung

Das Ziel dieses Vorversuchs war die Bestimmung einer total RNA-Menge zur mRNA-Isolierung, bei der das bestmögliche Signal in der Nested Touchdown-PCR erzielt werden konnte. Dazu wurde bei je einer malignen und einer benignen Probe die mRNA aus 50 μ g, 100 μ g und 150 μ g total RNA isoliert. Bei allen Proben wurde weiterhin ein cDNA-Template von 5 μ l in der ersten PCR eingesetzt. Es wurde sowohl für malignes als auch für benignes Gewebe eine RNA-Menge von 100 μ g festgelegt, da in beiden Dignitäten mit dieser RNA-Menge ein gut sichtbares Signal sichergestellt war. Siehe Abb. A.1 im Anhang.

3.1.2 Bestimmung der optimalen cDNA-Template-Menge im ersten PCR-Schritt

Im Anschluss wurde die cDNA-Template-Menge zur Durchführung der ersten PCR variiert. Von malignem und benignem Gewebe wurde jeweils die mRNA aus 100 μ g total RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Von den erhaltenen 20 μ l cDNA wurden jeweils vier verschiedene PCR1-Ansätze mit 0 μ l, 2,5 μ l, 5 μ l und 10 μ l Template hergestellt; die niedrigen Volumina wurden entsprechend mit HPLC-Wasser ausgeglichen. In allen hier gezeigten Proben zeigt sich ein Anstieg der Signalstärke bis zu einem Template von 5 μ l cDNA und eine offenbar nicht mehr intakte PCR bei einem Template von 10 μ l cDNA. Für benignes und malignes Gewebe wurde ein cDNA-Template von 5 μ l festgelegt, da das 1 α OHase-Signal bei 2,2 kb in diesem Bereich in allen hier gezeigten Proben präzise und gut erkennbar war. Siehe Abb. A.2 im Anhang.

3.1.3 1 α OHase-Expression in malignem und benignem Ovarialgewebe

Zum Vergleich der Expression des 1 α OHase-Gens in malignem und benignem Ovarialgewebe wurde die Nested Touchdown-PCR (Diesel et al., 2004) an insgesamt 17 malignen und 16 benignen Gewebeproben durchgeführt. Für die mRNA-Isolierung wurden 100 μ g total RNA eingesetzt. Die erste PCR wurde mit 5 μ l cDNA als Template durchgeführt. Abb. 3.1 (A)

3 Ergebnisse 1 α OHase

zeigt je neun maligne und benigne Proben nach elektrophoretischer Auftrennung von 10 μ l des PCR-Produktes in einem 1%igen Agarosegel. In Abb. 3.1 (B) wurden weitere acht maligne und sieben benigne Proben verglichen, aufgrund eines schwächeren Signals wurden hier 20 μ l des PCR-Produktes aufgetrennt. Die Detektion möglicher Splice-Varianten des 1 α OHase-Gens wird durch Banden ober und -unterhalb der 2,2 kb-Bande signalisiert. In Tab. 3.1 sind die davon abgrenzbaren Signale aufgezeigt.

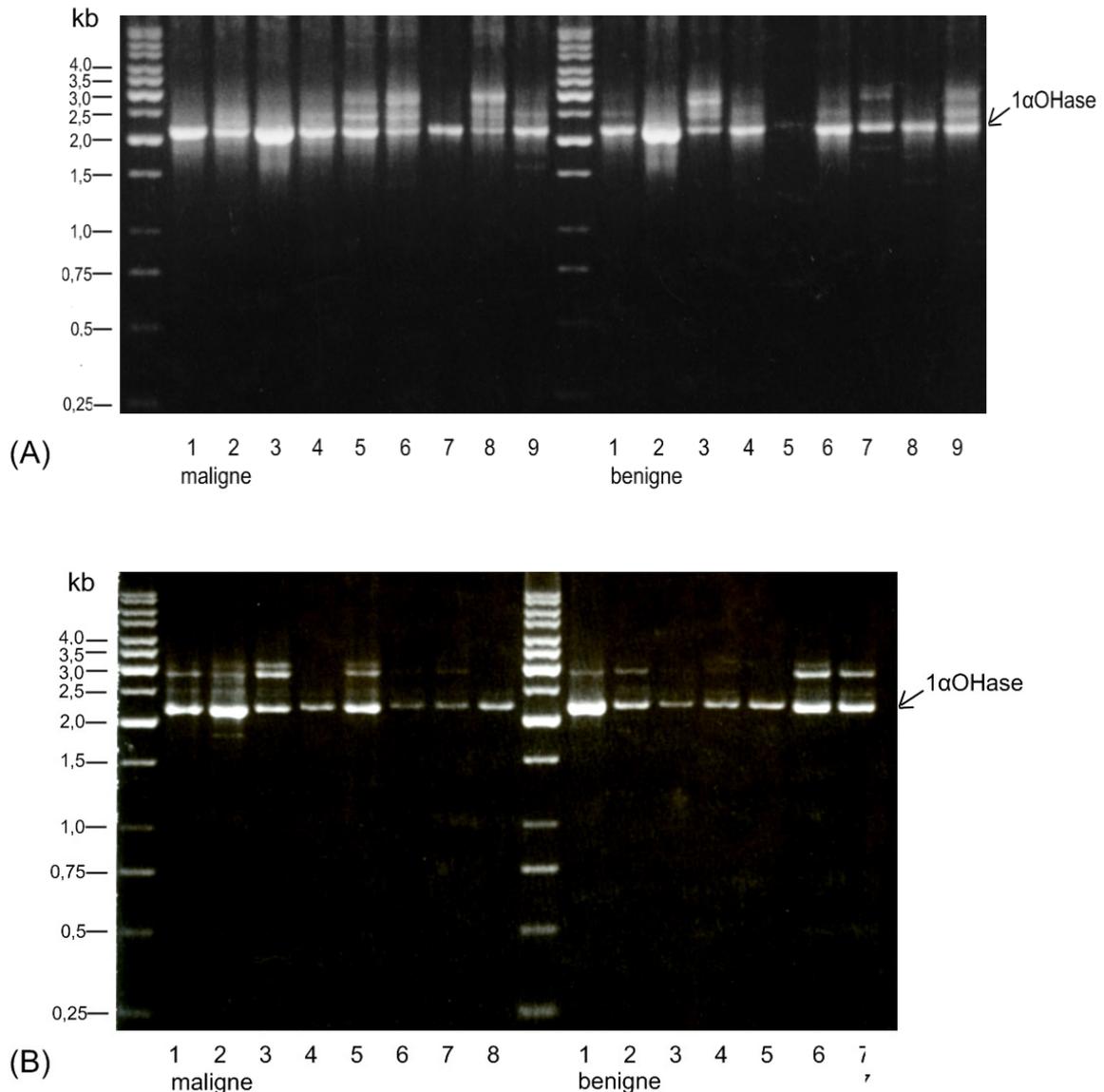


Abb. 3.1: Expression der 1 α OHase und Detektion möglicher Splice-Varianten in malignem (n=17) und benignem (n=16) Ovarialgewebe

kb	maligne	benigne
2,7	(A) Nr. 5, 6, 8 (B) Nr. 1, 2, 3, 5, 7	(A) Nr. 3, 7, 9 (B) Nr. 1, 2, 7, 8
2,5	(A) Nr. 5, 6, 8, 9 (B) Nr. 1, 2	(A) Nr. 1, 3, 6, 9 (B) Nr. 8
1,7	(A) Nr. 4, 5, 9 (B) Nr. 2	(A) Nr. 1, 7, 8
1,3		(A)Nr. 8

Tab. 3.1: Übersicht der durch Nested Touchdown-PCR detektierten Genvarianten der 1 α OHase (2,2 kb) in malignem und benignem Ovarialgewebe

3.2 Untersuchung zur Expression der 1 α OHase mittels Nested Touchdown-PCR an Zelllinien

3.2.1 Bestimmung der optimalen total RNA-Menge zur mRNA-Isolierung

Die Untersuchung der optimalen total RNA-Menge zur mRNA-Isolierung wurde an den Zelllinien wiederholt, wobei hier auch RNA-Mengen von 200 μ g und 250 μ g getestet wurden. Es zeigte sich jedoch wiederholt ein ausreichend starkes und gut sichtbares Signal in Höhe des 1 α OHase-Gens bei 2,2 kb nach mRNA-Isolierung aus 100 μ g total RNA. Diese Menge wurde für alle vier Zelllinien festgelegt. Siehe Abb. A.3 im Anhang.

3.2.2 Bestimmung der optimalen cDNA-Template-Menge im ersten PCR-Schritt

Auch an den Zelllinien wurde getestet, bei welchem cDNA-Template zur Durchführung der ersten PCR das bestmögliche Signal erzielt werden konnte. Die Bestimmung fand an je einer Probe von GLZ und HGL5 und im Anschluss an OVCAR-3 und COV434 in Doppelbestimmung statt, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Es zeigte sich einheitlich ein optimales Signal bei 5 μ l cDNA-Template. Die Signalstärke nach Einsatz von 2,5 μ l cDNA war zwischen den Zelllinien nicht einheitlich und daher nicht reproduzierbar. Bei 10 μ l war das Resultat der PCR nicht mehr zufriedenstellend. Siehe Abb. A.4 im Anhang.

3.2.3 1 α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zelldichte nach 0-96 h

Ziel dieser Untersuchung war festzustellen, ob eine Abhängigkeit der 1 α OHase-Genexpression von der Zelldichte besteht. Dazu wurden zu Versuchsbeginn je $1,5 \times 10^6$ Zellen in T75-Flaschen ausgesät und in Doppelbestimmung nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h geerntet. Alle ausgesäten Zellen entstammten der gleichen Passage, das Nährmedium wurde während der gesamten Versuchszeit nicht erneuert. Aus den erhaltenen Zellpellets wurde nach RNA- und mRNA-Isolierung die Nested Touchdown-PCR mit 5 μ l cDNA-Template durchgeführt. Bei GLZ sind zum Zeitpunkt 48 h neben dem 1 α OHase-Signal bei 2,2 kb Genvarianten im Größenbereich von 1,3–2,0 kb zu sehen. Zu den übrigen Zeitpunkten ist eine klar abgrenzbare Bande in Höhe von 2,2 kb zu erkennen, die im Verlauf von 48-96 h leicht an Intensität zunimmt. Bei HGL5 und bei COV434 zeigen sich keine Veränderungen des 1 α OHase-Signals im zeitlichen Verlauf und bei damit höherer Zellzahl und -dichte. Bei OVCAR-3 wird zum Zeitpunkt 0 h ein im Vergleich zu späteren Zeitpunkten relativ schwaches 1 α OHase-Signal bei 2,2 kb detektiert. Siehe Abb. A.5 im Anhang.

3.2.4 1 α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zellkulturpassage

Für die Untersuchung zur 1 α OHase-Genexpression in den Zelllinien, insbesondere im Hinblick auf die Detektion möglicher Splice-Varianten, wurde die Nested Touchdown-PCR an sieben verschiedenen Passagen jeder Zelllinie durchgeführt. Dabei waren die Kulturbedingungen der Passagen identisch und somit ohne Einfluss auf das Ergebnis. Aus den erhaltenen Zellpellets wurde RNA isoliert, von welcher einheitlich 100 μ g zur mRNA-Isolierung verwendet wurden. Ebenfalls einheitlich wurden 5 μ l cDNA bei der ersten PCR eingesetzt. Unter Berücksichtigung der Signalstärke wurden 5 μ l (Abb. 3.2 (A)) und 2,5 μ l (Abb. 3.2 (B)) des PCR-Produktes auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Untersuchung sollte einerseits Aufschluss über eine mögliche Abhängigkeit der 1 α OHase-Expression von der Zellkulturpassage geben, darüber hinaus sollte ein repräsentatives Gesamtbild möglicher 1 α OHase-Splice-Varianten in den einzelnen Zelllinien aufgezeigt werden. Banden ober- und unterhalb des 1 α OHase-Gens (2,2 kb) können auf Splice-Varianten hinweisen. Diese wurden in den einzelnen Zelllinien detektiert wie in Tab. 3.2 aufgezeigt.

3 Ergebnisse 1 α OHase

kb	GLZ	HGL5	OVCAR-3	COV434
2,7			Nr. 1-7	Nr. 2, 3, 7
2,5		Nr. 2, 3, 5	Nr. 1-7	Nr. 1-7
2,0	Nr. 2	Nr. 1, 4, 6, 7	Nr. 2, 3, 6;	Nr. 1-6;
1,8			Nr. 2, 6	Nr. 1, 3, 6

Tab. 3.2: Übersicht der durch Nested Touchdown-PCR detektierten, möglichen Genvarianten der 1 α OHase (2,2 kb) in GLZ, HGL5, OVCAR-3 und COV434

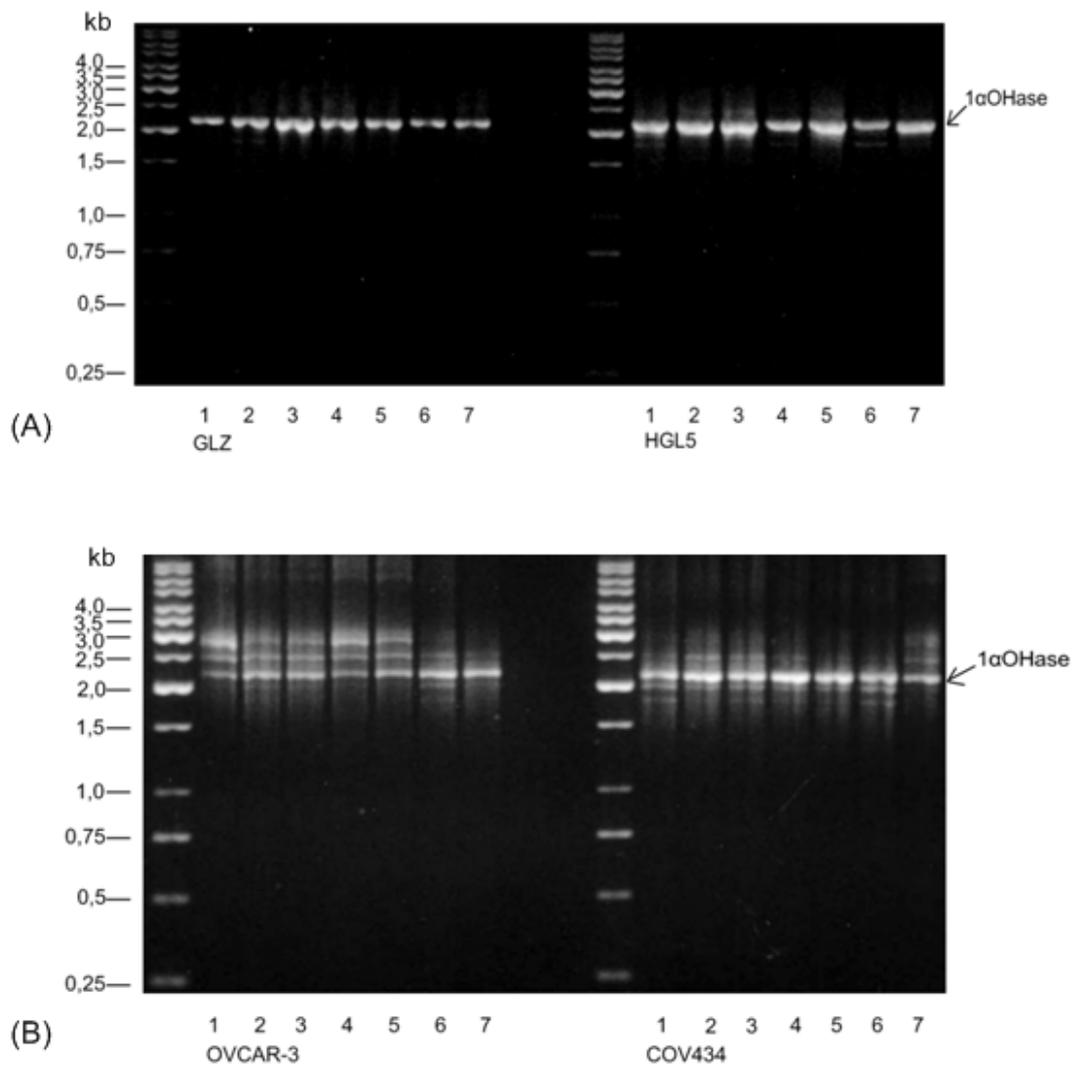


Abb. 3.2: Expression der 1 α OHase und Detektion möglicher Splice-Varianten in GLZ/HGL5 (A) und in OVCAR-3/COV434 (B) (je n=7)

3.3 Untersuchung zur Expression der 1 α OHase mittels Real Time-PCR im Gewebe

Die Real Time-PCR wurde an sieben benignen und elf malignen Gewebeproben durchgeführt. Zur Normalisierung wurde in allen durchgeführten Real Time-PCRs das Housekeeping-Gen HPRT verwendet. Es wurden einheitlich 2 μ g total RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Auswertung der Real Time-PCR ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied in der 1 α OHase-Expression zwischen benignem und malignem Ovarialgewebe ($p = 0,1822$). Siehe Abb. 3.3.

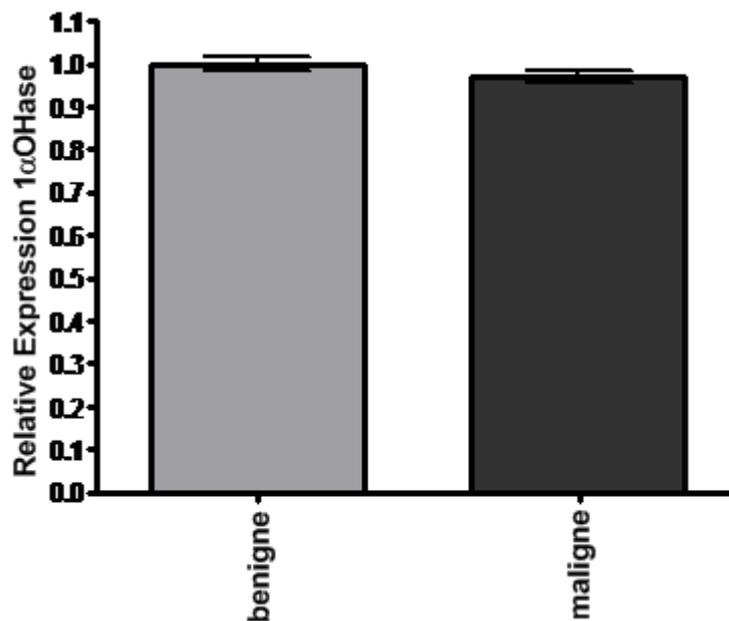


Abb. 3.3: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Expression nach Real Time-PCR normalisiert zu HPRT in malignem (n=11) relativ zu benignem (n=7) Ovarialgewebe

3.4 Untersuchung zur Expression der 1 α OHase mittels Real Time-PCR an Zelllinien

Die Real Time-PCR wurde an drei verschiedenen Passagen jeder Zelllinie durchgeführt. Abb. 3.4 zeigt die 1 α OHase-Expression in den untersuchten Zelllinien nach Auswertung der Real Time-PCR. Diese ergab eine statistisch signifikant erhöhte Expression in HGL5 ($p < 0,01$), OVCAR-3 ($p < 0,01$) und COV434 ($p < 0,05$) relativ zu benignen GLZ.

3 Ergebnisse 1 α OHase

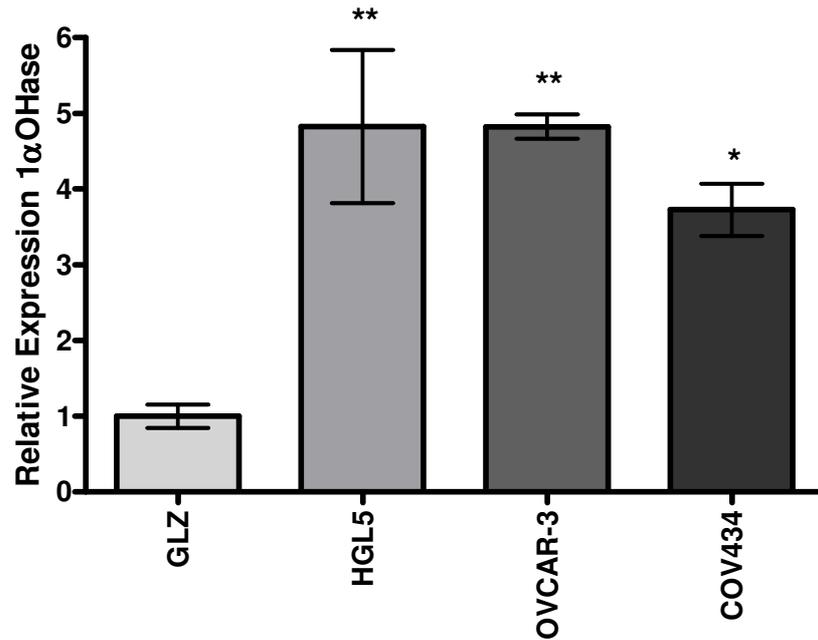


Abb. 3.4: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Expression nach Real Time-PCR normalisiert zu HPRT in HGL5, OVCAR-3 und COV434 relativ zu GLZ (je n=3) (* = p < 0,05; ** = p < 0,01)

3.5 Untersuchung zur Proteinexpression der 1 α OHase mittels Western Blot im Gewebe

3.5.1 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration

Die Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration, bezogen auf das normal gesplittede 1 α OHase-Enzym bei 56 kDa, wurde an je zwei malignen und benignen Gewebeproben durchgeführt. Dazu wurde das Proteinlysat jeder Probe zu einer Verdünnungsreihe von 2,5 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g Protein angesetzt. Die auf die einzelnen Spuren aufgetragenen Volumina waren durch einen Ausgleich mit Aqua dest. für jede Proteinkonzentration identisch. Die optimale Primär-Ak-Konzentration wurde zu diesem Zeitpunkt auf 1:2000, die Sekundär-Ak-Konzentration auf 1:6000 geschätzt. Die Überprüfung der Ak-Verdünnungen fand im Rahmen der parallel durchgeführten Untersuchungen an den Zelllinien statt; in diesen zeigten sich, in Relation zu den Proteinuntersuchungen im Gewebe, stärkere Hintergrundsignale bei gleichen Ak-Verdünnungen. Eine optimale 1 α OHase-Signalstärke musste sich somit vor allem an den Untersuchungen an den Zelllinien orientieren und wurde ausschließlich an diesen durchgeführt. Darüber hinaus wurde für die Untersuchungen am Gewebe mit den oben genannten Ak-Verdünnungen auf Erfahrungswerte des Labors aus früheren Durchführungen zurückgegriffen. In allen nachfolgenden Untersuchungen fand die

3 Ergebnisse 1 α OHase

Inkubation mit dem Primär-Ak über Nacht bei 4 °C, die Inkubation mit dem Sekundär-Ak für 1 h bei RT statt. Die optimale Proteinkonzentration wurde für benignes und malignes Gewebe auf einheitlich 10 μ g/Spur festgelegt, da bei diesem Konzentrationsbereich klare Signale - insbesondere des 1 α OHase-Enzyms bei 56 kDa - bei relativ geringen unspezifischen Hintergrundbanden erzielt werden konnten. Die Ak-Verdünnungen von 1:2000 für den Primär-Ak (0,5 μ l/ml) und 1:6000 für den Sekundär-Ak (0,167 μ l/ml) wurden als optimal beurteilt und bei allen weiteren Untersuchungen zur 1 α OHase-Expression im Gewebe eingesetzt. Siehe Abbildung Abb. A.6 im Anhang.

3.5.2 1 α OHase-Expression in malignem und benignem Ovarialgewebe

Qualitativer Nachweis

Die Untersuchung der 1 α OHase-Proteinexpression im Gewebe wurde an 17 malignen und 16 benignen Gewebeproben durchgeführt. An dieser Stelle werden exemplarisch je vier maligne und benigne Proben dargestellt und die Signale der Dignitäten verglichen (siehe Abb. 3.5). Das normale 1 α OHase-Enzym ist 56 kDa groß. Die davon abzugrenzenden Banden bei den einzelnen Proben werden in Tab. 3.3 aufgezeigt.

Proteingröße (kDa)	Maligne	Benigne
50	Nr. 1-3	Nr. 3
42	Nr. 1-4	Nr. 2, 4
37		Nr. 3
35	Nr. 2, 3	Nr. 1, 2, 4
27	Nr. 1, 2	Nr. 1-3
23	Nr. 1-3	Nr. 1-2
17-18	Nr. 3	Nr. 3
15		Nr. 1-4

Tab. 3.3: Übersicht detektierter, möglicher Varianten des 1 α OHase-Proteins (56 kDa) in malignem und benignem Ovarialgewebe

Auffällig ist das starke Signal bei 42 kDa in allen vier der hier gezeigten malignen Gewebeproben. Diese Bande stellt - zusammen mit einem etwas schwächeren Signal bei 23 kDa in den malignen und bei 15 kDa in den benignen Proben - den deutlichsten Unterschied

3 Ergebnisse 1 α OHase

zwischen den Dignitäten auf Proteinebene dar. Die darüber hinaus untersuchten, hier nicht gezeigten Proben weisen in ihrem Bandenmuster ein ähnliches Gesamtbild auf, so dass auf eine Darstellung an dieser Stelle verzichtet wurde.

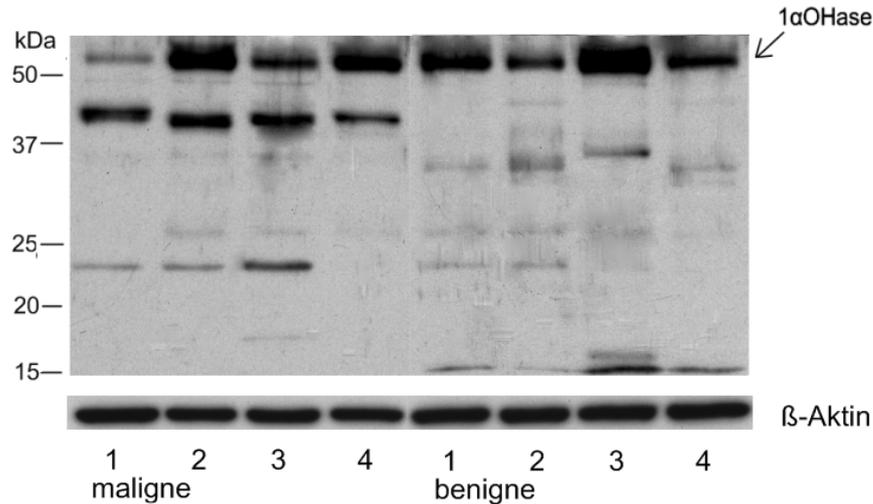


Abb. 3.5: Proteinexpression der 1 α OHase exemplarisch an malignem und benignem Ovarialgewebe (je n=4)

Quantitative Auswertung

Im Anschluss an den qualitativen Nachweis der 1 α OHase auf Proteinebene wurde eine quantitative Auswertung der erhaltenen Signale durchgeführt. Dazu wurde zunächst ausschließlich die Stärke des Signals bei 56 kDa - das der Größe des 1 α OHase-Proteins entspricht - in Bezug zum jeweiligen Wert des Housekeeping-Gens β -Aktin berechnet. Der Mittelwert der benignen Gewebeproben wurde als Standard normiert, die einzelnen Werte der benignen und malignen Proben wurden zu diesem Standard relativiert und die statistische Relevanz der Abweichung überprüft. Die 1 α OHase-Expression ist in malignem relativ zu benignem Gewebe vermindert, die Differenz ist statistisch jedoch nicht signifikant ($p = 0,0787$). Siehe Abb. 3.6.

3 Ergebnisse 1 α OHase

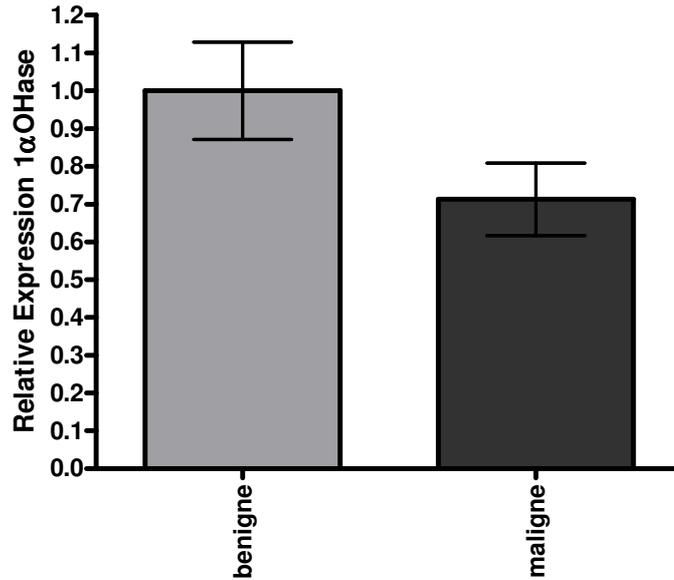


Abb. 3.6: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin in malignem (n=17) relativ zu benignem (n=16) Ovarialgewebe

Die Auswertung wurde unter Einbeziehung aller detektierten Banden wiederholt, um mögliche Splice-Varianten der 1 α OHase in die Auswertung einzubeziehen. Es ergab sich hierbei eine statistisch signifikant verminderte 1 α OHase-Expression in malignem relativ zu benignem Gewebe ($p < 0,05$). Siehe Abb. 3.7.

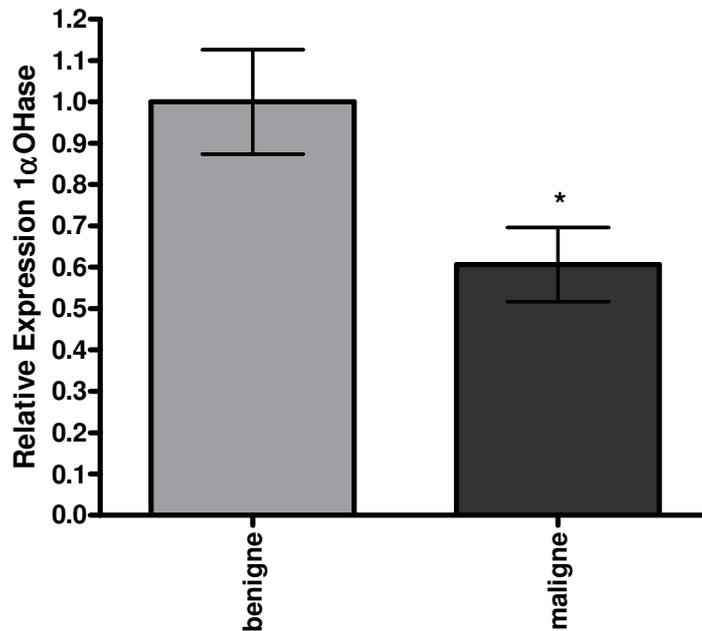


Abb. 3.7: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin unter Einbeziehung von Varianten in malignem (n=17) relativ zu benignem (n=16) Ovarialgewebe (* = $p < 0,05$)

3.6 Untersuchung zur Proteinexpression der 1 α OHase mittels Western Blot an Zelllinien

3.6.1 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration

Für jede Zelllinie wurde diejenige Proteinkonzentration bestimmt, bei der das bestmögliche 1 α OHase-Signal detektiert werden konnte. Das Proteinlysate jeder Probe wurde mit Aqua dest. zu einer Verdünnungsreihe von 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 40 μ g und 50 μ g angesetzt. Die am besten geeigneten Ak-Konzentrationen wurden zu diesem Zeitpunkt auf 1:2000 für den Primär-Ak und 1:6000 für den Sekundär-Ak geschätzt und zu einem späteren Zeitpunkt überprüft (siehe Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3). Die Proteinkonzentration wurde für alle Zelllinien auf 20 μ g/Spur festgelegt. Siehe Abb. A.7 im Anhang.

3.6.2 Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration wurden jeweils vier verschiedene Passagen der Zelllinien GLZ/HGL5 und OVCAR-3/COV434 auf einem Gel zusammengefasst. Der Sekundär-Ak wurde in den Verdünnungen 1:6000, 1:8000 und 1:12000 bei GLZ/HGL5 und in den Verdünnungen 1:6000 und 1:8000 bei OVCAR-3/COV434 getestet. Abschließend wurde der Western Blot mit OVCAR-3/COV434 nach Durchführung eines Re-Blots ausschließlich mit dem Sekundär-Ak inkubiert, um die Detektion unspezifischer Banden durch den Sekundär-Ak bei den eingesetzten Verdünnungen auszuschließen. Die optimale Primär-Ak-Konzentration wurde zu diesem Zeitpunkt auf 1:2000 geschätzt und im Anschluss getestet (siehe Abschnitt 3.6.3). Für GLZ und HGL5 wurde eine Sekundär-Ak-Konzentration von 1:12000 (0,83 μ l/ml) festgelegt, da in diesem Konzentrationsbereich das gesuchte Signal bei 56 kDa - unter Berücksichtigung von im Hintergrund auftretenden Banden - gut dargestellt werden konnte. Unter diesem Aspekt wurde weiterhin eine Sekundär-Ak-Konzentration von 1:6000 (1,67 μ l/ml) für OVCAR-3 und eine von 1:8000 (0,125 μ l/ml) für COV434 festgelegt. Siehe Abb. A.8 bis Abb. A.10 im Anhang.

3.6.3 Bestimmung der optimalen Primär-Ak-Konzentration

Die Primär-Ak-Konzentration wurde an OVCAR-3 und COV434 in einer Verdünnung von 1:2000 und 1:4000 unter Verwendung der oben ermittelten Sekundär-Ak-Konzentration ausgetestet. Es wurde für alle Zelllinien eine Primär-Ak-Konzentration von 1:2000 (5 μ l/ml)

festgelegt. Dabei wurde auf eine Konzentrationsbestimmung bei GLZ und HGL5 verzichtet, da das 1 α OHase-Signal bei einer Primär-Ak-Konzentration von 1:4000 als eindeutig zu schwach beurteilt wurde. Siehe Abb. A.11 im Anhang.

3.6.4 1 α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zelldichte

Die Untersuchung der 1 α OHase-Expression wurde in Doppelbestimmung an Proteinlysaten durchgeführt, die zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h gewonnen wurden. Im Vorfeld wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen in T75-Flaschen ausgesät, wobei alle ausgesäten Zellen der gleichen Passage entstammten. Das Nährmedium wurde während der gesamten Versuchszeit nicht erneuert. Bei OVCAR-3 zeigt sich zum Zeitpunkt 0 h ein schwaches Signal, das nach 24 h zunimmt und ein Maximum bei 48 h erreicht. Die Signalstärke nimmt im zeitlichen Verlauf, insbesondere nach 96 h, wieder leicht ab. Die zu Beginn des Versuchs relativ geringe Zelldichte spiegelt sich bei OVCAR-3 somit in einem geringen Proteingehalt der Zellen und einer geringen 1 α OHase-Expression wider. Diese Beobachtung korreliert mit dem ebenfalls geringen RNA-Gehalt in OVCAR-3 zum Zeitpunkt 0 h (siehe Abschnitt 3.2.3). Bei den übrigen Zelllinien zeigen sich keine Unterschiede in der 1 α OHase-Expression in Abhängigkeit von der Dauer der Kulturpassage und der damit steigenden Zelldichte. Siehe Abb. A.12 im Anhang.

3.6.5 1 α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zellkulturpassage

Qualitativer Nachweis

Die 1 α OHase-Proteinexpression wurde im Western Blot an Proteinlysaten aus acht verschiedenen Passagen jeder Zelllinie untersucht (siehe Abb. 3.8). Unterschiede in Abhängigkeit der Zellkulturpassage sowie ein Gesamtbild der 1 α OHase-Expression auf Proteinebene sollten damit für die einzelnen Zelllinien aufgezeigt werden. Das normal gespaltene 1 α OHase-Enzym ist 56 kDa groß. Es sind zahlreiche von dieser Bande abzugrenzende Signale erkennbar, wobei diese in den einzelnen Zelllinien unterschiedlich verteilt und ausgeprägt sind. Das Gesamtbild der erhaltenen Signale ist innerhalb der Zelllinien sehr einheitlich, so dass auf eine genaue Beschreibung einzelner Passagen verzichtet wird. Nachfolgend wird eine ungefähre Größenangabe der jeweils das Gesamtbild dominierenden Banden aufgezeigt:

3 Ergebnisse 1 α OHase

- GLZ: 60 kDa; 25 kDa; 42 kDa; 27 kDa; 22 kDa; 13 kDa
- HGL5: 48 kDa; 27 kDa; 22 kDa; 17 kDa; 13 kDa
- OVCAR-3: 60 kDa; 38 kDa; 27 kDa, 15-20 kDa
- COV434: 60 kDa; 45 kDa; 36 kDa; 32 kDa; 27 kDa; 17 kDa; 16 kDa

Auffällig ist dabei in der Zelllinie GLZ das Signal bei 13 kDa, das in dieser Ausprägung in keiner der malignen Zelllinien auftritt. Die 22 kDa-Bande ist in GLZ und HGL5 – hingegen nicht in OVCAR-3 und COV434 - relativ stark ausgeprägt. Die 48 kDa-Bande erscheint in HGL5 besonders deutlich; in COV434 sind die Signale oberhalb der 15 kDa-Marke stark ausgeprägt.

3 Ergebnisse 1 α OHase

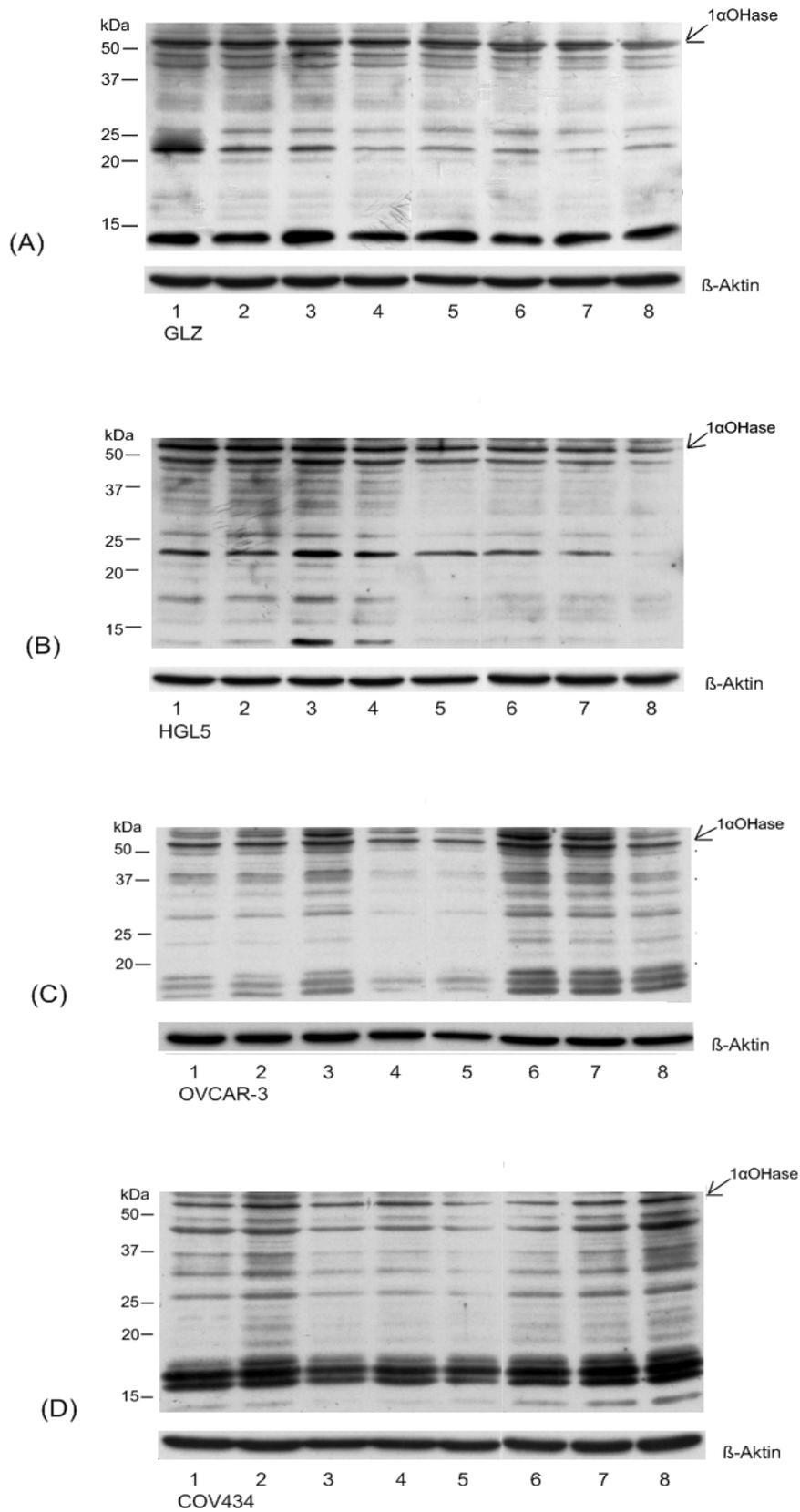


Abb. 3.8: Expression der 1 α OHase in verschiedenen Zellkulturpassagen in GLZ (A), HGL5 (B), OVCAR-3 (C) und COV434 (D) (je n=8)

Quantitative Auswertung

Zur quantitativen Auswertung der 1 α OHase-Expression relativ zu β -Aktin wurden die einzelnen Werte der Zelllinien zum normierten Mittelwert der benignen GLZ relativiert und die statistische Relevanz der Abweichung überprüft. Es ergab sich eine statistisch signifikant erhöhte 1 α OHase-Expression in OVCAR-3 relativ zu GLZ ($p < 0,01$). Die Expressionsunterschiede zwischen HGL5 bzw. COV434 und GLZ sind statistisch nicht signifikant ($p = 0,0629$ bzw. $p = 0,1795$). Siehe Abb. 3.9.

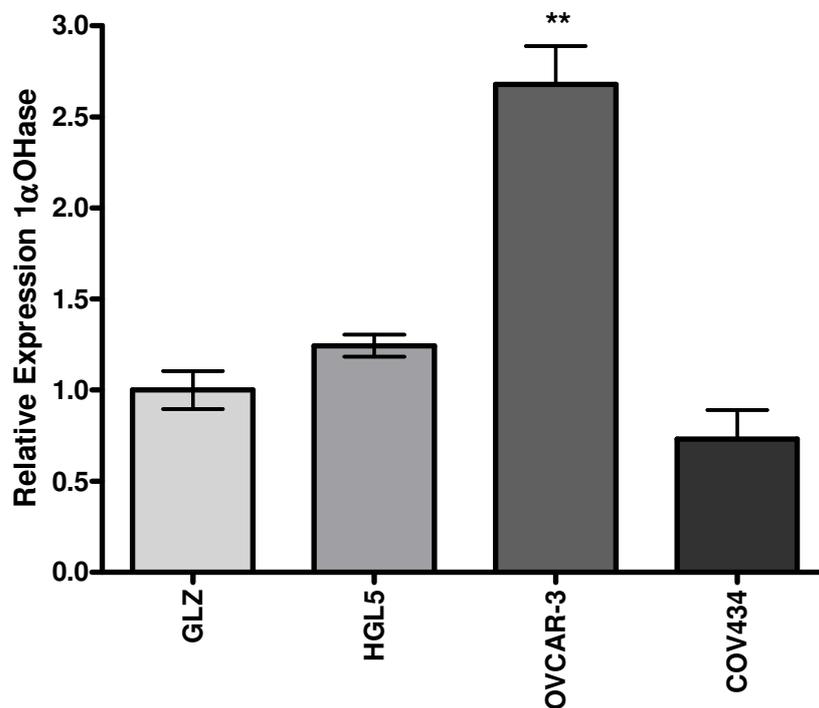


Abb. 3.9: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin in HGL5, OVCAR-3 und COV434 in Bezug zu GLZ (je n=8)

Im Anschluss wurde erneut eine quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression unter Einbeziehung aller detektierten Banden durchgeführt. Dies zeigte keine Auswirkungen auf die statistischen Signifikanzen (OVCAR-3/GLZ: $p < 0,01$; HGL5/GLZ: $p = 0,9545$; COV434/GLZ: $p = 0,1122$). Siehe Abb. 3.10.

3 Ergebnisse 1 α OHase

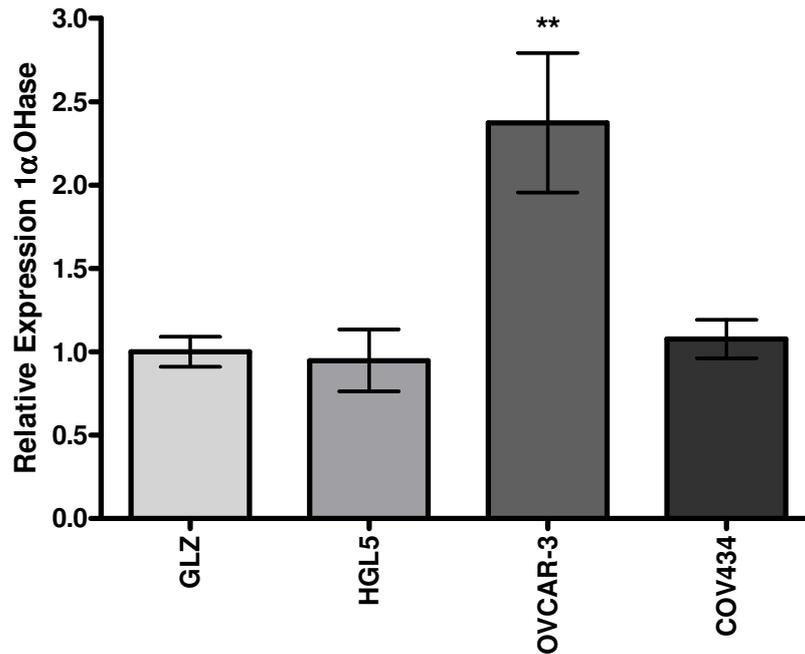


Abb. 3.10: Quantitative Auswertung der 1 α OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin unter Einbeziehung von Varianten in GLZ, HGL5, OVCAR-3 und COV434 in Bezug zu GLZ (je n=8)

3.7 Immunhistochemie 1 α OHase

Der immunhistochemische Nachweis der 1 α OHase wurde an benignem und malignem Ovarialgewebe durchgeführt. Im Folgenden werden exemplarisch je eine benigne und maligne Gewebeprobe gezeigt. Der Primär- und der Sekundär-Antikörper wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Bei den entsprechenden Negativkontrollen wurde keine Inkubation mit dem Primär-Ak durchgeführt. Eine quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde nicht vorgenommen, vielmehr soll ein Überblick über die Verteilung und Expressionsstärke des 1 α OHase-Enzyms in benignem und malignem Ovarialgewebe gegeben werden.

Abb. 3.11 zeigt eine benigne Follikelzyste. Das Lumen der Zyste wird von Granulosa- und Thekazellen umgeben. Diese Zellschichten weisen eine intensive Färbung und damit vermutlich eine hohe Konzentration des 1 α OHase-Proteins auf. Im ovariellen Stroma sind Blutgefäße mit darin enthaltenen Erythrozyten zu erkennen. Abb. 3.12 zeigt die entsprechende Negativkontrolle.

3 Ergebnisse 1 α OHase

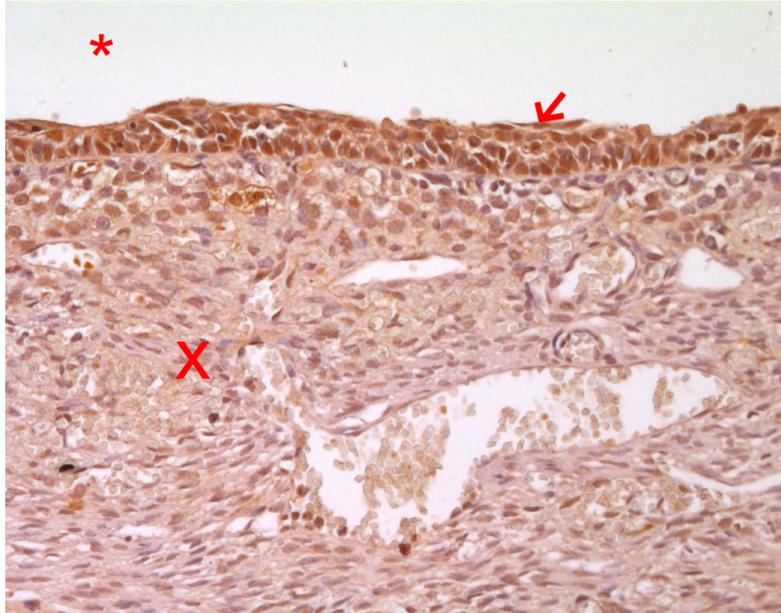


Abb. 3.11: Immunhistochemie: benignes Ovarialgewebe, nach Primär- und Sekundär-Ak je 1:1000
(* Follikellumen, → Granulosazellen, X Ovarialstroma mit Blutgefäßen)

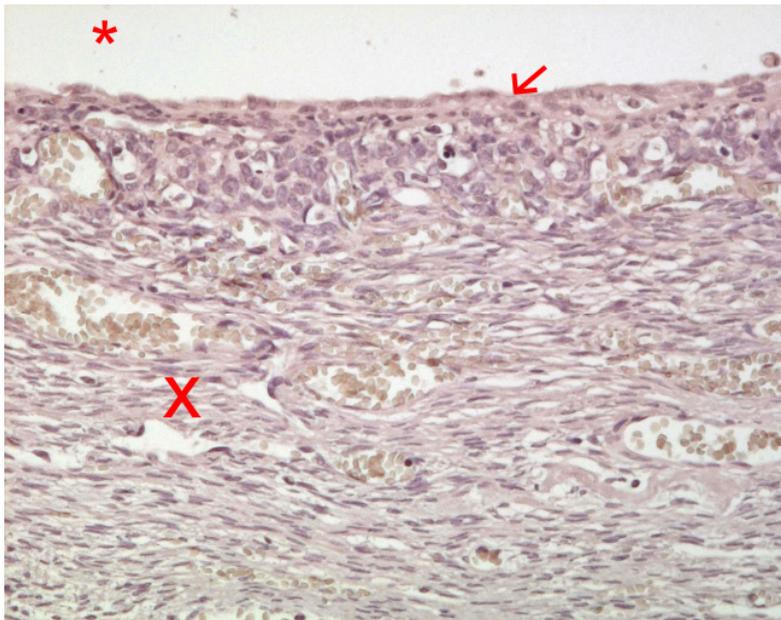


Abb. 3.12: Immunhistochemie: benignes Ovarialgewebe, Negativkontrolle ohne Primär-Ak und nach
Sekundär-Ak 1:1000 (* Follikellumen, → Granulosazellen, X Ovarialstroma mit Blutgefäßen)

3 Ergebnisse 1 α OHase

In Abb. 3.13 ist die immunhistochemische Färbung eines ovariellen Adenokarzinoms zu sehen. Die Karzinomzellen infiltrieren das gesamte Ovarialgewebe, die intensive Färbung weist auf eine starke 1 α OHase-Expression in den malignen Zellen hin. Der Tumor ist mit Bindegewebe durchsetzt. In Abb. 3.14 ist eine entsprechende Negativkontrolle abgebildet.

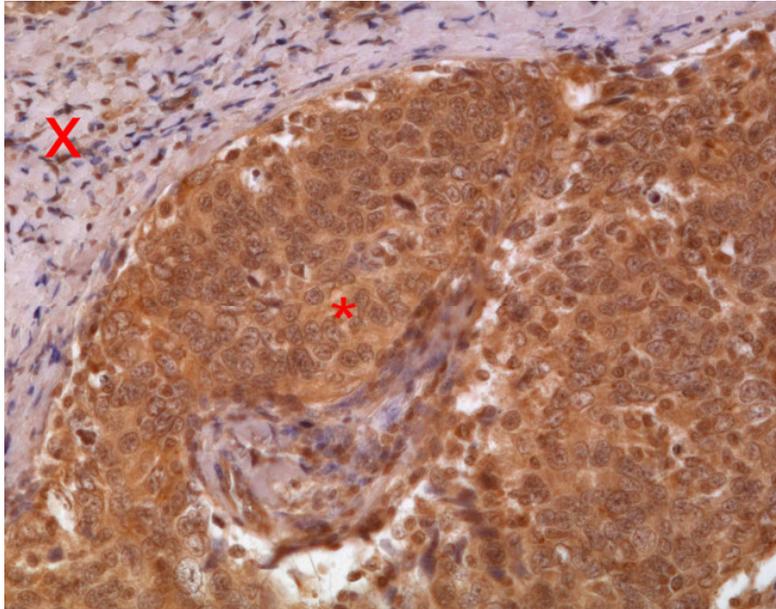


Abb. 3.13: Immunhistochemie: malignes Ovarialgewebe, nach Primär- und Sekundär-Ak je 1:1000
(* Adenokarzinomzellen, X Bindegewebe)

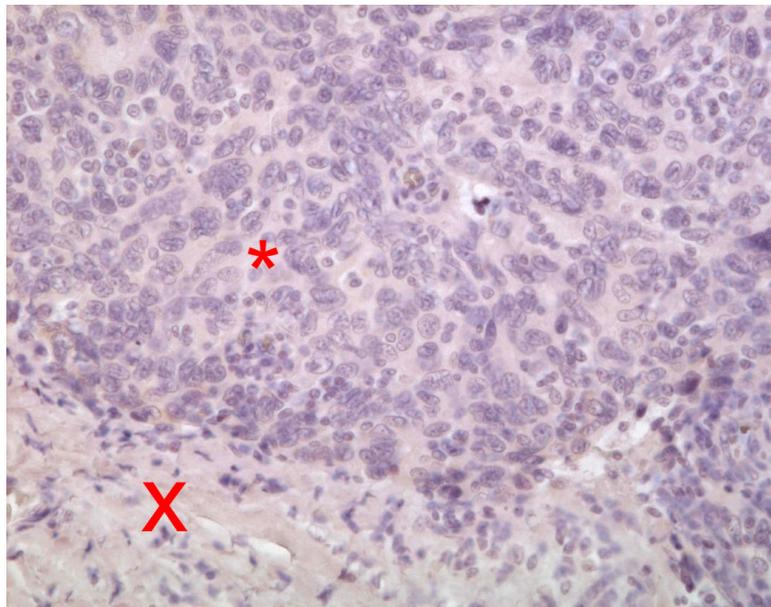


Abb. 3.14: Immunhistochemie: malignes Ovarialgewebe, Negativkontrolle ohne Primär-Ak und nach Sek-Ak 1:1000 (* Adenokarzinomzellen, X Bindegewebe)

3.8 Klonierung und Sequenzierung von 1 α OHase-Splice-Varianten aus Zellen und Gewebe

Zum Nachweis möglicher Splice-Varianten wurden eine Klonierung und anschließende Sequenzierung des 1 α OHase-Gens durchgeführt. Dazu wurden Proben der Gewebe und Zelllinien ausgewählt, deren Bandenmuster auf das Auftreten von 1 α OHase-Splice-Varianten hinwiesen. Es wurden folgende Proben ausgewählt (siehe Abb. 3.1 und Abb. 3.2 oben) und zur besseren Verständlichkeit im fortlaufenden Text wie folgt nummeriert:

1. Gewebe maligne Nr. 5 (Abb. 3.1. (A))
2. Gewebe maligne Nr. 3 (Abb. 3.1 (B))
3. Gewebe benigne Nr. 3 (Abb. 3.1 (A))
4. HGL5 Nr. 6 (Abb. 3.2)
5. OVCAR-3 Nr. 6 (Abb. 3.2)
6. COV434 Nr. 1 (Abb. 3.2)

Auf eine Klonierung der GLZ wurde verzichtet, da in allen untersuchten Proben ausschließlich eine Bande bei 2,2 kb detektiert wurde, die der Größe des normalen 1 α OHase-Gens entspricht. Für die Sequenzierung ausgewählte Klone wiesen im PCR-Bild ein Signal mit eindeutig vom normalen 1 α OHase-Gen differenzierbarer Größe auf. Von jeder Probe wurden im Anschluss an die Klonierung ca. 10 Bakterienkolonien einzeln in Bakterien-Nährmedium kultiviert und ein Plasmid-Verdau vorgenommen. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt, für die anschließende Auswertung wurde die Anwendung ChromasPro herangezogen. Die normal gesplicte 1 α OHase beinhaltet neun Exons, deren Integrität in den einzelnen Proben untersucht wurde. Weiterhin galt es zu überprüfen, ob ein oder mehrere der acht Introns durch alternatives Splicen im Gen zu detektieren waren.

Abb. 3.15 zeigt die für die Sequenzierung ausgewählten Proben, von denen nach Plasmidisolation und EcoR1-Verdau 10 μ l in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Der Vektor in Höhe von ca. 3,5 kb und das normal große 1 α OHase-Enzym im Kontroll-Klon Nr. 6.4 sind gekennzeichnet. Von den Proben Nr. 1 (malignes Gewebe) und Nr. 4 (HGL5) wurden zwei Klone, von Probe Nr. 6 (COV434) drei Klone durch Sequenzierung untersucht. Von Probe Nr. 6 diente außerdem ein Klon mit normalem

3 Ergebnisse 1 α OHase

1 α OHase-Signal bei 2,2 kb als Kontrolle. Tab. 3.4 beschreibt die Größe des detektierten Signals in den einzelnen Proben und das Ergebnis der Auswertung. Die Genstruktur des normal gespligten 1 α OHase-Gens sowie die nachgewiesenen Splice-Varianten sind in Abb. 3.16 (A) bzw. (B) dargestellt.

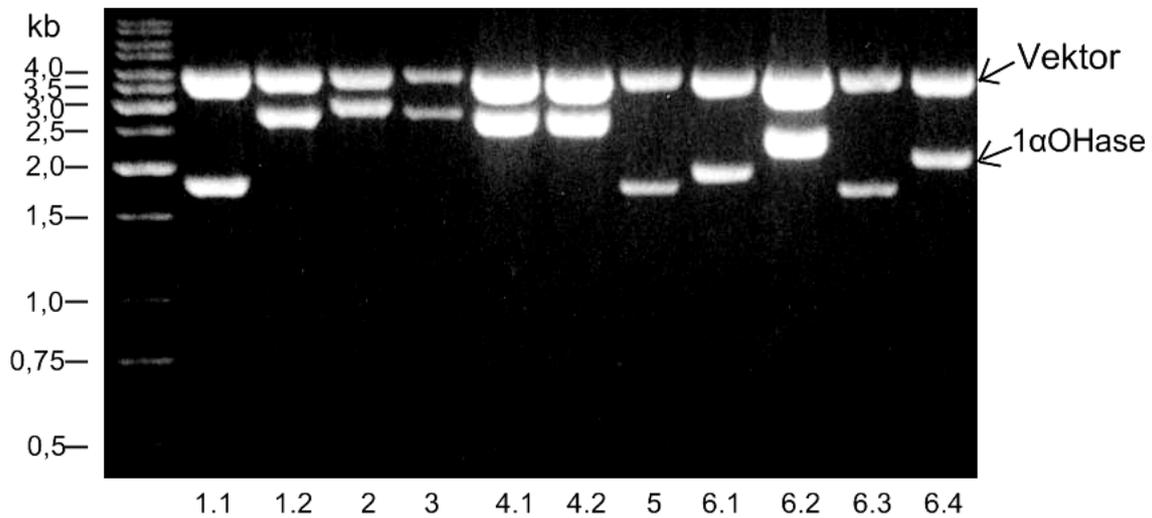


Abb. 3.15: Für die Sequenzierung ausgewählte Klone nach Plasmidisolierung und EcoR1-Verdau

Probe	Signalgröße im PCR-Bild (kb)	mRNA-Struktur \pm Ex/In
Nr. 1.1 (Gewebe maligne)	1,8	- Ex4/Ex5
Nr. 1.2 (Gewebe maligne)	2,7	+ In 1
Nr. 2 (Gewebe maligne)	3,0	+ In 1
Nr. 3 (Gewebe benigne)	2,8	+ In 1
Nr. 4.1 (HGL5)	2,7	—
Nr. 4.2 (HGL5)	2,7	- Ex4/Ex5 + In 1
Nr. 5 (OVCAR-3)	1,8	+ In 1

3 Ergebnisse 1 α OHase

Nr. 6.1 (COV434)	2,0	+ In 1
Nr. 6.2 (COV434)	2,5	- Ex4/Ex5
Nr. 6.3 (COV434)	1,8	—
Nr. 6.4 (COV434) Kontrolle	2,2	—

Tab. 3.4: Größe des 1 α OHase-Signals im PCR-Bild und Genstruktur nach Auswertung der durch Sequenzierung untersuchten Klone

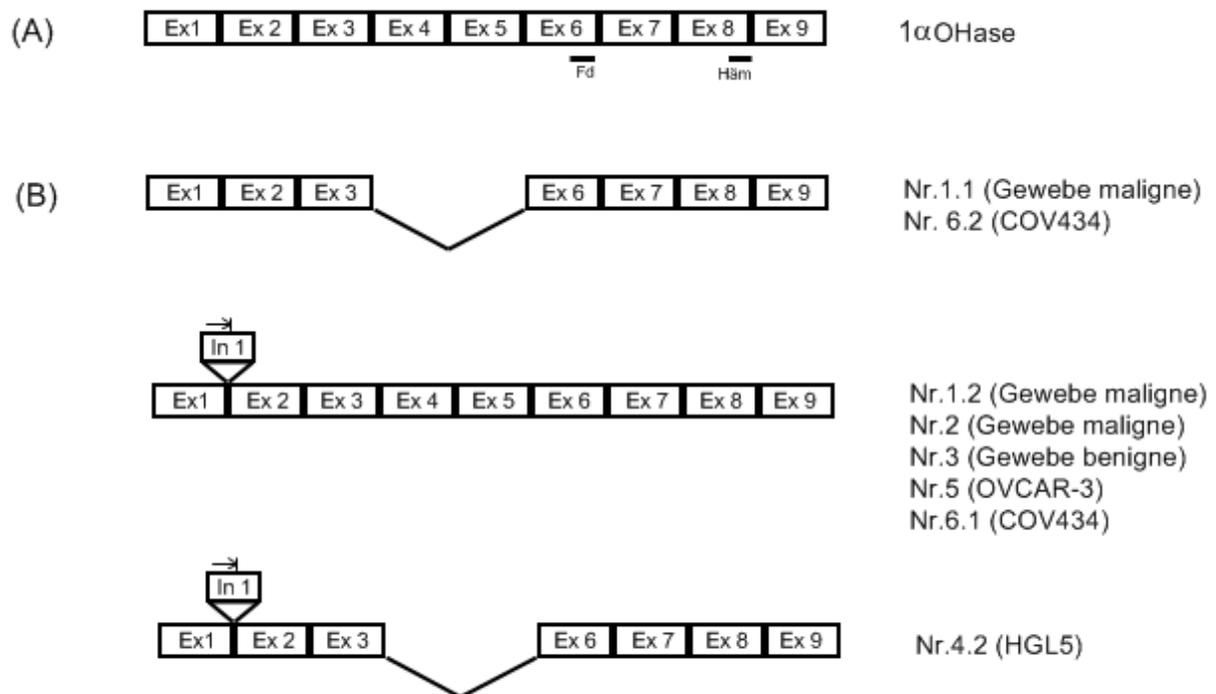


Abb. 3.16: Genstruktur der 1 α OHase mit Markierung der für die Ferroxidase-Bindungsstelle und für die Häm-Bindungsstelle kodierenden Regionen (A) sowie Struktur nachgewiesener 1 α OHase-Splice-Varianten in den sequenzierten Proben (B)

4 Ergebnisse 24OHase

4.1 Untersuchung zur Expression der 24OHase mittels Real Time-PCR im Gewebe

Die Real Time-PCR wurde an je acht malignen und benignen Gewebeproben durchgeführt. Die Auswertung ergab eine statistisch hoch signifikante Erhöhung der 24OHase-Expression in malignem relativ zu benignem Ovarialgewebe ($p < 0,001$). Siehe Abb. 4.1.

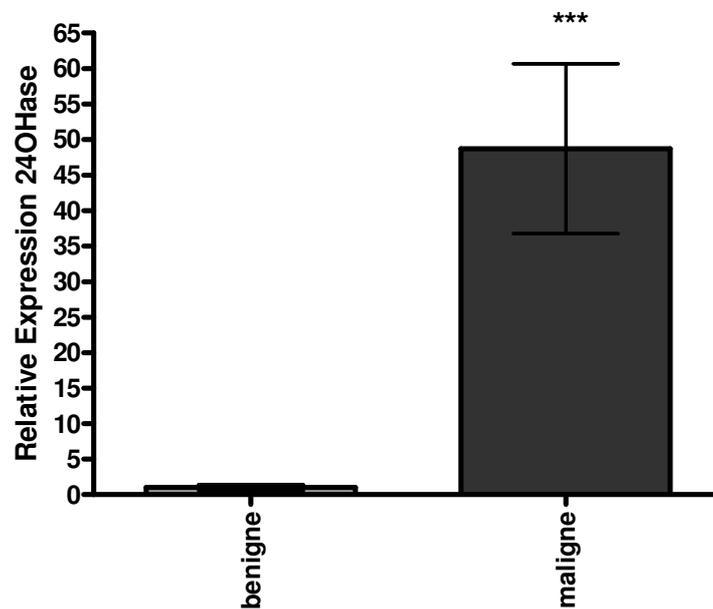


Abb. 4.1: Quantitative Auswertung der 24OHase-Expression nach Real Time-PCR normalisiert zu HPRT in malignem relativ zu benignem Ovarialgewebe (je n=8)

4.2 Untersuchung zur Expression der 24OHase mittels Real Time-PCR an Zelllinien

Die Real Time-PCR wurde an fünf verschiedenen Zellkulturpassagen von GLZ und an je sechs Zellkulturpassagen von HGL5, OVCAR-3 und COV434 durchgeführt. Die Auswertung ergab eine statistisch signifikante Erhöhung der 24OHase-Expression in OVCAR-3 relativ zu GLZ ($p < 0,01$). Die Expressionsunterschiede zwischen HGL5 bzw. COV434 und GLZ sind statistisch nicht signifikant ($p = 0,0505$ bzw. $p = 0,5596$). Siehe Abb. 4.2.

4 Ergebnisse 24OHase

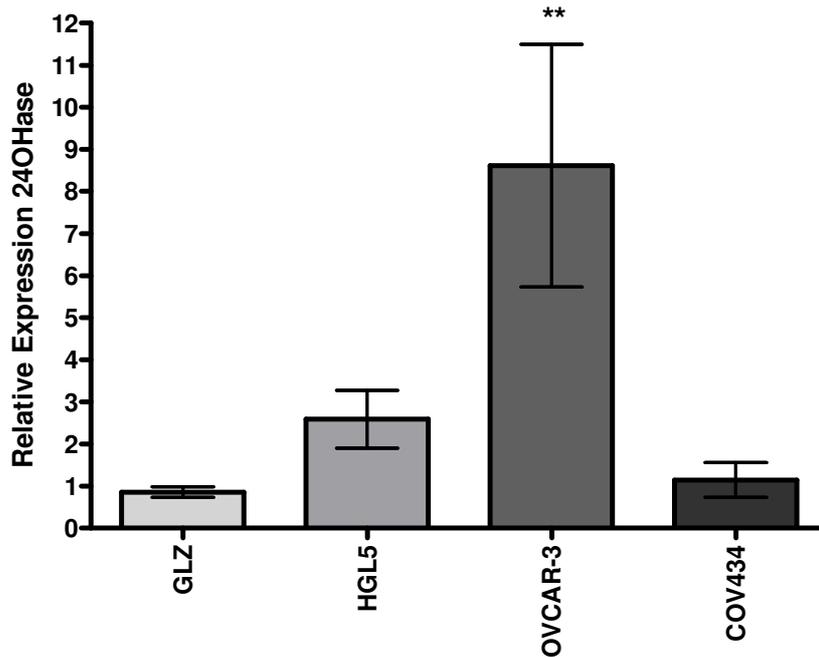


Abb. 4.2: Quantitative Auswertung der 24OHase-Expression nach Real Time PCR normalisiert zu HPRT in HGL5, OVCAR-3 und COV434 (je n=6) relativ zu GLZ (n=5)

4.3 Untersuchung zur Proteinexpression der 24OHase mittels Western Blot im Gewebe

4.3.1 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration

Als Voruntersuchung zur Proteinexpression der 24OHase wurde die Proteinkonzentration zur Erhaltung des bestmöglichen Signals bestimmt. Der Test wurde zunächst an je einer malignen und benignen Probe durchgeführt, indem eine Verdünnungsreihe des Proteinlysats mit 2,5 µg, 5 µg, 10 µg und 20 µg Protein hergestellt wurde. Das Verhältnis der Ak-Verdünnungen betrug 1:2000 für den Primär-Ak und 1:12000 für den Sekundär-Ak. Die Sekundär-Ak-Verdünnung ist im Vergleich zu den 1αOHase-Proteinuntersuchungen am Gewebe relativ hoch. Dies erklärt sich mit Erfahrungen aus vorausgegangenen Untersuchungen mit diesem Ak. Nach erster Testung (siehe Abb. A.13 im Anhang) konnte insbesondere für die maligne Probe keine sichere Aussage bezüglich der optimalen Proteinkonzentration getroffen werden, da ein gut sichtbares Signal lediglich unterhalb der gesuchten 55 kDa-Bande detektiert werden konnte. Aus diesem Grund wurde der Vorversuch an je zwei weiteren malignen und benignen Proben wiederholt. Durch Orientierung am Ergebnis der benignen Proteinkonzentrationsreihe wurden im zweiten

Versuch ausschließlich die Konzentrationen 10 µg und 20 µg Protein/Spur getestet. Die Ak-Verdünnungen wurden wie oben beschrieben eingesetzt. Im zweiten Test (siehe Abb. A.14 im Anhang) ist in beiden malignen Proben kein bzw. bei 20 µg/Spur nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen. Diese Beobachtung erweist sich in Abschnitt 4.2.3 als repräsentativ. Die optimale Proteinkonzentration wurde anhand der Resultate der benignen Proben in beiden hier beschriebenen Versuchen auf 20 µg/Spur festgelegt.

4.3.2 Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration

Zur Optimierung der Sekundär-Ak-Konzentration für das bestmögliche Signal bei 55 kDa wurden die Verdünnungen 1:6000, 1:8000 (Abb. A.15 (A)) und 1:12000 (Abb. A.15 (B)) nach vorheriger Inkubation mit dem Primär-Ak in einer Verdünnung von 1:2000 an je zwei malignen und benignen Gewebeproben ausgetestet. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei der Verdünnung von 1:12000 die maligne Probe in Spur 1 gegen eine andere maligne Probe ersetzt wurde, da die detektierte Vielzahl an Banden als nicht repräsentativ für eine maligne Probe betrachtet werden konnte (siehe Abb. A.13 und Abb. A.14). Bei den Verdünnungen von 1:6000 und 1:8000 sind Hintergrundsignale und relativ zu einer Verdünnung von 1:12000 zahlreiche Banden ober- und unterhalb von 55 kDa zu erkennen. Nach einer Inkubation ausschließlich mit dem Sekundär-Ak in einer Verdünnung von 1:12000 erschienen nur einzelne dezente Banden und geringe Hintergrundsignale, so dass diese Verdünnung als optimal beurteilt und bei malignen und benignen Gewebeproben eingesetzt wurde.

Eine Testung der optimalen Primär-Ak-Konzentration wurde angesichts des oben erzielten Ergebnisses als nicht notwendig betrachtet. Die Anwendung einer Primär-Ak-Verdünnung von 1:2000 orientiert sich zudem an Erfahrungen aus vorausgegangenen Untersuchungen.

4.3.3 24OHase-Expression in malignem und benignem Ovarialgewebe

Qualitativer Nachweis

Zum Vergleich der 24OHase-Expression zwischen malignem und benignem Ovarialgewebe und zur Detektion möglicher Splice-Varianten wurden 17 maligne und 16 benigne Gewebeproben im Western Blot untersucht. An dieser Stelle werden exemplarisch je vier maligne und benigne Proben gezeigt und die Signale der Dignitäten verglichen. Die

4 Ergebnisse 24OHase

Mehrzahl der malignen Proben zeigt kein Signal in Höhe des normalen 24OHase-Proteins bei 55 kDa (siehe Abb. 4.3.). Tab. 4.1 beschreibt die von der 55 kDa-Bande abzugrenzenden, in ihrer Größe abgeschätzten Signale.

Proteingröße (kDa)	Maligne	Benigne
48	Nr. 1-4	Nr. 1-2
46	Nr. 1-4	Nr. 1-2
34	Nr. 1	
27	Nr. 1, 3	Nr. 1, 4

Tab. 4.1: Übersicht detektierter Varianten des 24OHase-Proteins (55 kDa) in malignem und benignem Ovarialgewebe

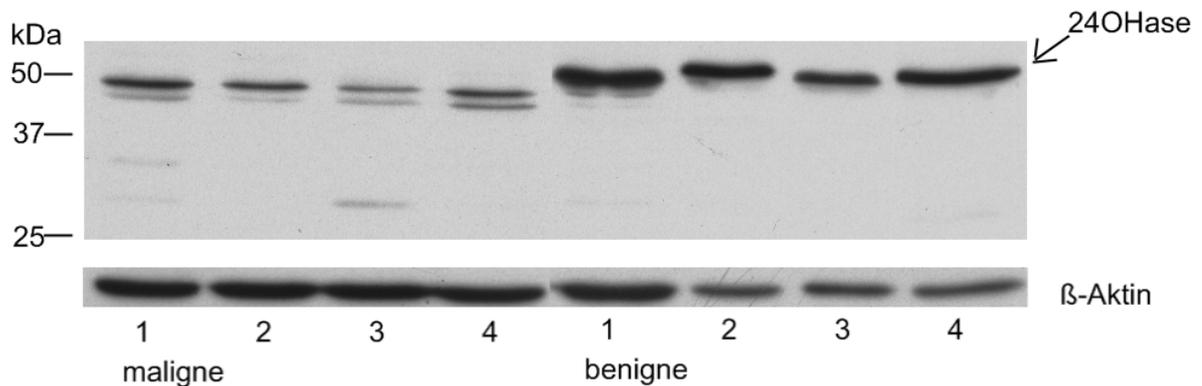


Abb. 4.3: Proteinexpression der 24OHase exemplarisch an malignem und benignem Ovarialgewebe (je n=4)

Quantitative Auswertung

Im Anschluss an den qualitativen Nachweis des 24OHase-Proteins wurde eine quantitative Auswertung der erhaltenen Signale durchgeführt. Dazu wurde die Signalstärke bei 55 kDa in Bezug zum entsprechenden β -Aktin-Wert berechnet. Die einzelnen malignen Proben wurden zum normierten Mittelwert der benignen Proben relativiert und die statistische Relevanz der Abweichung überprüft (siehe Abschnitt 2.2.4). Dabei ergab sich eine statistisch signifikant verminderte Expression der 24OHase in malignem relativ zu benignem Ovarialgewebe ($p < 0,01$). Siehe Abb. 4.4.

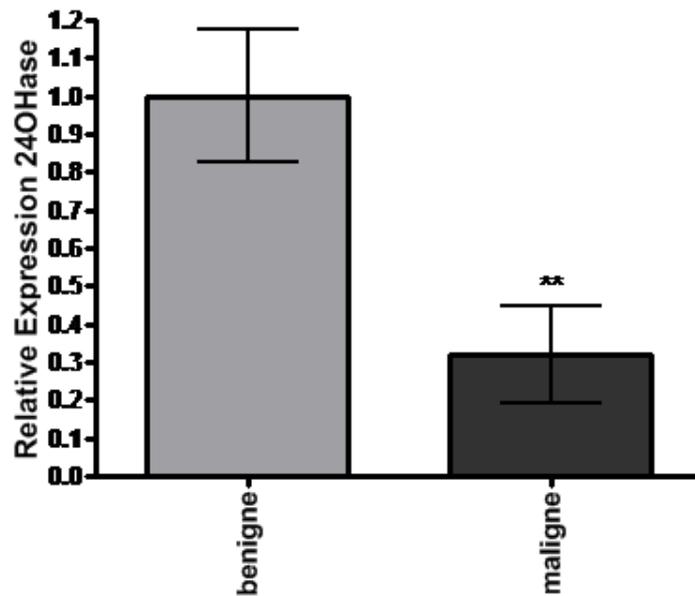


Abb. 4.4: Quantitative Auswertung der 24OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin in malignem (n=17) relativ zu benignem (n=16) Ovarialgewebe (** = $p < 0,01$)

Auf eine Auswertung unter Einbeziehung aller detektierten Banden wurde an dieser Stelle verzichtet. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Klonierung und Sequenzierung des 24OHase-Gens gewesen, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch aus Kostengründen nicht durchgeführt werden konnte. Die Bezeichnung dieser Banden als mögliche Splice-Varianten der 24OHase beschränkt sich daher auf spekulative Aussagen.

4.4 Untersuchung zur Proteinexpression der 24OHase mittels Western Blot an Zelllinien

4.4.1 Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration, bei der das bestmögliche 24OHase-Signal erzielt werden konnte, wurde an jeder hier untersuchten Zelllinie mittels einer Verdünnungsreihe von 2,5 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g durchgeführt. Die Ak-Verdünnungen wurden, analog zu den Untersuchungen am Gewebe, in den Verdünnungen 1:2000 des Primär- und 1:12000 des Sekundär-Aks eingesetzt. Eine spezifische Testung für die Untersuchungen an den Zelllinien fand zu einem späteren Zeitpunkt statt (siehe Abschnitte 4.4.2 und 4.4.3). Bei allen untersuchten Zelllinien wurde eine Proteinkonzentration von

20 µg/Spur festgelegt, da das 24OHase-Signal bei 55 kDa in diesem Konzentrationsbereich eindeutig und gut erkennbar war. Siehe Abb. A.16 im Anhang.

4.4.2 Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration

Die optimale Sekundär-Ak-Konzentration für die Zelluntersuchungen wurde durch eine Testung an GLZ/HGL5 und an OVCAR-3/COV434 in den Verdünnungen 1:8000 und 1:12000, bei OVCAR-3/COV434 zusätzlich in einer Verdünnung von 1:6000 durchgeführt, da sich bei Untersuchungen zur 1 α OHase-Proteinkonzentration in diesen beiden Zelllinien eine höhere Sekundär-Ak-Konzentration als vorteilhaft erwiesen hatte (siehe Abschnitt 3.6.2). Es wurde an dieser Stelle auf eine Testung mit vorausgegangener Inkubation mit dem Primär-Ak verzichtet. Im Vordergrund stand die Bestimmung einer Sekundär-Ak-Verdünnung, bei der das Auftreten von Hintergrundsignalen minimiert werden konnte. Unter diesen Aspekten wurde für alle hier untersuchten Zelllinien eine Sekundär-Ak-Verdünnung von 1:12000 festgelegt. Siehe Abb. A.17 im Anhang.

4.4.3 Bestimmung der optimalen Primär-Ak-Konzentration

Die Primär-Ak-Konzentration wurde zunächst in den Verdünnungen 1:2000 und 1:4000 an je zwei Passagen der Zelllinien OVCAR-3 und COV434 ausgetestet. Auch hier wurde das gesuchte Signal (55 kDa) nach einer Primär-Ak-Verdünnung von 1:4000 als zu schwach beurteilt und zunächst für alle Zelllinien eine Primär-Ak-Verdünnung von 1:2000 festgelegt. Nach der darauffolgenden Untersuchung der Proteinexpression in Abhängigkeit der Zellkulturpassage wurden die Signale – insbesondere den Hintergrund betreffend – in HGL5 jedoch als zu stark beurteilt (Abb. nicht gezeigt) und daher noch eine Testung der optimalen Primär-Ak-Konzentration in GLZ und HGL5 angeschlossen. Für HGL5 wurde eine Primär-Ak-Verdünnung von 1:4000 (2,5 µl/ml) als optimal beurteilt. Siehe Abb. A.18 im Anhang. Die in Abschnitt 4.4.4 beschriebene Untersuchung wurde für HGL5 mit dieser Verdünnung wiederholt.

4.4.4 Expression der 24OHase in Abhängigkeit der Zellkulturpassage

Die 24OHase-Expression wurde in je acht verschiedenen Zellkulturpassagen untersucht, wobei ein für die einzelnen Zelllinien spezifisches Bandenmuster entstand. Folgende mögliche Varianten des 24OHase-Proteins (55 kDa) sind zu erkennen:

4 Ergebnisse 24OHase

- GLZ: 48 kDa; 35 kDa; 33 kDa; 30 kDa; 27 kDa; 17 kDa
- HGL5: 48 kDa; 35 kDa; 33 kDa; 17 kDa
- OVCAR-3: 48 kDa; 35 kDa; 30 kDa
- COV434: 48 kDa; 30 kDa

Gemeinsamkeiten im Bandenmuster der einzelnen Zelllinien sind durch ein einheitliches Signal bei 48 kDa zu erkennen, weiterhin sind eine Bande bei 35 kDa in GLZ, HGL5 und OVCAR-3 und eine Bande bei 30 kDa in GLZ, OVCAR-3 und COV434 festzustellen. Siehe Abb. 4.5.

4 Ergebnisse 24OHase

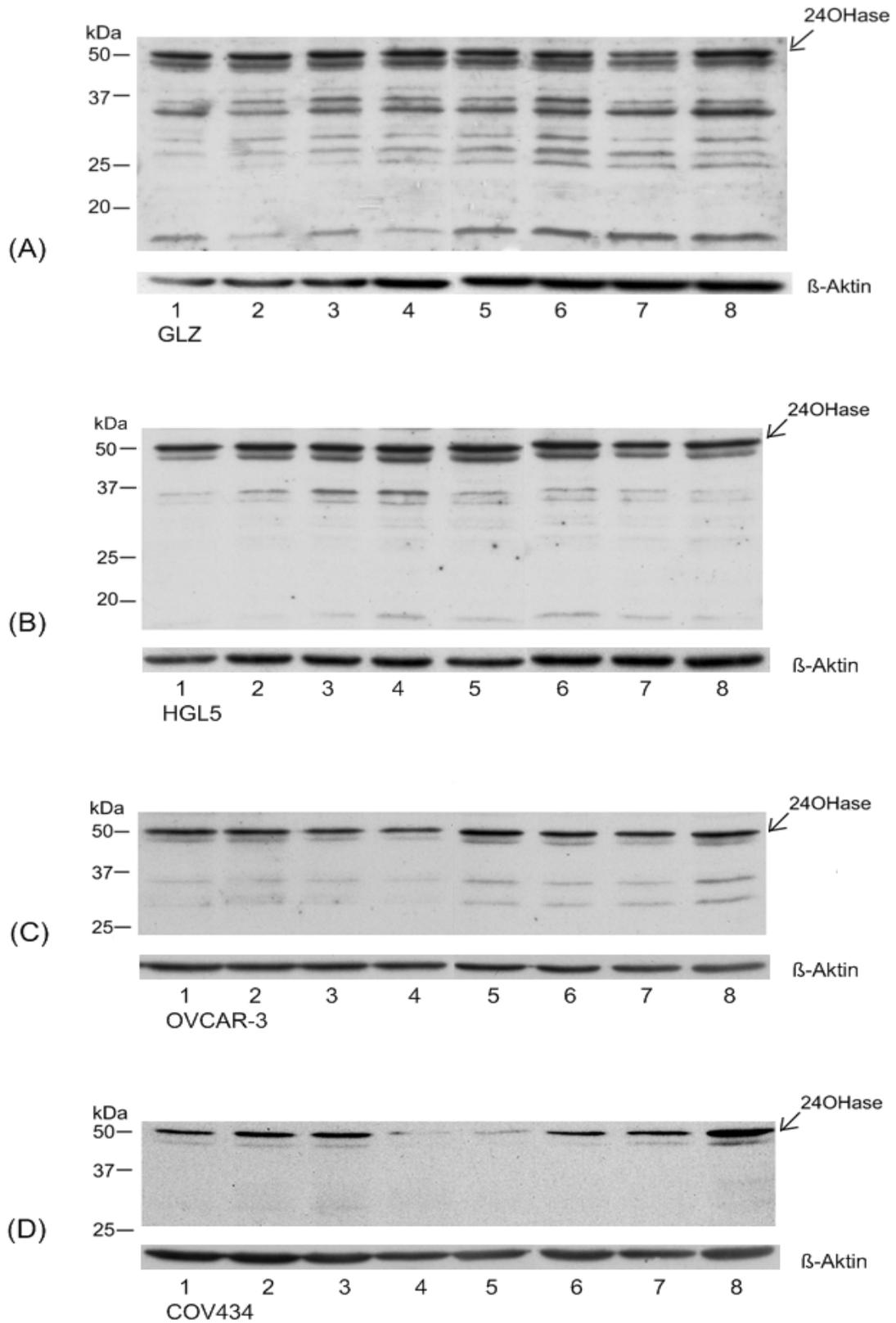


Abb. 4.5: Expression der 24OHase in verschiedenen Zellkulturpassagen in GLZ (A), HGL5 (B), OVCAR-3 (C) und COV434 (D) (je n=8)

Quantitative Auswertung

Im Anschluss an den qualitativen Nachweis des 24OHase-Proteins in den ovariellen Zellen wurde eine quantitative Auswertung des erhaltenen Signals bei 55 kDa durchgeführt. Der Mittelwert aus der benignen Zelllinie GLZ diente als Standard, die einzelnen Werte der malignen Zelllinien wurde dazu in Relation gesetzt und die statistische Relevanz der Abweichung überprüft. Es ergab sich eine statistisch signifikant stärkere 24OHase-Expression in HGL5 und in OVCAR-3 relativ zu GLZ ($p < 0,01$) sowie eine statistisch signifikant verminderte Expression in COV434 relativ zu GLZ ($p < 0,05$). Siehe Abb. 4.6.

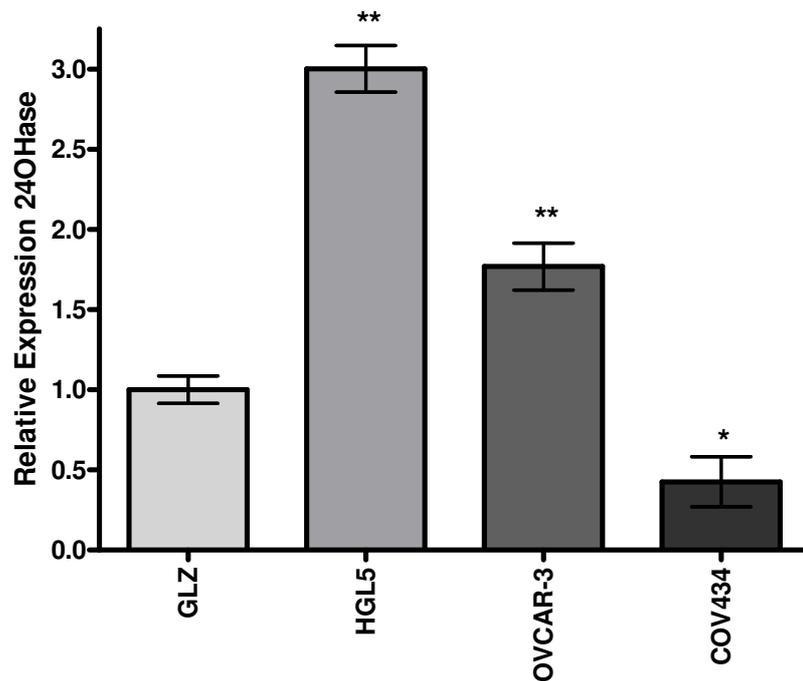


Abb. 4.6: Quantitative Auswertung der 24OHase-Proteinexpression relativ zu β -Aktin in HGL5, OVCAR-3 und COV434 relativ zu GLZ (je $n=8$) (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

5 Diskussion

5.1 *Untersuchung der 1 α OHase-Expression in benignem und malignem Ovarialgewebe sowie an malignen Ovarial-Zelllinien im Vergleich zu benignen GLZ*

Ziel der Untersuchungen war es, einen möglichen qualitativen oder quantitativen Unterschied in der Expression der Enzyme 1 α OHase und 24OHase zwischen benignem und malignem Ovar im Gewebe und an Zelllinien aufzuzeigen. Ein ggf. bei Malignität veränderter Vitamin D-Metabolismus könnte zum Einsatz von Calcitriol-Analoga in der Prävention und Therapie des Ovarialkarzinoms führen.

Die durchgeführten Untersuchungen zur 1 α OHase-Expression ergaben für OVCAR-3 auf Genom- und Proteinebene eine signifikante Expressionserhöhung im Vergleich zu GLZ. In HGL5 und COV434 zeigte sich ausschließlich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression. Mit Ausnahme der benignen GLZ wiesen alle untersuchten Zelllinien in der Nested Touchdown-PCR eindeutig vom normal gesplicten 1 α OHase-Gen abzugrenzende Banden auf. Durch Klonierung und Sequenzierung des 1 α OHase-Gens konnten Splice-Varianten in den malignen Zelllinien nachgewiesen werden. Die Untersuchungen der Gewebeproben ergaben ein in beiden Dignitäten nahezu identisches 1 α OHase-mRNA-Level. Hingegen war die Proteinexpression in malignem Gewebe vermindert, unter Einbeziehung aller detektierten Varianten war diese Differenz statistisch signifikant. Sowohl die Nested Touchdown-PCR als auch die Klonierung und Sequenzierung des 1 α OHase-Gens ergaben Splice-Varianten in beiden Dignitäten. Im malignen Gewebe konnten, im Gegensatz zum benignen Ovar, verschiedene Varianten und diese mehrfach nachgewiesen werden.

Nach Western Blot-Analyse war die Expression des 1 α OHase-Proteins – auch unter Einbeziehung möglicher Varianten - ausschließlich in OVCAR-3 erhöht, nicht hingegen in den ebenfalls malignen Zelllinien HGL5 und COV434. Divergente Ergebnisse können dadurch begründet sein, dass die Zelllinien verschiedenen histologischen Zelltypen des Ovars entstammen. Die Adenokarzinomzellen OVCAR-3 sind maligne Epithelzellen. Granulosazellen – und damit auch die malignen Granulosazellen HGL5 sowie die aus einem Granulosazelltumor extrahierten COV434 – umgeben im ovariellen Follikel die Eizelle. Die Untersuchungen an den Zelllinien wurden zunächst an OVCAR-3

durchgeführt. Eine Kultivierung der benignen epithelialen Ovarial-Zelllinie HS832.Tc (ATTC, USA) war in unserem Labor wiederholt ohne Erfolg, woraufhin die gesunden Granulosazellen des IVF-Programms als benigne Referenz gewählt wurden. Zwischen GLZ und OVCAR-3 wurden statistisch signifikante Differenzen in den Enzymexpressionen detektiert. Die malignen Zelllinien HGL5 und COV434 wurden daraufhin in die Untersuchungen einbezogen; es sollte überprüft werden, ob die detektierten Differenzen auf die Dignität der Zellen oder auf ihre Histologie im Ovar zurückzuführen sind.

Die erhöhte Proteinexpression der 1α OHase in OVCAR-3 weist nicht zwingend auf eine erhöhte Calcitriol-Synthese in diesen Zellen hin. Vielmehr könnte die Expressionserhöhung eine Kompensation vermutlich enzymatisch inaktiver 1α OHase-Splice-Varianten darstellen. Die u. a. in OVCAR-3 detektierte Splice-Variante resultiert durch Insertion von Intron 1 in einem 9 kDa großen Enzym, das weder die Häm,- noch die Ferredoxin-Bindungsstelle aufweist und damit enzymatisch inaktiv ist (Diesel et al., 2004). Demnach wäre es denkbar, dass die 1α OHase-Expression zwar erhöht ist, durch die Inaktivität des Enzyms jedoch $25(\text{OH})\text{D}_3$ nicht in Calcitriol umgewandelt werden kann und somit eine Hemmung der 1α OHase-Expression durch Calcitriol im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus nicht erfolgt. Eine erhöhte 1α OHase-Expression wurde auch für andere Adenokarzinomzellen beschrieben, so z. B. in Untersuchungen an Zellen des Mammakarzinoms (Friedrich et al., 2006) und des Prostatakarzinoms, letztere mit einer gleichzeitig stark verminderten Aktivität der 1α OHase im Vergleich zu gesunden Prostatazellen (Hsu et al., 2001).

Weiterhin könnten auch die Untersuchungsergebnisse zur 1α OHase-Expression in Abhängigkeit der Zelldichte die erhöhte 1α OHase-Expression in OVCAR-3 erklären (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.6.4). OVCAR-3 zeigten ein Expressionsmaximum nach 48 h und wiesen zu diesem Zeitpunkt sowohl im Western Blot als auch nach Nested Touchdown-PCR besonders starke Signale auf. Die übrigen Zelllinien zeigten hingegen eine konstante Expressionsstärke. Zur Aufnahme der Zellen in Trizol sowie zur Gewinnung von Proteinlysat wurden die Zellen je nach ca. zwei bis drei Tagen geerntet, wodurch die Auswertung eine falsch hohe Expressionsstärke in OVCAR-3 ergeben haben könnte.

Die 1α OHase-Expression in OVCAR-3 könnte auch als Reaktion auf ein vermindertes Ansprechen der Zellen auf Vitamin D-Metaboliten erhöht sein. In Untersuchungen am Prostatakarzinom reagierten benigne Referenzzellen auf eine Stimulation sowohl mit Calcitriol als auch mit $25(\text{OH})\text{D}_3$ mit einem verminderten Wachstum, die malignen Zellen zeigten dagegen ausschließlich eine Sensitivität für Calcitriol (Hsu et al., 2001). Die Sensitivität der Zellen für die Effekte von Calcitriol hängen u. a. vom Expressionslevel des VDR ab. Untersuchungen von Ahonen et al. zur VDR-Expression im Ovar zeigten ein niedriges VDR-Level im Epithel und Stroma verglichen mit der VDR-Expression in Granulosa- und Thekazellen der ovariellen Follikel (Ahonen et al., 2000). Enzymatisch inaktive Splice-Varianten der 1α OHase und eine zusätzlich geringe VDR-Expression könnten demnach verminderte Calcitriol-Effekte und eine kompensatorisch erhöhte 1α OHase-Expression in OVCAR-3 erklären.

Die im Folgenden besprochenen Ergebnisse aus den Untersuchungen am Gewebe sind nur begrenzt mit den Daten der Zelllinien vergleichbar. Wie oben beschrieben, werden die epithelialen Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 mit gesunden Zellen des ovariellen Follikels verglichen. Im Gegensatz dazu stellen die benignen Gewebeproben eine vergleichbare Referenz zu den Ovarialkarzinomproben dar.

Die 1α OHase-Proteinexpression ist in malignem Gewebe relativ zu benignem vermindert. Bei Auswertung aller detektierten Banden ergab sich für diese Differenz eine statistische Signifikanz. Dieses Ergebnis erscheint zunächst paradox. Auch im Gewebe wurden Splice-Varianten der 1α OHase detektiert, die vermutlich enzymatisch inaktiv sind und eine kompensatorische Expressionserhöhung des Enzyms erklären würden. Eine 1α OHase-Expression in immunologischen Zellen des entzündlichen Filtrats vieler Karzinome würde eine zusätzliche Expressionserhöhung des Enzyms in malignem Ovarialgewebe vermuten lassen (Evans et al., 2004; Townsend et al., 2005). Folgende Aspekte könnten dennoch die verminderte Proteinexpression in den malignen Gewebeproben erklären: In Monozyten wurde eine nicht kodierende, Intron 2 enthaltende 1α OHase-Splice-Variante detektiert, die eine verminderte Expression des normal gesplitten Enzyms bewirkt (Wu et al., 2007). Der Studie zufolge entsteht die regulatorisch wirkende, nicht kodierende RNA (ncRNA) v. a. posttranskriptionell durch alternatives Splicen. Laut Mattick und Makunin spielt ncRNA eine entscheidende Rolle in der Regulation des menschlichen Genoms. Den Autoren

zufolge entsteht der Großteil regulatorischer ncRNA durch Introns; der Anteil von Introns am Genom korreliert zudem mit der Komplexität eines Organismus (Mattick und Makunin, 2006). Eine verminderte 1 α OHase-Proteinexpression bei nicht vermindertem mRNA-Level im hier untersuchten malignen Gewebe könnte vor diesem Hintergrund erklärt werden, wenn Folgendes zuträfe: Entweder müsste davon ausgegangen werden, dass in den nicht untersuchten malignen Gewebeproben Intron 2 enthaltene mRNA vorliegt. Dies ist insofern denkbar, da sich die nicht sequenzierten Proben in der Nested Touchdown-PCR von den sequenzierten Proben in einigen Banden unterscheiden. Andererseits könnte auch die detektierte, Intron 1 enthaltene mRNA regulatorische Funktionen erfüllen. Die Detektion einer Intron 1 enthaltene 1 α OHase-Splice-Variante in einer benignen Gewebeprobe bestärkt weiterhin eine mögliche physiologische Funktion Introns enthaltener ncRNA. Splice-Varianten, bei denen Exons (hier Exon 4 und 5) fehlen, wurden in benignem Gewebe nicht detektiert. Ein entzündliches Infiltrat mit immunologischen Zellen kann in Karzinomgewebe vorliegen, benignes Gewebe weist hingegen im Normalfall keine Infiltration entzündlicher Zellen auf. Kultivierte Ovarialzelllinien sind ebenfalls ohne Einfluss immunologischer Zellen, so dass eine ggf. stattfindende Limitierung der normalen 1 α OHase-Proteinexpression ausschließlich in malignem Ovarialgewebe erfolgt und differente Ergebnisse der Untersuchungen an Zelllinien und Gewebe plausibel erscheinen.

Weiterhin könnte der verminderte Nachweis des 1 α OHase-Proteins in malignem Gewebe das Resultat einer veränderten Proteinstabilität sein. Alle detektierten Splice-Varianten stellen durch ein vorzeitiges Stopp-Codon Nonsense-Mutationen dar. Ein durch derartige Mutationen hervorgerufener mRNA-Zerfall (englisch: nonsense mediated mRNA decay, NMD) beschreibt einen Mechanismus, mit dem eukaryote Lebewesen mRNA mit einem vorzeitigen Stopp-Codon (englisch: premature termination codon, PTC) detektieren und degradieren. Das Auftreten von PTCs durch alternatives Splicen und der damit verbundene NMD werden als ein grundlegender Mechanismus zur Genregulation angesehen (De Rosa et al., 2007). Der Mechanismus des NMD als Folge von PTCs wurde auch für eine Cytochrom P450-Hydroxylase beschrieben (Busi und Cresteil, 2005). Mittels Real Time-PCR könnte in den hier untersuchten Gewebeproben z. T. mRNA detektiert worden sein, die anschließend aufgrund des NMD nicht in ein 1 α OHase-Protein translatiert wurde. Das in benignem und malignem Gewebe nahezu identische mRNA-Level geht weiterhin mit

Ergebnissen einer früheren Studie einher, die keinen Unterschied in der 1α OHase-mRNA-Expression zwischen benignem und malignem Kolongewebe ergab (Ogunkolade, 2002). Auch gilt es, für die Ergebnisse der Untersuchungen im Gewebe die Höhe der VDR-Expression in den verschiedenen Dignitäten zu berücksichtigen. Untersuchungen ergaben eine sehr niedrige VDR-Expression in gesundem Ovarialgewebe. Demnach werden in Relation zu anderen Organen, wie z. B. im Kolon und in der Lunge, im Ovar nur 2% des VDR exprimiert. Im Ovarialkarzinom hingegen wurde eine statistisch signifikant erhöhte Expression festgestellt ($p < 0,0001$) (Anderson et al., 2006). Diese Ergebnisse weisen auf eine stark erhöhte Sensitivität für Calcitriol im Ovarialkarzinom hin. Prinzipiell würde dadurch vermutlich eine geringe Menge an Calcitriol ausreichen, um dessen wachstumshemmenden und differenzierenden Effekte auf die Zellen zu erzielen. Die verminderte 1α OHase-Expression könnte demnach die Reaktion auf ein vermutlich hohes VDR-Level sein. Jedoch könnten die im malignen Ovar detektierten, funktionell inaktiven 1α OHase-Splice-Varianten wiederum dazu führen, dass die Hydroxylierungsreaktion von $25(\text{OH})\text{D}_3$ zu Calcitriol nicht katalysiert und somit trotz erhöhter VDR-Expression keine Effekte durch Calcitriol erzielt werden können.

Bezüglich der Untersuchungen zur 1α OHase-Expression auf Genom- und Proteinebene ist zu berücksichtigen, dass divergente Ergebnisse z. T. auch die Folge der verschiedenen Untersuchungsmethoden sein können. Die in der Real Time-PCR eingesetzten Primer binden an Exon 4 (Forward-Primer) und an Exon 6 (Reverse-Primer) und detektieren somit alle Varianten der 1α OHase, die Exon 5 aufweisen. Auch der im Western Blot eingesetzte Primär-Ak bindet an Exon 5 des 1α OHase-Proteins. Der qualitative Nachweis beider Verfahren ist somit grundsätzlich vergleichbar. Bei der Detektion des 1α OHase-Proteins kann jedoch trotz der Vorversuche zur optimalen Antikörper-Konzentration der Spezifitätsgrad des Primär-Antikörpers nicht eindeutig beurteilt werden. Weiterhin ist das Vorgehen bei der quantitativen Auswertung beider Untersuchungsmethoden verschieden: in der Real Time-PCR findet eine Messung des gesuchten Gens nach den einzelnen Zyklen der Amplifikation statt. Die Auswertung erfolgt demnach in Echtzeit (englisch: real time). Im Western Blot hingegen wird die Pixeldichte des auf die Trägermembran übertragenen 1α OHase-Proteins mithilfe eines Computer-Programms bestimmt. Prinzipiell müssen Ungenauigkeiten, die im Rahmen beider Verfahren an verschiedenen Stellen auftreten können, berücksichtigt werden. Als Beispiel seien beim Western Blot die Bestimmung der

Proteinkonzentration mittels BCA-Assay genannt; bezüglich der Realtime-PCR sei erneut darauf hingewiesen, dass die Auswertung ohne Zuhilfenahme einer Standardkurve und somit ohne exakte Effizienzberechnung erfolgte (siehe Abschnitt 2.2.6.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen z. T. eine im malignen Ovar verminderte Verfügbarkeit von Calcitriol vermuten, worauf u. a. die detektierten Splice-Varianten der 1α OHase hindeuten. Um diese Vermutung weiter zu bestätigen, müsste zunächst eine größere und damit repräsentativere Stichprobe der malignen und benignen Ovarialzellen und –Gewebe auf die qualitative und quantitative 1α OHase-Expression hin untersucht werden. Weiterhin wäre es nötig, die vermutete funktionelle Inaktivität des alternativ gespligten 1α OHase-Enzyms durch eine Aktivitätsmessung nach Stimulation mit $25(\text{OH})\text{D}_3$ sowie mit Calcitriol zu überprüfen. Eine Aktivitätsmessung mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) war im Rahmen dieser Arbeit wegen fehlender technischer Möglichkeiten nicht möglich. Als denkbare Ursache der im malignen Ovarialgewebe verminderten 1α OHase-Proteinexpression wurde die Herunterregulierung des normal gespligten Enzyms durch Introns enthaltene Splice-Varianten in Monozyten des entzündlichen Infiltrats diskutiert. Dieser Mechanismus wurde in Untersuchungen mittels short hairpin RNA (shRNA) bestätigt (Wu et al., 2007). Dabei wird eine RNA-Sequenz eingesetzt, die eine Haarnadelschleife aufweist und über RNA-Interferenz eine Unterdrückung der Genexpression bewirkt. Um nachzuweisen, dass auch die hier gewonnenen Daten z. T. das Resultat regulatorisch wirkender ncRNA sind, hätte eine Translationshemmung der Introns enthaltenen 1α OHase-mRNA durchgeführt und die Expressionsstärke des normal gespligten Enzyms beobachtet werden müssen.

Schließlich muss erneut darauf hingewiesen werden, dass den hier untersuchten Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 keine adäquate Referenz gegenübergestellt werden konnte und die gesunden Granulosazellen lediglich einen prinzipiellen Vergleich benigner und maligner Ovarialzellen ermöglichen. Die Einbeziehung von HGL5 und COV434 lässt eine Differenzierung zwischen benignen und malignen Granulosazellen zu, so dass der Fokus der Untersuchungen an den Zelllinien weniger stark auf das eigentlich zu untersuchende Ovarialkarzinom gerichtet ist. Diese Einschränkung bezieht sich auch auf die Untersuchungen zur 24OHase -Expression.

5.2 Untersuchung der 24OHase-Expression in benignem und malignem Ovarialgewebe sowie an malignen Ovarial-Zelllinien im Vergleich zu benignen GLZ

Die mRNA-Expression der 24OHase ist in allen hier untersuchten malignen Zelllinien gegenüber benignen GLZ erhöht, in OVCAR-3 und HGL5 ist die Differenz statistisch signifikant. Die Proteinexpression ist in OVCAR-3 und HGL5 ebenfalls statistisch signifikant erhöht, in COV434 dagegen signifikant erniedrigt. Die Untersuchungen der Gewebeproben führten zu divergenten Ergebnissen: Nach Auswertung der Real Time-PCR ist die 24OHase-Expression in malignem Gewebe statistisch signifikant erhöht, nach Western Blot-Analyse hingegen weist malignes Gewebe eine statistisch signifikant verminderte 24OHase-Expression auf.

Eine erhöhte Expression der 24OHase in OVCAR-3 und HGL5 deutet auf einen verstärkten Abbau von Calcitriol und 25(OH)D₃ in diesen Zellen hin. Eine daraus möglicherweise resultierende Limitierung der wachstumshemmenden und zelldifferenzierenden Effekte von Calcitriol könnte die Entdifferenzierung der Zellen begünstigen. Die Arbeitsgruppe um Tanner detektierte in Zellen und Gewebe des Ovarialkarzinoms eine Amplifikation der chromosomalen Region 20q12q13. Das kodierende Gen der 24OHase ist in dieser Region lokalisiert, so dass das Enzym als potenzielles Onkogen bezeichnet wurde (Tanner et al., 2000).

Um eine mögliche Erklärung für die in COV434 verminderte 24OHase-Expression und das damit von OVCAR-3 und HGL5 stark abweichende Ergebnis aufzeigen zu können, werden im Folgenden die spezifischen Charakteristika dieser Zelllinie beschrieben. Vorweg wird zum besseren Verständnis ein Überblick über den ovariellen Zyklus gegeben: Eine pulsatile GnRH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus führt im Hypophysenvorderlappen zu einer Abgabe des Follikel stimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) an das Blut. Nach Erreichen eines FSH-Schwellenwertes kommt es zur Rekrutierung der sogenannten Follikelkohorte in beiden Ovarien, aus denen ein dominanter Follikel selektiert wird. Um diesen befinden sich Granulosa- und Thekazellen; letztere bilden unter LH-Einfluss Androgene, welche wiederum von Granulosazellen mit Hilfe des Enzyms Aromatase in Östrogene (17β-Estradiol) umgewandelt werden. FSH

5 Diskussion

induziert die Expression der Aromatase in den Granulosazellen und ist daher für die Östrogenproduktion unerlässlich. Während der Selektion des dominanten Follikels steigt die Östrogenkonzentration im Serum exponentiell an. Bei einer maximalen Konzentration von 150 bis 500 pg/ml Östradiol im Serum kommt es zu einer massiven LH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen, wodurch nach ca. 10 bis 12 Stunden die Ovulation ausgelöst wird (Jonat et al., 2007).

COV434 entstammen einem malignen Granulosazelltumor. Sie weisen einige Gemeinsamkeiten mit benignen Granulosazellen auf: ein FSH-Rezeptor führt nach Stimulation mit dem Hormon zur Synthese von 17 β -Estradiol. Weiterhin weisen COV434 auch spezifische proapoptotische Marker auf, welche die Induktion der folliculären Atresie ermöglichen. Hingegen exprimieren COV434 keinen LH-Rezeptor, so dass eine Stimulation mit LH oder mit humanem Chorion-Gonadotropin (HCG) ohne Wirkung ist.

Eine hohe LH-Ausschüttung führt zu pathologischen Veränderungen im Ovar: Es entstehen vergrößerte Ovarien mit multiplen Zysten bis hin zu Tumoren aus Granulosa- und anderen Stromazellen (Risma et al., 1995; Nilson et al., 2000). COV434 stellt von den hier untersuchten Zellen die einzige nicht luteinisierte Zelllinie dar und ist damit ohne Einfluss der entdifferenzierenden LH-Wirkungen. Weiterhin stellten Untersuchungen an verschiedenen malignen Zelllinien des Ovars in Zellen eines Granulosazelltumors lediglich geringere zytogenetische Abnormalitäten, in Ovarialkarzinomzellen hingegen komplexe Karyotypen mit strukturell veränderten Chromosomen fest (van den Berg-Bakker et al., 1993). Zusammenfassend könnte die Theorie aufgestellt werden, dass die in COV434 relativ geringeren karzinogenen Einflüsse (sowohl durch LH als auch durch zytogenetische Veränderungen) einen differenten Malignitätsgrad dieser Zellen zur Folge haben. Dieser würde bei der verminderten 24OHase-Expression in COV434 mit nicht vollständig herabgesetzten wachstumshemmenden und differenzierenden Effekten durch Calcitriol einhergehen. Wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, wird der VDR in Granulosazellen stärker exprimiert als in ovariellen Epithelzellen. Sofern dies auch für die malignen Granulosazellen COV434 zutrifft, wäre nicht nur der Abbau von Calcitriol geringer, sondern auch die Sensitivität der Zellen für Calcitriol-Effekte erhöht. Speziell zur VDR-Expression in COV434 konnten keine entsprechenden Studien und Literaturangaben

gefunden werden. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die VDR-Expression nicht untersucht.

Nach Auswertung der Real Time-PCR ist das mRNA-Level der 24OHase in malignem Ovarialgewebe statistisch signifikant erhöht. Dies könnte auf einen verstärkten Calcitriol-Abbau im Ovarialkarzinom mit dadurch verminderten Antitumor-Effekten durch Calcitriol hindeuten. Das Ergebnis korreliert mit Untersuchungen zur Genamplifikation der 24OHase in Ovarialkarzinomzellen und –gewebe (Tanner et al., 2000) (s. o.). Weiterhin gehen die Resultate mit Untersuchungsergebnissen zum 24OHase-mRNA-Level in benignem und malignem Ovarialgewebe konform. Hierbei ergab sich eine im Ovarialkarzinom stark erhöhte 24OHase-Expression, wohingegen die 24OHase-mRNA in 10 von 13 benignen Ovarialgeweben nicht detektiert werden konnte. Die geringe 24OHase-Expression im benignen Ovar könnte mit dem niedrigen VDR-Expressionslevel in Zusammenhang stehen (Anderson et al., 2006). Das Gen der 24OHase zeigt die höchste Transkriptionsinduktion durch Calcitriol, wobei die Transkription von zwei unabhängigen VDREs kontrolliert wird. Calcitriol bewirkt demnach den eigenen Abbau über Bindung an den VDR (Barletta et al., 2003). Auch eine Calcitriol-unabhängige Induktion des 24OHase-Gens durch den VDR wurde beschrieben (Ellison et al., 2007).

Die Auswertung der 24OHase-Proteinexpression zeigte ein davon abweichendes Resultat mit stark verminderter Expression des Enzyms in den malignen Gewebeproben. Dieses zunächst widersprüchlich erscheinende Ergebnis könnte folgende Ursachen haben: Auch die Untersuchungen zur Proteinexpression der 1 α OHase ergaben eine in malignem Gewebe herabgesetzte Enzymexpression. Die ggf. verminderte Calcitriol-Synthese könnte eine Erklärung dafür sein, dass auch die Expression des Calcitriol abbauenden Enzyms 24OHase weniger stark ausgeprägt ist. Weiterhin könnte auch die 24OHase durch alternatives Splicen in ihrer genomischen Struktur verändert sein. Die Detektion möglicher 24OHase-Splice-Varianten war nicht Gegenstand dieser Arbeit, so dass diesbezüglich die Erkenntnisse externer Studien referenziert werden. Ren et al. detektierten eine Intron 2 enthaltene Splice-Variante der 24OHase in Makrophagen, die durch das Fehlen der mitochondrialen Zielsequenz ein katalytisch inaktives Enzym darstellte (Ren et al., 2005). Die Proteingröße betrug 36 statt 55 kDa. Darüber hinaus wurden einzelne Nukleotid-Polymorphismen (englisch: single nucleotid polymorphism, SNPs) in einem Intron sowie

unterschiedliche Splice-Muster zwischen den Exons 9 und 11 im 24OHase-Gen detektiert, die einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms zeigten (Muindi et al., 2007). Möglicherweise vorliegende 24OHase-Splice-Varianten könnten zu der verminderten Enzymexpression in malignem Ovarialgewebe beigetragen haben: Eine Intron enthaltene Variante könnte – analog den Beobachtungen zur 1 α OHase-Expression (Wu et al., 2007) (s. o.) – als regulatorisch wirkende ncRNA die Expression der Wildtyp-24OHase vermindert haben. Die von Ren et al. beschriebene, Intron 2 enthaltende Splice-Variante der 24OHase wurde in Makrophagen detektiert. Diese Variante kodiert für ein (nicht funktionales) 24OHase-Enzym. Die Expression weiterer, Intron enthaltener ncRNA erscheint nicht unwahrscheinlich. Deren mögliche Expression in Makrophagen des entzündlichen Infiltrats von Karzinomen würde auch für die 24OHase erklären, warum sich die verminderte Protein-Expression auf malignes Ovarialgewebe beschränkt.

Das Auftreten von 24OHase-Splice-Varianten in den hier untersuchten Gewebeproben wurde nicht durch Klonierung und Sequenzierung des Gens belegt, die Untersuchungen zur Proteinexpression mittels Western Blot führen jedoch zu folgender Überlegung: Es wurde in nahezu allen malignen Gewebeproben im Western Blot eine Bande knapp unter 50 kDa detektiert. Diese mögliche Variante wurde bislang nicht beschrieben, es kann keine Aussage über eventuell enthaltene Introns gemacht werden. Die Insertion eines Introns könnte, über die Funktion regulatorischer ncRNA hinaus, ein PTC mit resultierendem NMD bewirken (Busi und Cresteil, 2005; De Rosa et al., 2007). Auch unter diesem Aspekt könnte die niedrige 24OHase-Proteinexpression bei gleichzeitig hohem mRNA-Level im malignen Ovarialgewebe erklärt werden.

Darüber hinaus muss bedacht werden, dass in den Untersuchungen zur mRNA- und Proteinexpression unterschiedliche Abschnitte des 24OHase-Enzyms detektiert wurden. Der im Western Blot verwendete Primär-Antikörper bindet an den Proteinabschnitt mit den Aminosäuren 100-150 und somit an Exon 2 des 24OHase-Proteins. Die bei der Real Time-PCR eingesetzten Primer hingegen binden an Exon 7 (Forward-Primer) bzw. an Exon 9 (Reverse-Primer) und detektieren somit alle Varianten der 24OHase, die Exon 8 aufweisen. Wie in Abschnitt 1.6.2.2 beschrieben, detektierten Ren et al. in humanen monozytischen Zellen eine Splice-Variante der 24OHase, in der die Exons 1 und 2 fehlten (Ren et al., 2005). Das maligne Ovarialgewebe könnte in Makrophagen des entzündlichen

Infiltrats ebenfalls diese Splice-Variante aufweisen. Die Abwesenheit von Exon 2 würde dazu führen, dass das Enzym zwar mittels Real Time-PCR, hingegen nicht im Western Blot nachgewiesen wurde, wodurch sich die differenten Ergebnisse der Untersuchungsmethoden erklären würden. Neben diesen qualitativen Differenzen müssen wiederum Ungenauigkeiten und Differenzen der unterschiedlichen quantitativen Messmethoden berücksichtigt werden (siehe Abschnitt 5.2).

Die Untersuchungsergebnisse zur qualitativen und quantitativen 24OHase-Expression lassen die Vermutung zu, dass die Verfügbarkeit von Calcitriol im malignen Ovar limitiert ist. Dabei sind insbesondere Aussagen zu Splice-Varianten des Enzyms rein spekulativ bzw. beziehen sich auf die Ergebnisse externer Studien. Um hier Klarheit zu erlangen, wäre sinnvoll und nötig, in Zelllinien und im Gewebe eine Klonierung und Sequenzierung des 24OHase-Gens durchzuführen, um mögliche Splice-Varianten des Enzyms zu detektieren. Die Translation Introns enthaltener Splice-Varianten müsste wiederum durch shRNA gehemmt werden, um eine mögliche regulatorische Funktion der Varianten zu belegen. Weiterhin müsste eine Aktivitätsmessung des Enzyms durchgeführt werden, um die Funktionalität der 24OHase in malignem und benignem Ovar beurteilen und ggf. mit spezifischen Splice-Varianten in Zusammenhang bringen zu können.

5.3 Zusammenhang zwischen 1α OHase und 24OHase in benignem und malignem Ovarialgewebe sowie in Ovarialkarzinomzelllinien

Die antiproliferativen Effekte von Calcitriol können in malignen Zellen durch verschiedene Mechanismen vermindert sein. Die 1α OHase-Expression kann herunterreguliert, die 24OHase-Expression hochreguliert oder die Expression des VDR herabgesetzt sein (Bouillon et al., 2006). Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur 1α OHase- und 24OHase-Expression im Zusammenhang betrachtet und diskutiert werden. Ergänzende Aussagen zur VDR-Expression werden der Literatur zu entsprechenden Untersuchungen entnommen.

Die in OVCAR-3 detektierte 1α OHase-Splice-Variante ist katalytisch inaktiv und könnte die Expressionserhöhung des Enzyms als eine kompensatorische Regulation erklären. Die

erhöhte 24OHase-Expression führt möglicherweise zu einem verstärkten Calcitriol-Abbau. Zusammen mit einem in ovariellen Epithelzellen niedrigen VDR-Level (Ahonen et al., 2000) resultiert somit über mehrere Mechanismen eine Limitierung der antiproliferativen Calcitriol-Effekte in OVCAR-3. In HGL5 und COV434 ist die Expression der 1α OHase-mRNA erhöht, hingegen nicht die 1α OHase-Proteinexpression. Detektierte Splice-Varianten stellen Nonsense-Mutationen dar und könnten die Proteinstabilität und Funktionalität des 1α OHase-Enzyms vermindern. Zusätzlich ist in HGL5 die 24OHase-Proteinexpression stark erhöht und der Calcitriol-Abbau demnach vermutlich verstärkt. Verfügbarkeit und Wirkung von Calcitriol könnten demnach auch in diesen Zellen trotz eines relativ zu epithelialen Ovarialzellen stärker exprimierten VDR (Ahonen et al., 2000) limitiert sein. Die 1α OHase-Proteinexpression ist in malignem Gewebe leicht vermindert, vermutlich durch eine herabgesetzte Proteinstabilität. Auch eine mögliche Herunterregulierung des Enzyms durch ncRNA aus Makrophagen wurde diskutiert. Das Expressionslevel der 24OHase-mRNA ist in malignem Gewebe stark erhöht, die Proteinexpression könnte u. a. durch nicht detektierbare Splice-Varianten ohne Exon 2 vermindert sein. Diese von Ren et al. beschriebene, katalytisch inaktive 24OHase-Splice-Variante kann Calcitriol nicht abbauen, die Calcitriol-Wirkung jedoch durch Bindung von Vitamin D-Metaboliten limitieren (Ren et al., 2005). Sowohl die erhöhte 24OHase-mRNA, als auch möglicherweise vorliegende Splice-Varianten des Enzyms könnten demnach eine Verminderung von Calcitriol im Ovarialkarzinom nach sich ziehen. Der VDR ist in malignem Ovarialgewebe stark hochreguliert (Anderson et al., 2006), die wachstumshemmenden Effekte durch Calcitriol dürften durch die verminderte Calcitriol-Verfügbarkeit dennoch vermindert sein.

5.4 Ausblick

Ein Einfluss von Calcitriol auf die Karzinomgenese ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Vitamin D-Analoga wie das Deltanoid-Derivat EB1089 hemmen das Wachstum verschiedener Tumoren effektiver als Calcitriol und zeichnen sich durch wesentlich geringere hyperkalzämische Nebenwirkungen aus. OVCAR-3 zeigen eine besonders hohe Sensitivität für die wachstumshemmende Effekte von EB1089 (Audo et al., 2003). Der bisherige Einsatz von Calcitriol-Analoga in der Karzinomtherapie zeigte nicht die gewünschten Erfolge, zum Teil könnte dies mit falschen Dosierungsschemata zu erklären sein (Trump et al., 2005).

5 Diskussion

In zahlreichen Beobachtungsstudien wurde eine inverse Korrelation zwischen dem Vitamin D-Status und der Inzidenz verschiedener Karzinome beschrieben (siehe Abschnitt 1.7.2). Diese Studien können Hypothesen generieren, jedoch keine Kausalitäten belegen. Zudem müsste in die Analyse der Einfluss möglichst vieler, das Erkrankungsrisiko modifizierender Faktoren – wie z. B. das Alter der Frauen und ihre genetische Disposition - berücksichtigt werden.

Mechanismen, mit denen Vitamin D das Karzinomrisiko senken kann, sind durchaus bekannt. Dazu gehören u. a. die Induktion von Apoptose sowie die Zelldifferenzierung und Angiogenesehemmung. Auch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen z. T. darauf hin, dass Veränderungen im Vitamin D-Metabolismus eine Rolle in der Entstehung und Progression des Ovarialkarzinoms spielen könnten. Um die Zweifel bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Vitamin D und der Karzinomentstehung zu beseitigen, müssten kontrollierte Interventionsstudien durchgeführt werden, obgleich dabei der Einfluss von Calcitriol-Analoga und nicht die Wirkung natürlicher Vitamin D-Metaboliten untersucht würde (Grant, 2006).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen des klassischen Vitamin D-Metabolismus katalysiert eine renal exprimierte 1α OHase die Calcitriolsynthese. Eine extrarenale 1α OHase-Expression ist seit vielen Jahren bekannt, der Einfluss des lokal gebildeten Calcitriols auf Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung ist unumstritten. Die hier durchgeführten Untersuchungen konzentrierten sich auf das Schlüsselenzym des Vitamin D-Stoffwechsels 1α OHase sowie auf das die Vitamin D-Metaboliten abbauende Enzym 24 OHase. Mögliche qualitative und quantitative Differenzen in den Enzym-Expressionen zwischen Ovarialkarzinom und gesundem Ovar sollten aufgezeigt werden. Eine im malignen Ovar möglicherweise herabgesetzte Verfügbarkeit und Wirkung von Calcitriol könnte dazu führen, dieses zur Prävention und Therapie des Ovarialkarzinoms einzusetzen.

Die Untersuchungen wurden an der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR-3 und an den malignen Granulosazellen HGL5 und COV434 durchgeführt und die Ergebnisse zu denen aus benignen Granulosazellen in Beziehung gesetzt. Proben aus benignem und malignem Ovarialgewebe wurden miteinander verglichen. Die Expressionen der 1α OHase und der 24 OHase wurden qualitativ und quantitativ mittels Real Time-PCR und Western Blot untersucht. Die Untersuchungen zur 1α OHase beinhalteten zusätzlich eine qualitative Nested Touchdown-PCR sowie eine Klonierung und Sequenzierung des 1α OHase-Gens.

Sowohl in den Zelllinien als auch im Gewebe wurden Splice-Varianten der 1α OHase detektiert, die ihrer mRNA-Struktur zufolge katalytisch inaktive Formen des Enzyms darstellen. Dabei wurde das alternativ gesplice Enzym überwiegend im malignen Ovar detektiert. Die Expression sowohl der 1α OHase als auch der 24 OHase war in fast allen malignen Zellen erhöht. In malignem Gewebe waren die Enzymexpressionen mit Ausnahme einer erhöhten 24 OHase-mRNA vermindert.

Eine in den malignen Ovarial-Zelllinien erhöhte 1α OHase-Expression könnte eine Kompensation katalytisch inaktiver Splice-Varianten des Enzyms darstellen. Die im Gewebe verminderte 1α OHase-Expression kann multiple Ursachen haben, u. a. eine durch das alternative Splicen verminderte Proteinstabilität sowie der Einfluss regulatorisch wirkender 1α OHase-Splice-Varianten, die möglicherweise in Makrophagen des

6 Zusammenfassung

entzündlichen Infiltrats exprimiert werden. Eine erhöhte 24OHase-Expression in den malignen Zelllinien weist auf einen verstärkten Calcitriol-Abbau hin. Die abweichenden Ergebnisse der Gewebeuntersuchungen können zum Teil wiederum aus einer verminderten Proteinstabilität resultieren. Auch die Detektion differenter Abschnitte des 24OHase-Enzyms in den verschiedenen Untersuchungsverfahren könnte die abweichenden Ergebnisse erklären.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen auf einen im Ovarialkarzinom veränderten Vitamin D-Metabolismus mit einer z.T. geringeren Verfügbarkeit von Calcitriol hin. Die gewonnenen Daten müssten durch Studien zu 24OHase-Splice-Varianten und zur Aktivität der untersuchten Enzyme in benignem und malignem Ovar weiter untersucht werden. In Zukunft könnten sich durch Calcitriol bzw. Analoga oder durch gezielten Einfluss auf die in den Vitamin D-Metabolismus involvierten Enzyme neuartige Ansätze zur Prävention und Therapie des Ovarialkarzinoms ergeben.

Literaturverzeichnis

Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, Singer FR: Metabolism of 25-hydroxyvitamin D₃ by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Invest* 72 (5), 1856-1860 (1983)

Ahonen MH, Zhuang YH, Aine R, Ylikomi T, Tuohimaa P: Androgen receptor and vitamin D receptor in human ovarian cancer: growth stimulation and inhibition by ligands. *Int J Cancer* 86, 40-46 (2000)

Albertson DG, Ylstra B, Se Graves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo W-L, Gray JW, Pinkel D: Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 25, 144-146 (2000)

Aletti GD, Gallenberg MM, Cliby WA, Jatoi A, Hartmann LC: Current management strategies for ovarian cancer. *Mayo Clin Proc* 82, 751-770 (2007)

Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB: Rescue of the skeletal phenotype of Vitamin D-receptor ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* 140, 4982-4987 (1999)

Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR: Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 234-240 (2006)

Audo I, Darjatmoko SR, Schlamp CL, Lokken JM, Lindstrom MJ, Albert DM, Nickells RW: Vitamin D analogues increase p53, p21 and apoptosis in a xenograft model of human retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4192-4199 (2003)

Bareis P, Bises G, Bischof MG, Cross HS, Peterlik M: 25-Hydroxyvitamin D metabolism in human colon cancer cells during tumor progression. *Biochem Biophys Res Commun* 285 (4), 1012-1017 (2001)

Literaturverzeichnis

Barletta F, Dawan P, Christakos S: Integration of hormone signaling in the regulation of human 25(OH)D₃ 24-hydroxylase transcription. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (4), 598-608 (2004)

Batista LI, Lu HL, Beahm EK, Arum BK, Bodurka DC, Meric-Bernstam F: Coordinated prophylactic surgical management for women with hereditary breast-ovarian cancer syndrome. *BMC Cancer* 8:101 (2008)

Battegay E, Hunziker S, Spinas GA: Anamnese, klinischer Blick und wichtige subjektive Symptome. In: Siegenthaler W.: *Siegenthalers Differenzialdiagnose, Innere Krankheiten – vom Symptom zur Diagnose*, 19. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2005

Becker S, Cordes T, Diesing D, Diedrich K, Friedrich M: Expression of 25 hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in human endometrial tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103 (3-5), 771-775 (2007)

Beer TM, Lemmon D, Lowe BA, Henner WD: High-dose weekly oral calcitriol in patients with a rising PSA after prostatectomy or radiation for prostate carcinoma. *Cancer* 97 (5), 1217-1224, 2003

Berg JP: Stronger bonds between 25-hydroxyvitamin D 1 α -Hydroxylase and pseudovitamin D-deficiency rickets. *Eur J of Endocrinol* 138, 264-265 (1998)

Bikle DD, Chang S, Crumrine D, Elalieh H, Man MQ, Choi EH, Dardenne O, Xie Z, Arnaud RS, Feingold K, Elias PM: 25-Hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase is required for optimal epidermal differentiation and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 122 (4), 984-992 (2004)

Bland R, Walker EA, Hughes SV, Stewart PM, Hewison M: Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology* 140 (5), 2027-2034 (1999)

Literaturverzeichnis

Bouillon R, Guy E, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A: Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 156-162 (2006)

Busi F, Cresteil T: CYP3A5 mRNA degradation by nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Pharmacol* 68 (3), 808-815 (2005)

Campbell MJ, Drayson MT, Durham J, Wallington L, Siu-Caldera ML, Reddy GS, Brown G: Metabolism of 1 α ,25(OH)₂D₃ and its 20-epi analog integrates clonal expansion, maturation and apoptosis during HL-60 cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 149, 169-83 (1999)

Chatterjee, M: Vitamin D and genomic stability. *Mutat Res* 475, 69-87 (2001)

Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A: New insights into the mechanisms of Vitamin D action. *J Cell Biochem* 88 (4), 695-705 (2003)

Christakos S, Dhawan P, Shen Q, Peng X, Benn B, Zhong Y: New Insights into the mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25Dihydroxyvitamin D₃. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 194-203 (2006)

De Boland AR, Morelli S, Boland R: Evidence for involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent protein kinase in the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated rapid stimulation of intestinal calcium transport, (transcaltachia). *Endocrinology* 127, 39-45 (1990)

De Rosa M, Morelli G, Cesaro E, Duraturo F, Turano M, Rossi GB, Delrio P, Izzo P: Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in the regulation of a new adenomatous polyposis coli transcript. *Gene* 395 (1), 8-14 (2007)

Diesel B, Seifert M, Radermacher J, Fischer U, Tilgen W, Reichrath J, Meese E: Towards a complete picture of splice variants of the gene for 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase in brain and skin cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 527-532 (2004)

Literaturverzeichnis

Dowdy SC, Stefanek M, Hartmann LC: Surgical risk reduction: prophylactic salpingo-oophorectomy and prophylactic mastectomy. *Am J Obstet Gynecol* 191, 1113-1123 (2004)

Ellison TI, Eckert RL, Mac Donald PN: Evidence for 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-independent transactivation by the vitamin D receptor. *J Biol Chem* 282 (15), 10953-10962 (2007)

El-Khwsy FS, Maghraby HK, Rostom YA, Abd El-Rahman AH: Multivariate analysis of reproductive risk factors for ovarian cancer in Alexandria, Egypt. *J Egypt Natl Canc Inst* 18 (1), 30-34 (2006)

Engel J, Schubert-Fritsche G: Epidemiologie. In: Kuhn W.: *MANUAL, Maligne Ovarialtumoren, Empfehlungen zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 6. Auflage, W. Zuckerschwedt Verlag München, 2001

Evans KN, Taylor H, Zehnder D, Kilby MD, Bulmer JN, Shah S, Adams JS, Hewison M: Increased Expression of 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase in dysgerminomas. *Am J Pathol* 165 (3), 807-813 (2004)

Fraser D, Kooh S, Kind P, Holick M, Tanaka Y, De Luca H: Pathogenesis of hereditary vitamin D-dependent rickets. An inborn error of vitamin D metabolism involving defective conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med* 289, 817-822 (1973)

Friedrich M, Diesing D, Cordes T, Fischer D, Becker S, Chen TC, Flanagan JN, Tangpricha V, Gherson I, Holick MF, Reichrath J: Analysis of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase in normal and malignant breast tissue. *Anticancer Res* 26, 2615-2620 (2006)

Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, Portale AA: Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol. Endocrinol* 11 (13), 1961-1970 (1997)

Literaturverzeichnis

Garland CF, Mohr SB, Gorham ED, Grant WB, Garland FC: Role of Ultraviolet B Irradiance and Vitamin D in prevention of ovarian cancer. *Am J Prev Med* 31(6), 512–514 (2006)

Gertig DM, Hunter DJ, Cramer DW, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hankinson SE: Prospective study of talc use and ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 92 (3), 249-252 (2000)

Grant WB: Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol* 92, 65-79 (2006)

Haderslev KV, Jeppesen PB, Sorensen HA, Mortensen PB, Staun M: Vitamin D status and measurements of markers of bone metabolism in patients with small intestinal resection. *Gut* 52 (5), 653-658 (2003)

Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A: Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 22 (2), 142-146 (2003)

Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, Modlin RL, Adams JS: Extra-renal 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 316-321 (2007)

Høgdall E: Cancer antigen 125 and prognosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20 (1), 4-8 (2008)

Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ: Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85, 373-422 (2005)

Hsu JY, Feldman D, McNeal E, Peehl DM: Reduced 1 α -hydroxylase activity in human prostate cancer cells correlates with decreased susceptibility to 25-hydroxyvitamin D₃-induced growth inhibition. *Cancer Res* 61 (7), 2852-2856 (2001)

Huhtaniemi I, Rulli S, Ahtiainen P, Poutanen M: Multiple sites of tumorigenesis in transgenic mice overproducing hCG. *Mol Cell Endocrinol* 234 (1-2), 117-126 (2005)

Literaturverzeichnis

Huncharek M, Geschwind JF, Kupelnick B: Perineal application of cosmetic talc and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of 11,933 subjects from sixteen observational studies. *Anticancer Res* 23 (2C), 1955-1960 (2003)

Johnson CS, Muindi JR, Hershberger PA, Trump DL: The Antitumor Efficacy of Calcitriol: Preclinical Studies. *Anticancer Res* 26, 2543-2550 (2006)

Jonat W, Bauerschlag D, Schem C, Maass-Poppenhusen K, Maass N, Löning M, Friedrich M, Lehmann-Willenbrock E, Bonatz G, Pfisterer J, Schollmeyer Th, Kiechle M: Gut- und bösartige gynäkologische Tumoren. In: *Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schultze-Mosgau A, Schneider K-TM, Weiss JM: Gynäkologie und Geburtshilfe, 2. Auflage, Kap. 11.7, 249-255, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007*

Kauff ND, Domchek SM, Friebel TM, Robson ME, Lee J, Garber JE, Isaacs C, Evans DG, Lynch H, Eeles RA, Neuhausen SL, Daly MB, Matloff E, Bum J, Sabbatini P, Barakat RR, Hudis C, Norton L, Offit K, Rebbeck TR: Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2- associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study. *J Clin Oncol* 26 (8), 1331-1337 (2008)

Kerry DM, Dwivedi PP, Hahn CN, Morris HA, Ohmdahl JL, May BK: Transcriptional synergism between vitamin D-responsive elements in the rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase (CYP24) promoter. *J Biol Chem* 271 (47), 29715-29721 (1996)

Kim HS, Park NH, Chung HH, Kim JW, Song YS, Kang SB: Serum CA-125 level after 6 cycles of primary adjuvant chemotherapy is a useful prognostic factor for complete responders' survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Onkologie* 31 (6), 315-320 (2008)

King MC, Marks JH, Mandell JB: Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302, 643-646 (2003)

Literaturverzeichnis

Labuda M, Labuda D, Korab-Laskowska M, Cole D, Zietkiewicz E, Weissenbach J, Popowska E, Pronicka E, Root AW, Glorieux FH: Linkage disequilibrium analysis in young populations: Pseudo-vitamin D-deficiency rickets and the founder effect in French Canadians. *Am J Hum Genet* 59, 633-643 (1996)

Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heany RP: Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 85 (6), 1586-1591 (2007)

Lareau LF, Green RE, Bathnagar RS, Brenner SE: The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* 14, 273-282 (2004)

Lax S, Dietel M, Löning Th, Böcker W: Weibliche Geschlechtsorgane. In: Böcker W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*, 3. Auflage, Kap. 39.1, 909-918, Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag, München, 2004

Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, Demay MB: Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor ablated mice. *Endocrinology* 139, 4391-4396 (1998)

Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4), 402-408 (2001)

Luong KV, Nguyen LT: The beneficial role of vitamin D and its analogs in cancer treatment and prevention. *Crit Rev Oncol Hematol* (2009), *im Druck*

Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE: 1a,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 87, 214-220 (2000)

Mathieu C, Adorini L: The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D (3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 8, 174-179 (2002)

Literaturverzeichnis

- Mattick JS, Makunin IV: Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15 (1), 17-29 (2006)
- Miettinen S, Ahonen MH, Lou YR, Manninen T, Tuohimaa P, Syväälä H, Ylikomi T: Role of 24-Hydroxylase in Vitamin D₃ growth response of Ovar-3 ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 108, 367-373 (2004)
- Mimori K, Tanaka Y, Yoshinaga K, Masuda T, Yamashita K, Okamoto M, Inoue H, Mori M: Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann Oncol* 15, 236-241 (2004)
- Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T: Identification of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int* 58 (2), 559-68 (2000)
- Monkawa T, Yoshida T, Wakino S, Shinki T, Anazawa H, Deluca HF, Suda T, Hayashi M, Saruta T: Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 239 (2), 527-533 (1997)
- Muindi JR, Nganga A, Engler KL, Coignet LJ, Johnson CS, Trump DL: CYP24 splicing variants are associated with different patterns of constitutive and calcitriol-inducible CYP24 activity in human prostate cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 334-337 (2007)
- Neuprez A, Bruyère O, Collette J, Reginster J-Y: Vitamin D inadequacy in Belgian postmenopausal osteoporotic women. *BMC Public Health* 7:64 (2007)
- Nilson JH, Abbud RA, Keri RA, Quirk CC: Chronic hypersecretion of luteinizing hormone in transgenic mice disrupts both ovarian and pituitary function, with some effects modified by the genetic background. *Recent Prog Horm Res* 55, 69-89 (2000)
- Ogunkolade BW, Boucher B, Fairclough PD, Hitman GA, Dorudi S, Jenkins PJ, Bustin SA: Expression of 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase mRNA in individuals with colorectal cancer. *Lancet* 359 (9320), 1831-1832 (2002)

Literaturverzeichnis

Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois R, Farookhi R, Hendy GN, Goltzman D: Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (13), 7498-7503 (2001)

Peehl DM, Seto E, Hsu JY, Feldman D: Preclinical activity of ketoconazole in combination with calcitriol or the vitamin D analogue EB 1089 in prostate cancer cells. *J Urol* 168, 1483-1588 (2002)

Peterlik M, Cross HS: Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest* 35, 290-304 (2005)

Price PA, Baukol SA: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the Vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 255, 11660-11663 (1980)

Radermacher J, Diesel B, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J, Fischer U, Meese E: Expression analysis of CYP27B1 in tumor biopsies and cell cultures. *Anticancer Res* 26, 2683-2686 (2006)

Rashid SF, Mountford JC, Gombart AF, Campbell MJ: 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ displays divergent growth effects in both normal and malignant cells. *Steroids* 66, 433-40 (2001)

Ravid A, Koren R, Maron L, Liberman UA: 1,25(OH)₂D₃ increases cytotoxicity and exocytosis in lymphokine-activated killer cells. *Mol Cell Endocrinol* 196 (1-2), 133-139 (1993)

Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D; Million Women Study Collaboration: Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 335 (7630), 1107-1108 (2007)

Literaturverzeichnis

Reichel H, Koeffler HP, Norman AW: Synthesis in vitro of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25- dihydroxyvitamin D₃ by interferon-gamma-stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages. *J Biol Chem* 262 (23), 10931-10937 (1987)

Reichrath J: Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. *Exp Dermatol* 16, 618-625 (2007)

Ren S, Nguyen L, Wu S, Encinas C, Adams JS: Alternative Splicing of Vitamin D-24-Hydroxylase. *J Biol Chem* 280 (21), 20604-20611 (2005)

Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J, Nilson JH: Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1322-1326 (1995)

Rodriguez G: New insights regarding pharmacologic approaches for ovarian cancer prevention. *Hematol Oncol Clin North Am* 17 (4), 1007-1020 (2003)

Salazar-Martinez E, Lazcano-Ponce EC, Gonzalez Lira-Lira G, Escudero-De los Rios P, Hernandez-Avila M: Nutritional determinants of epithelial ovarian cancer risk: a case control study in Mexico. *Oncology* 63, 151-157 (2002)

Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA: Height, weight, weight change, and ovarian cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Am J Epidemiol* 157 (5), 424-433 (2003)

Schouten LJ, Rivera C, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Arslan A, Beeson WL, van den Brandt PA, Buring JE, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Goldbohm RA, Hankinson SE, Lacey JV jr, Leitzmann M, Lukanova A, Marshall JR, Miller AB, Patel AV, Rodriguez C, Rohan TE, Ross JA, Wolk A, Zhang SM, Smith-Warner SA: Height, body mass index, and ovarian cancer: a pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 (4), 902-912 (2008)

Literaturverzeichnis

Schwartz GG, Skinner HG: Vitamin D status and cancer: new insights. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10 (1), 6-11 (2007)

Shapses SA, Cifuentes M, Spevak L, Chowdhury H, Brittingham J, Boskey AL, Denhardt DT: Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency. *Calcif Tissue Int* 73, 86-92 (2003)

Shevde NK, Plum LA, Clagett-Dame M, Yamamoto H, Pike JW, DeLuca HF: A potent analog of 1alpha 25-dihydroxyvitamin D₃ selectively induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21), 13487-13491 (2002)

Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T: Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8253-8258 (1999)

Shimada TM, Kakitani Y, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T: Targeted ablation of FGF23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113, 561-568 (2004)

Slater SJ, Kelly MB, Taddeo FJ, Larkin JD, Yeager MD, McLane JA, Ho C, Stubbs CD: Direct activation of protein kinase C by 1,25dihydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem* 270, 6639-6643 (1995)

Sorek R, Shamir R, Ast G: How prevalent is functional alternative splicing in the human genome? *Trends Genet* 20, 68-71 (2004)

Stanojevic Z, Djordjevic B, Pajovic SB, Zivanov-Curlis J, Najman S: Molecular pathogenesis of borderline and invasive ovarian tumors *J BUON* 14 (1), 7-18 (2009)

Tanner MM, Grenman S, Koul A, Johannsson O, Meltzer P, Pejovic T, Borg A, Isola JJ: Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 6, 1833-1839 (2000)

Literaturverzeichnis

Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M: Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97 103-109 (2005)

Trump DL, Muindi J, Fakih M, Yu W-D, Johnson CS: Vitamin D compounds: Clinical development as cancer therapy and prevention agents. *Anticancer Res* 26, 2551-2556 (2006)

Tworoger SS, Gertig DM, Gates MA, Hecht JL, Hankinson SE: Caffeine, alcohol, smoking, and the risk of incident epithelial ovarian cancer. *Cancer* 112 (5), 1169-1177 (2008)

Tworoger SS, Lee I-M, Buring JE, Rosner B, Hollis BW, Hankinson SE: Plasma 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D and risk of incident ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16 (4), 783-788 (2007)

Ustianowski A, Shaffer R, Collin S, Wilkinson RJ, Davidson RN: Prevalence and associations of vitamin D deficiency in foreign-born persons with tuberculosis in London. *J Infect* 50 (5), 432-437 (2005)

van den Berg-Bakker CA, Hagemeyer A, Franken-Postma AM, Smit VT, Kuppen PJ, van Ravenswaay Claasen HH, Cornelisse CJ, Schrier PI: Establishment and characterization of 7 ovarian cancer cell lines and one granulosa tumor cell line: growth features and cytogenetics. *Int J Cancer* 53 (4), 613-620 (1993)

Van Nagell JR, De Priest PD, Ueland FR, De Simone CP, Mc Donald JM, Pavlik EJ, Kryscio RJ: Ovarian cancer screening with annual transvaginal sonography: findings of 25,000 women screened. *Cancer* 109 (9), 1887-96 (2007)

Welsh J, Wietzke JA, Zinser G, Smyczek R, Romu S, Tribble E, Welsh JC, Byrne B, Narvaez CJ: Impact of the vitamin D₃ receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83, 85-92 (2002)

Literaturverzeichnis

Wu S, Ren S, Ngyen L, Adams JS, Hewison M: Splice variants of the CYP27b1 gene and the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production. *Endocrinology* 148 (7), 3410-3418 (2007)

Zehnder D, Bland R, Walker EA, Bradwell AR, Howie AJ, Hewison M, Stewart PM: Expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 10 (12), 2465-2473 (1999)

Zhang X, Jiang F, Li P, Li C, Ma Q, Nicosia SV, Bai W: Growth suppression of ovarian cancer xenografts in nude mice by vitamin D analogue EB1089. *Clinical Cancer Research* 11, 323-328 (2005)

Zhang X, Nicosia SV, Bai W: Vitamin D receptor is a novel drug target for ovarian cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets* 6 (3), 229-244 (2006)

Zhang Y, Coogan PF, Palmer JR, Strom BL, Rosenberg L: Cigarette smoking and increased risk of mucinous epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 159 (2), 133-139 (2004)

Anhang

A1. Verzeichnis der Gewebeproben mit Diagnose und Alter der Patientinnen

	Alter	Diagnose	PCR	Western Blot
Maligne				
2063	47	Gering diff. Zystadenokarzinom FIGO Ic	X	X
2102	60	Muzinöses Zystadenokarzinom FIGO IIIc	X	X
2127	60	Gering diff. muzinöses Zystadenokarzinom FIGO IIIc		X
2132	44	Gering diff. Adenokarzinom FIGO Ic	X	X
2140	69	Gering diff. serös-papilläres Adenokarzinom FIGO IIa	X	X
2141	79	Gering diff., teilweise papilläres Zystadenokarzinom FIGO IV	X	X
2212	73	Gering diff, nekrotisches, großzelliges Adenokarzinom FIGO IV		X
2398	68	Gering diff., tubulär/papilläres, großzelliges Adenokarzinom FIGO Ia	X	X
2408	38	Serös-papilläres Zystadenokarzinom FIGO IIc	X	X
2410	65	Gering diff., serös-papilläres Zystadenokarzinom FIGO IIIc	X	X
2422	88	Gering diff., serös-papilläres Zystadenokarzinom FIGO IIIc		X
2439	82	Gering diff., serös-papilläres Zystadenokarzinom FIGO IIIc	X	
2441	65	Gering diff., solide/papilläres Zystadenokarzinom FIGO IIIc	X	X
2449	81	Gering diff., Adenokarzinom FIGO IIIc	X	X
2467	54	Gering diff., serös-papilläres Adenokarzinom FIGO Ib	X	X

Anhang

2471	78	Mittelgradig diff., serös-papilläres Adenokarzinom FIGO IIIc	X	X
2523	69	Gering diff., serös-papilläres Adenokarzinom FIGO IIIc	X	X
2594	55	Gering diff., Adenokarzinom FIGO IIIc	X	X
2606	76	Mittelgradig diff., teilweise papilläres Adenokarzinom FIGO Ic		X
2628	54	Gering diff. siegelringzelliges Adenokarzinom FIGO IIIc	X	
2665	70	Gering diff. Zystadenokarzinom FIGO IIIc	X	X
Benigne				
2075	73	Muzines Zystadenom	X	X
2124	45	Teratom	X	X
2149	81	Leiomyom	X	X
2203	49	Muzines Zystadenom	X	X
2245	45	Follikelzyste, mehrere seröse Zysten		X
2250	34	Zyste		X
2255	45	Unauffälliges Ovarialgewebe	X	X
2256	45	Unauffälliges Ovarialgewebe	X	X
2280	58	Mesothelproliferation, Verwachungsstränge	X	X
2287	56	Zysten		X
2298	26	Zystisch erweiterte Follikel	X	X
2380	63	Atrophie, subseröse Einschlusszysten	X	X
2381	63	Atrophie		X
2654	49	Seröses Zystadenofibrom	X	
2656	72	Benigner Brenner-Tumor	X	
2717	74	Unauffälliges Ovarialgewebe	X	X
2748	28	Zyste	X	X
2786	29	Zyste	X	X
2799	56	Atrophie, subseröse Einschlusszysten	X	X
2802	60	Unauffälliges Ovarialgewebe	X	X

Tab A.1: Verzeichnis der verwendeten Gewebeproben mit Diagnose und Alter der Patientinnen

A2. FIGO-Klassifikation

FIGO	
0	Carcinoma in situ
I	Tumor begrenzt auf Ovarien
Ia	Tumor auf ein Ovar begrenzt. Kapsel intakt, kein Tumor auf Ovar-Oberfläche, keine malignen Zellen in Aszites/bei Peritonealspülung
Ib	Tumor auf beide Ovarien begrenzt. Kapsel intakt, kein Tumor auf Ovar-Oberflächen, keine malignen Zellen in Aszites/bei Peritonealspülung
Ic	Tumor auf ein oder beide Ovarien begrenzt, mit Kapselruptur. Tumor an Ovar-Oberfläche oder maligne Zellen in Aszites/bei Peritonealspülung
II	Tumor befällt ein Ovar oder beide und breitet sich im Becken aus
IIa	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n). Keine malignen Zellen in Aszites/bei Peritonealspülung
IIb	Ausbreitung auf andere Beckenorgane. Keine malignen Zellen in Aszites/bei Peritonealspülung
IIc	Ausbreitung in Becken (IIa oder IIb) und malignen Zellen in Aszites/bei Peritonealspülung
III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien. Mikroskopisch nachgewiesene Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
IIIa	Mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens
IIIb	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens, größte Ausdehnung 2 cm oder weniger

Anhang

IIIc	Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens, größte Ausdehnung mehr als 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
IV	Fernmetastasen

Tab. A.2: FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms (aus Jonat et al., 2007)

A3. Abbildungen zum Versuchsaufbau 1 α OHase

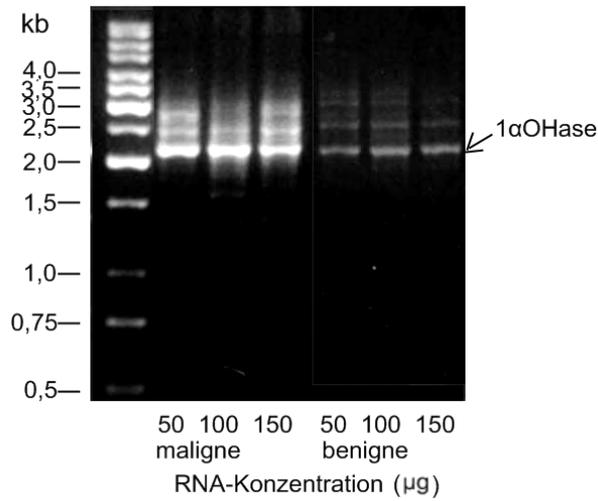


Abb. A.1: Bestimmung der optimalen RNA-Menge zur mRNA-Isolierung in malignem und benignem Ovarialgewebe (je n=1)

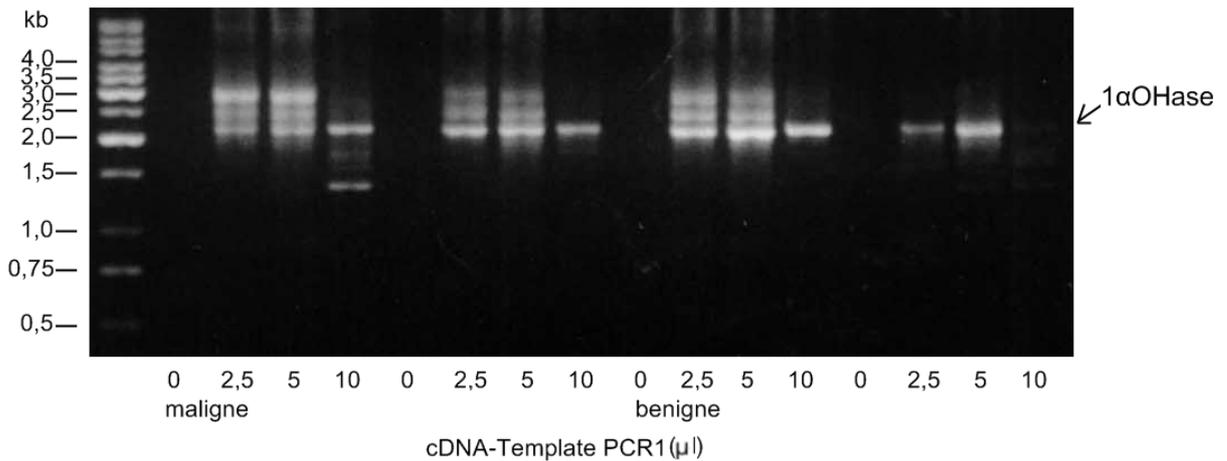


Abb. A.2: Bestimmung der optimalen cDNA-Template-Menge im ersten PCR-Schritt in malignem und benignem Ovarialgewebe (je n=2)

Anhang

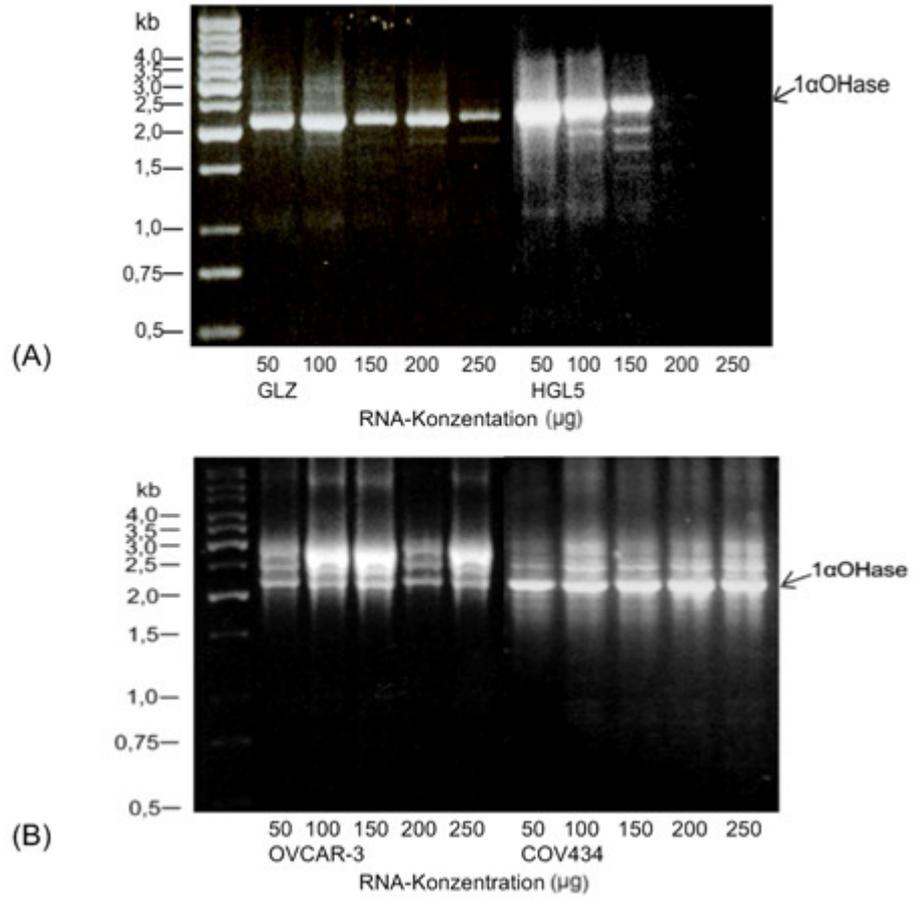


Abb. A.3: Bestimmung der optimalen RNA-Menge zur mRNA-Isolierung in GLZ/HGL5 (A) und in OVCAR-3/COV434 (B) (je n=1)

Anhang

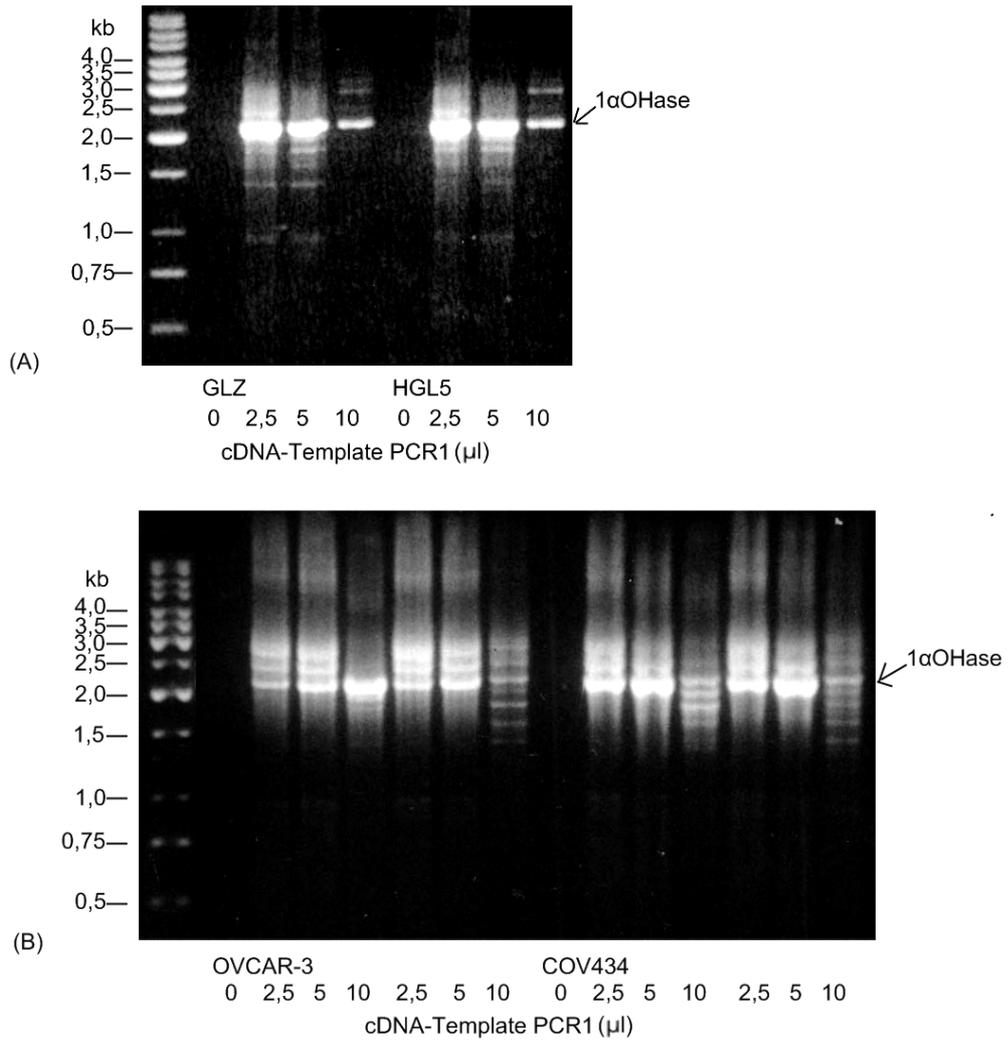


Abb. A.4: Bestimmung der optimalen cDNA-Template-Menge im ersten PCR-Schritt in GLZ/HGL5 (je n=1) (A) und in OVCAR-3/COV434 (je n=2) (B)

Anhang

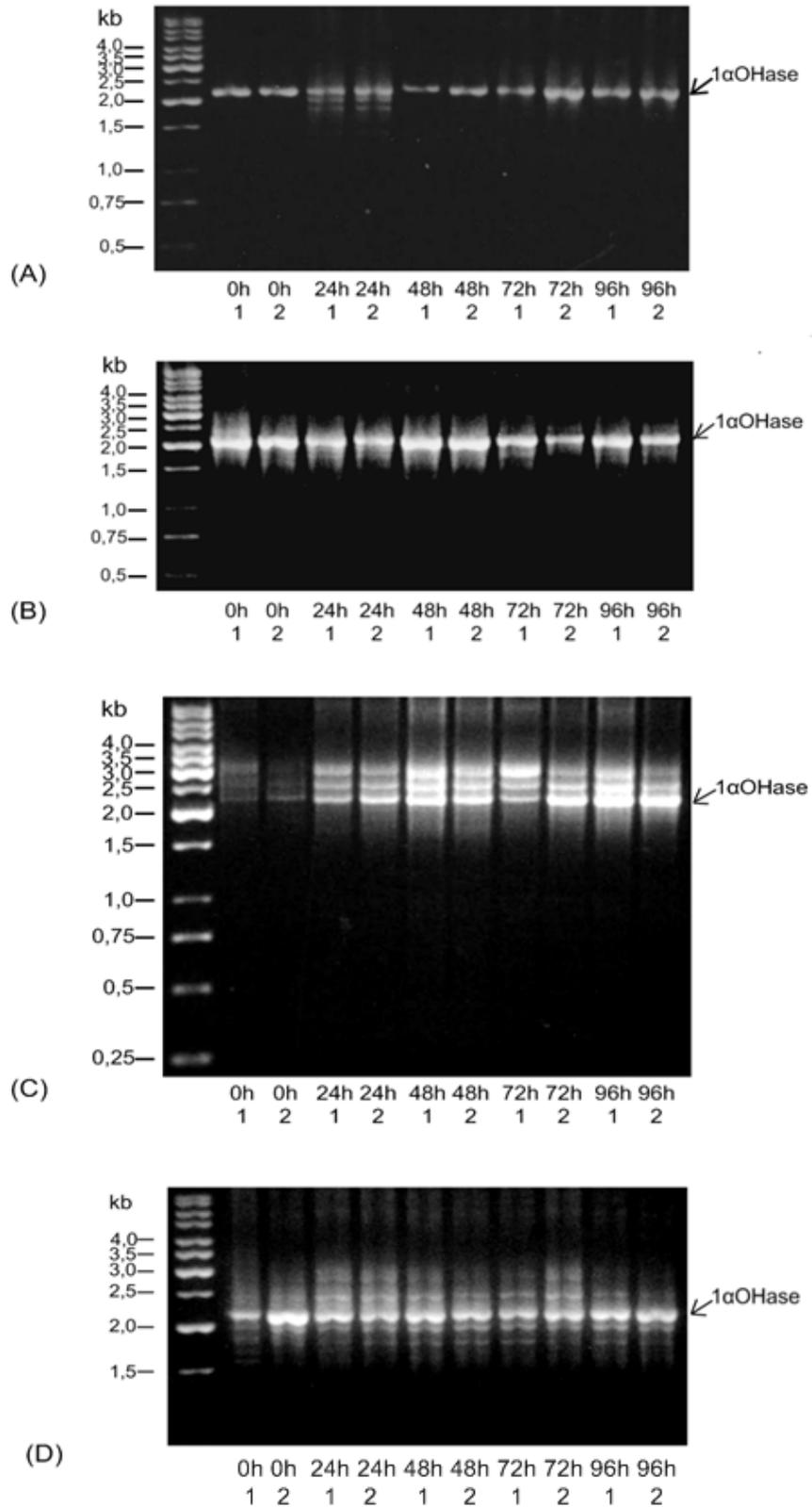


Abb. A.5: Expression der 1 α OHase und Detektion möglicher Splice-Varianten in Abhängigkeit der Zelldichte durch Untersuchung nach 0-96 h in GLZ (A), HGL5 (B), OVCA3 (C) und COV434 (D) (je n=1)

Anhang

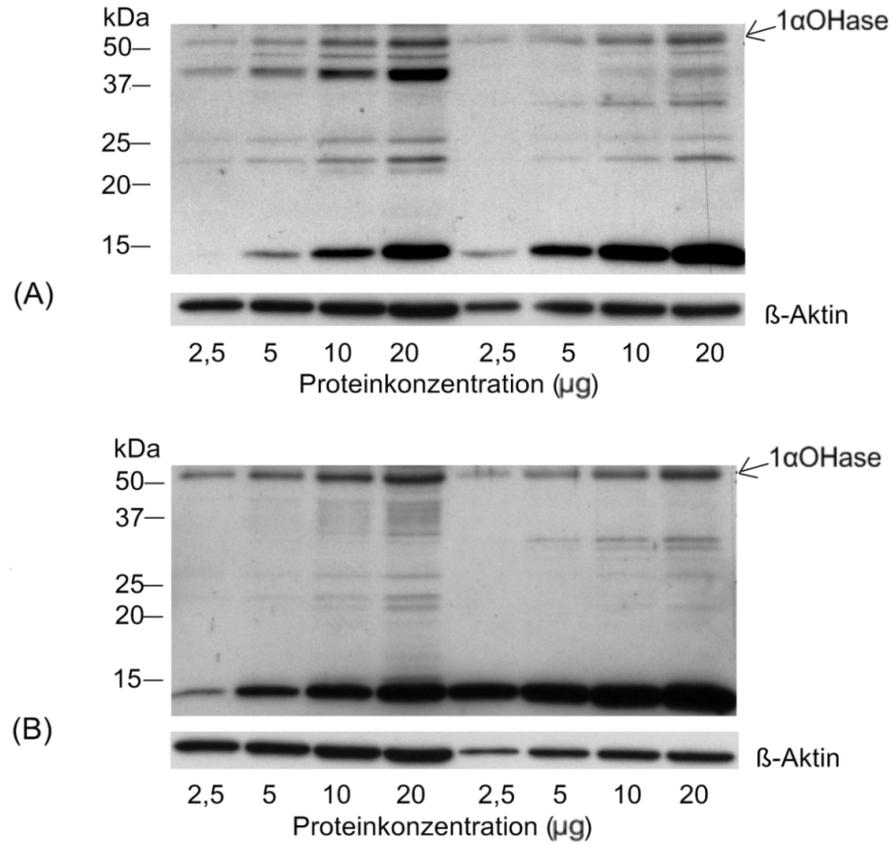


Abb. A.6: Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration in malignem (A) und benignem (B) Ovarialgewebe (je n=2)

Anhang

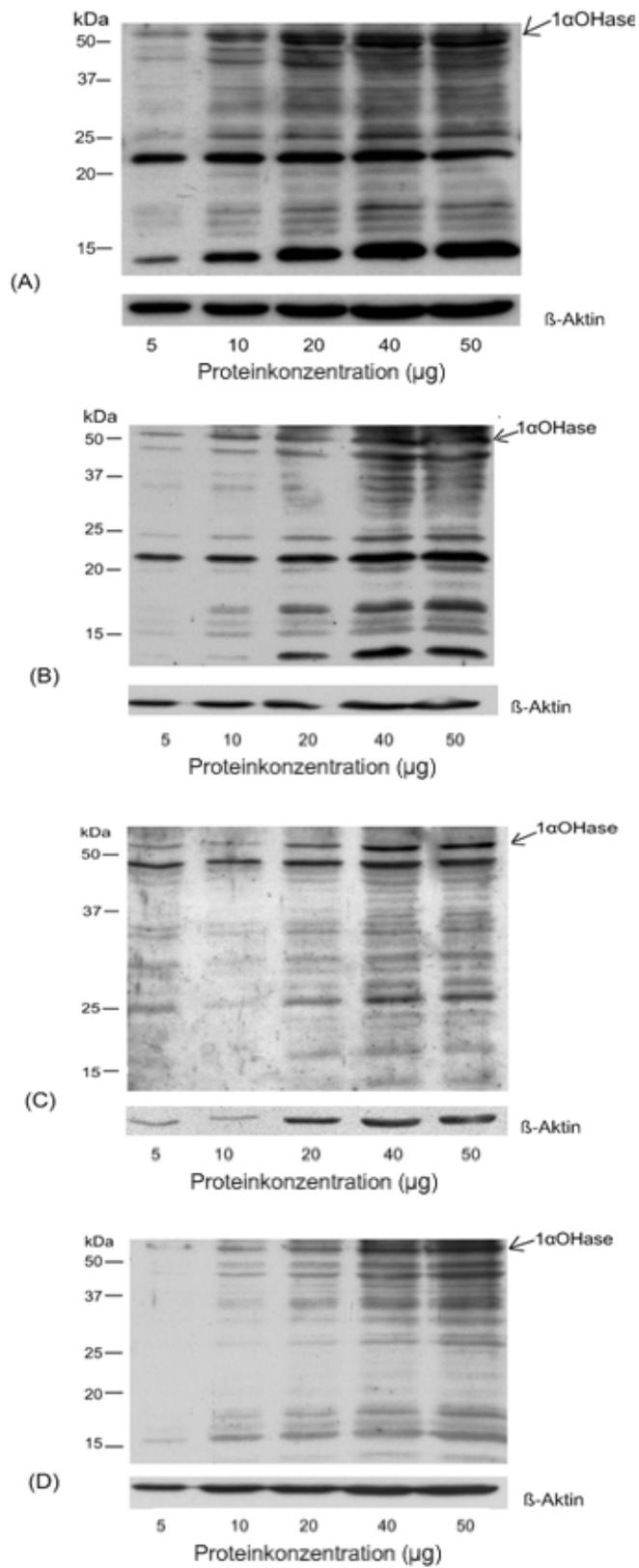


Abb. A.7: Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration in GLZ (A), HGL5 (B), OVCAR-3 (C) und COV434 (D) (je n=1)

Anhang

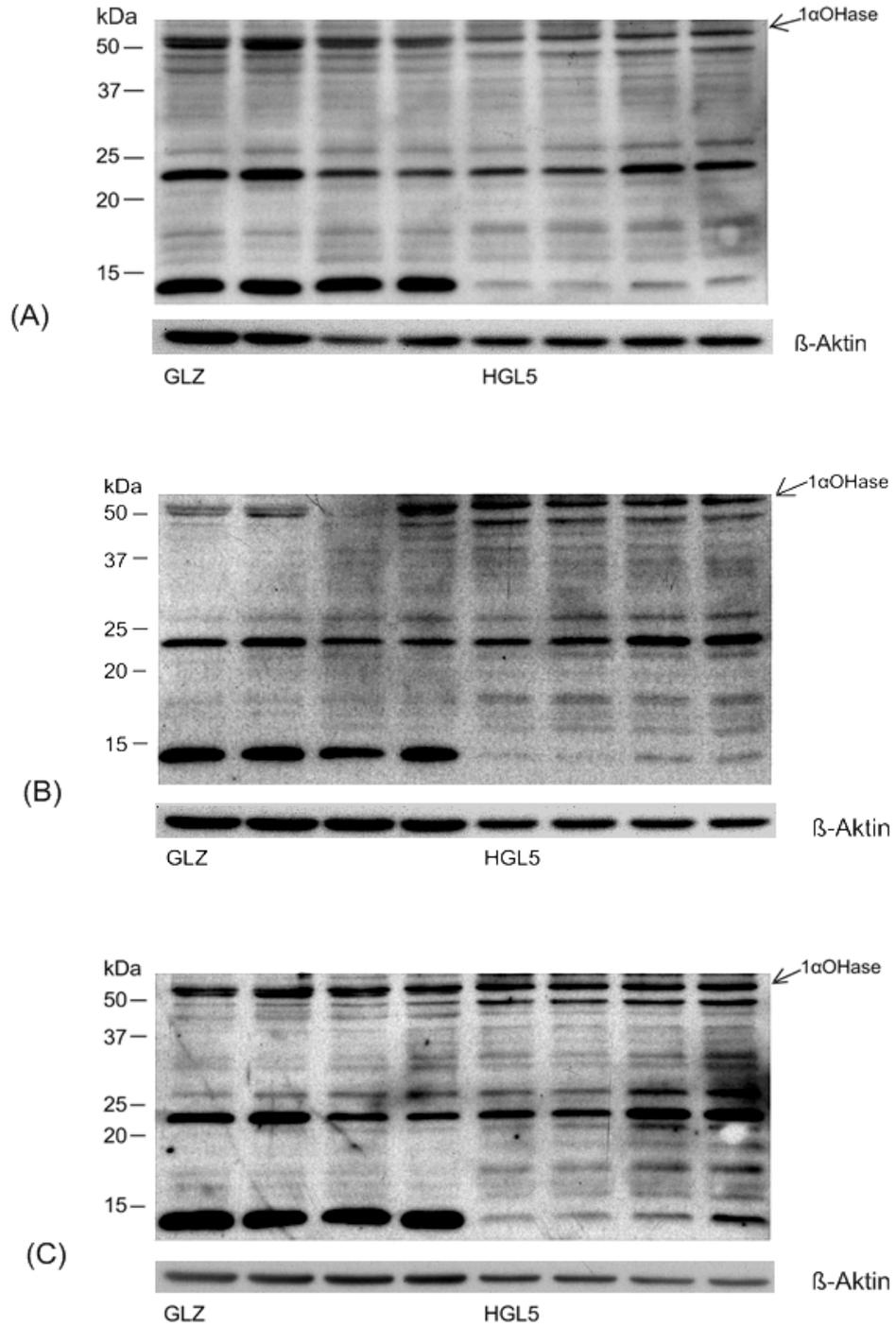


Abb. A.8: Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration in GLZ/HGL5 (je n=4) mit den Verdünnungen 1:600 (A), 1:8000 (B) und 1:12000 (C)

Anhang

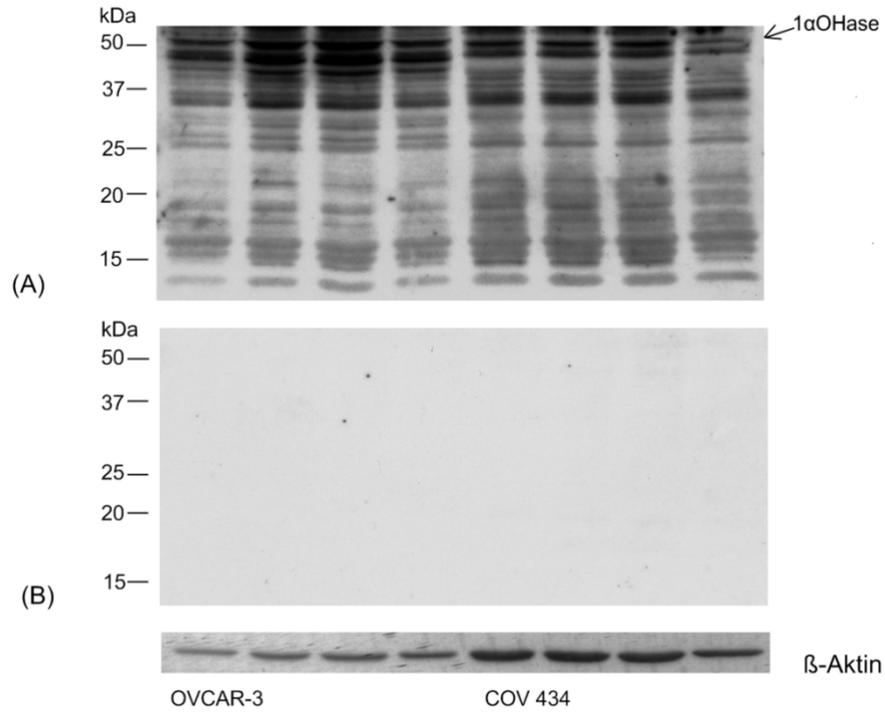


Abb. A.9: Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration in OVCAR-3/COV434 (je n=4) mit der Verdünnung 1:6000 mit Primär-Ak 1:2000 (A) und ohne Primär-Ak (B)

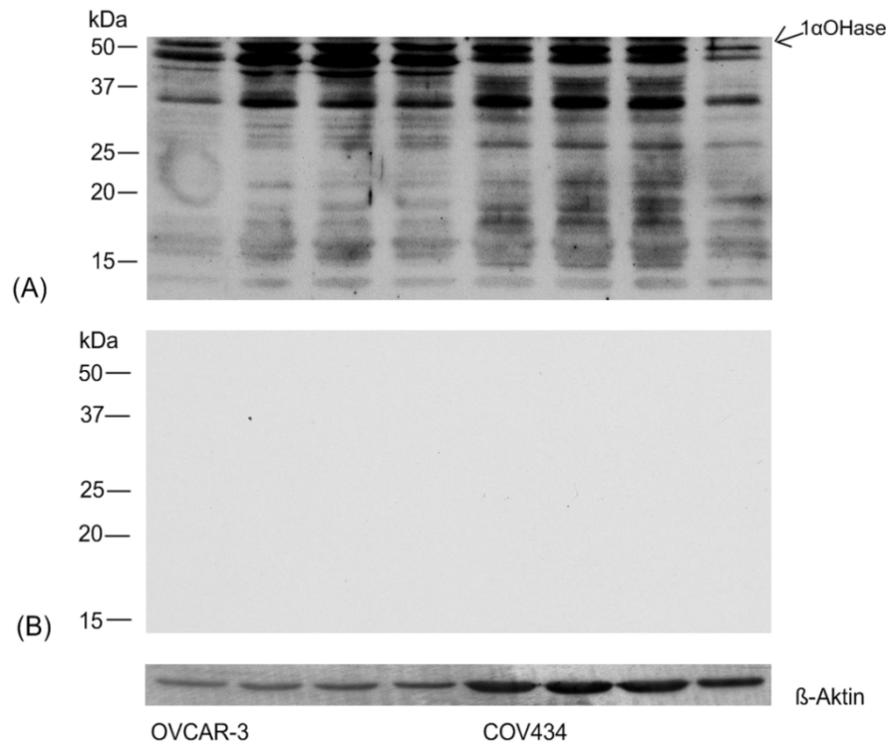


Abb. A.10: Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration in OVCAR-3/COV434 (je n=4) mit der Verdünnung 1:8000 mit Primär-Ak 1:2000 (A) und ohne Primär-Ak (B)

Anhang

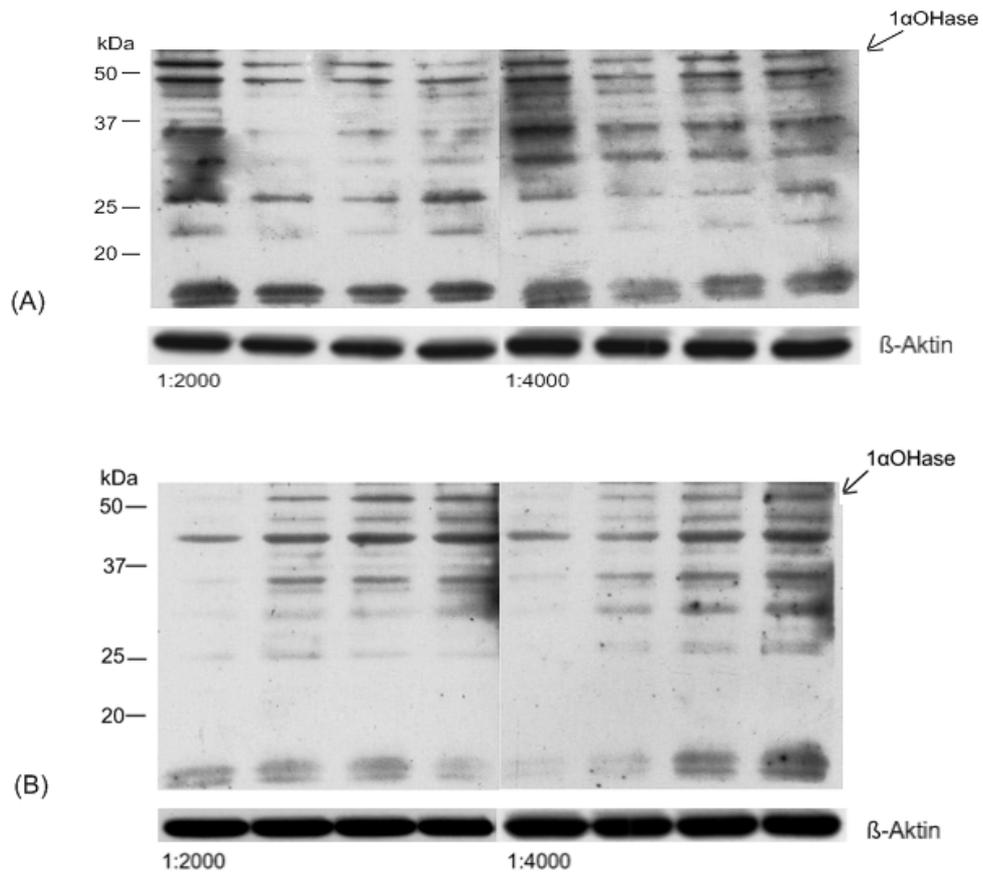


Abb. A.11: Bestimmung der optimalen Primär-Ak-Konzentration in OVCAR-3 (A) und COV434 (B) mit den Verdünnungen 1:2000 und 1:4000 (je n=4)

Anhang

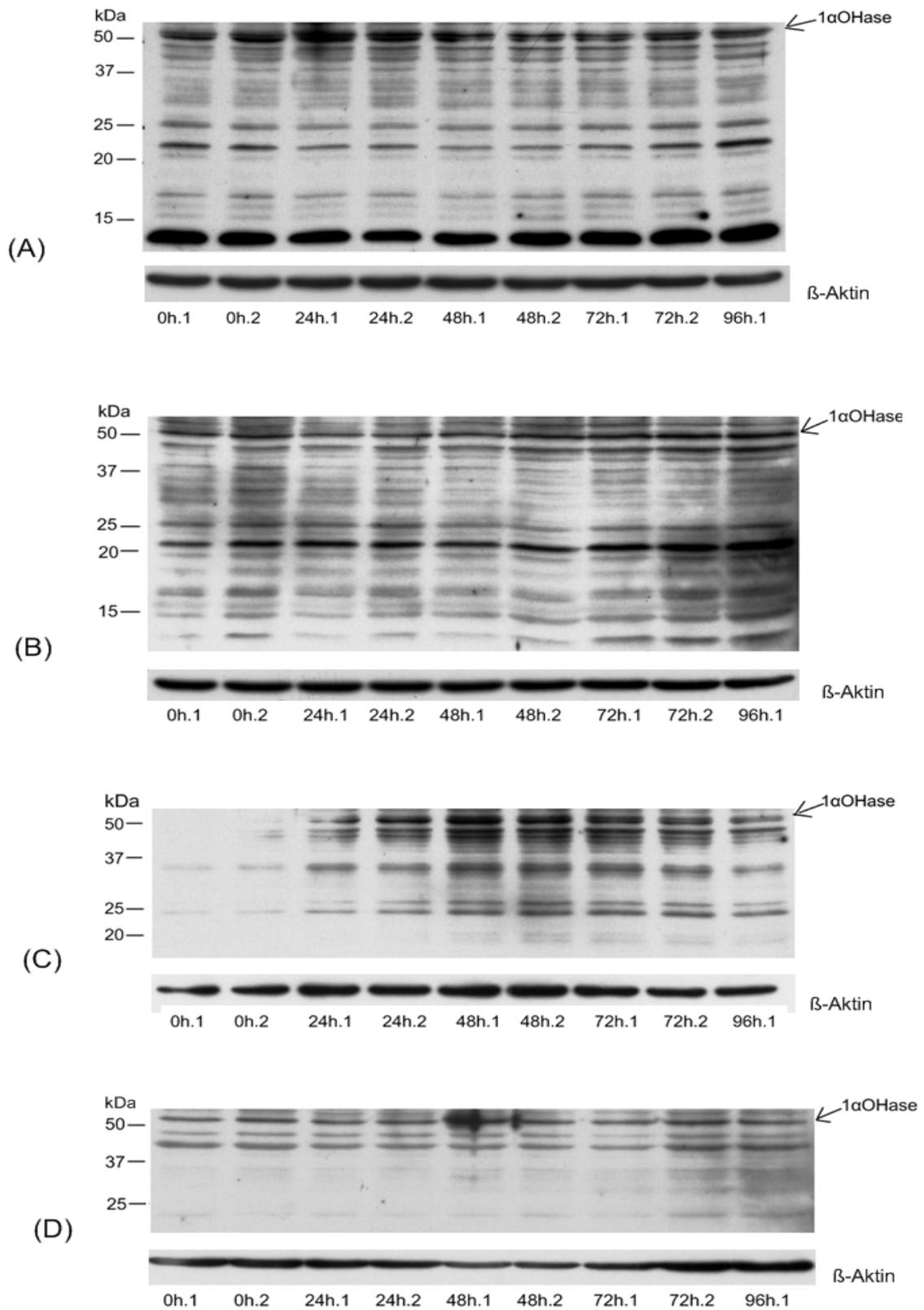


Abb. A.12: Expression der 1αOHase in Abhängigkeit der Zelldichte durch Untersuchung nach 0-96 h in GLZ (A), HGL5 (B), OVCAR-3 (C) und COV434 (D) (je n=1)

A4. Abbildungen zum Versuchsaufbau 24OHase

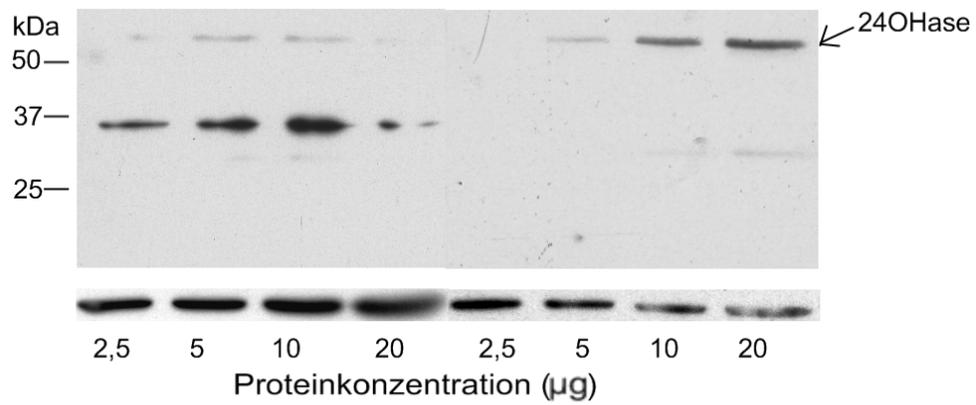


Abb. A.13: Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration in malignem und benignem Ovarialgewebe (je n=1)

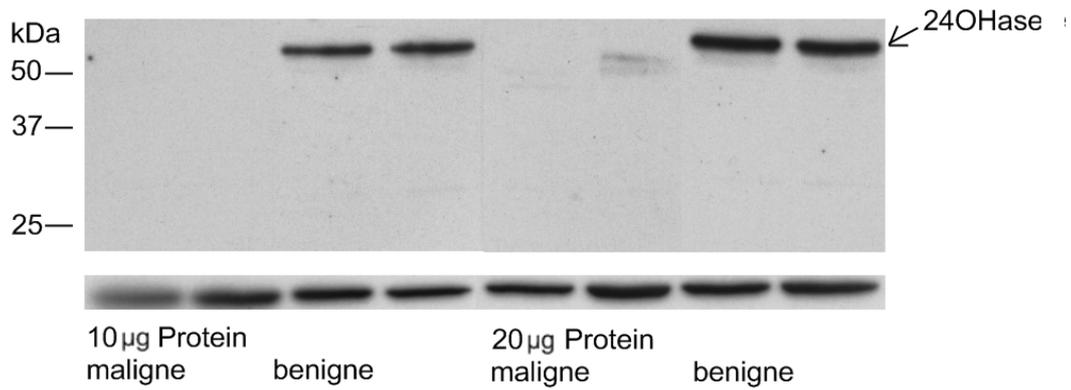


Abb. A.14: Erweiterte Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration in malignem und benignem Ovarialgewebe (je n=2)

Anhang

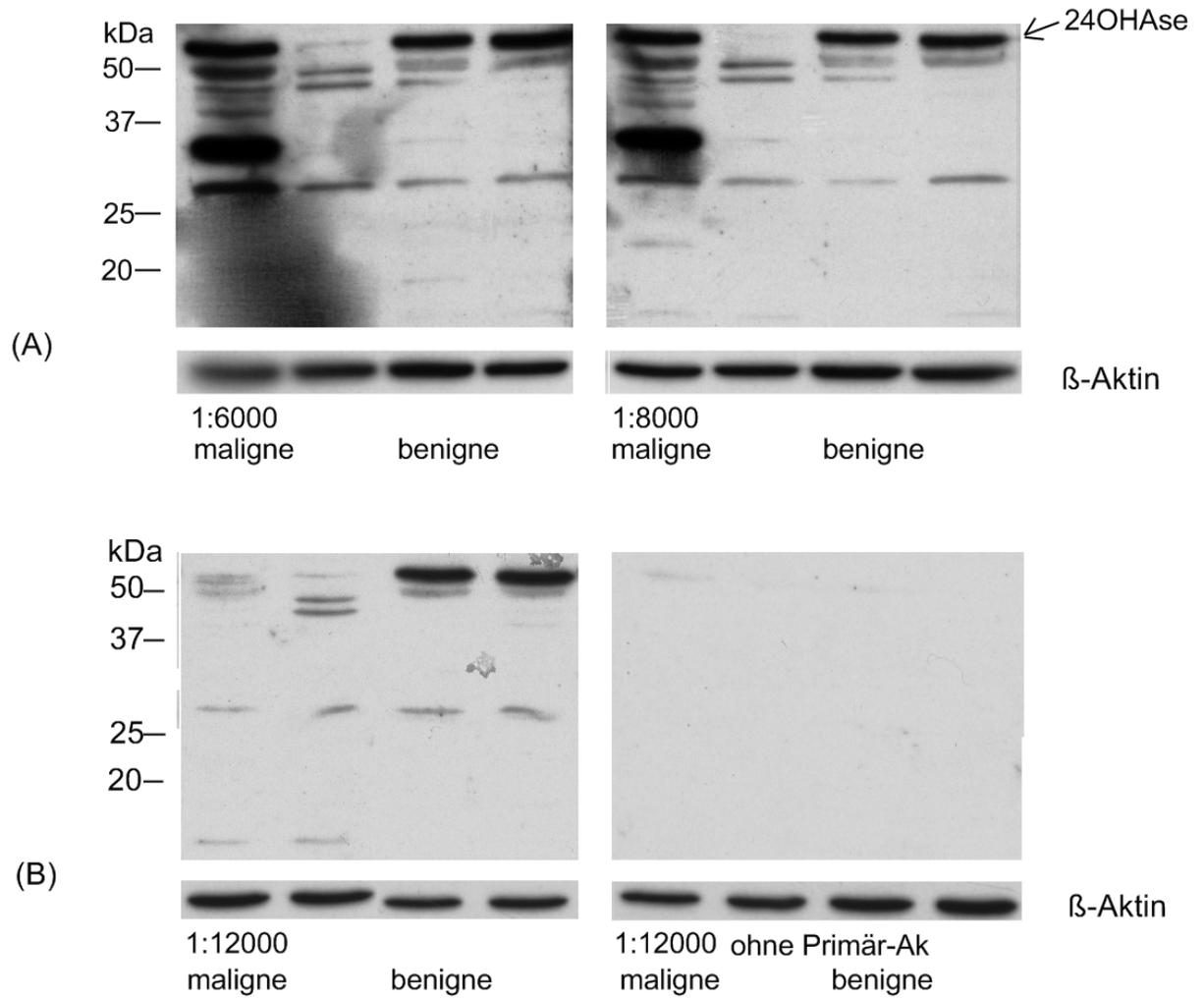


Abb. A.15: Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration in benignem und malignem Ovarialgewebe (je n=2) mit den Verdünnungen 1:6000 und 1:8000 nach Primär-Ak 1:2000 (A) und mit 1:12000 nach Primär-Ak 1:2000 und ohne Primär-Ak (B)

Anhang

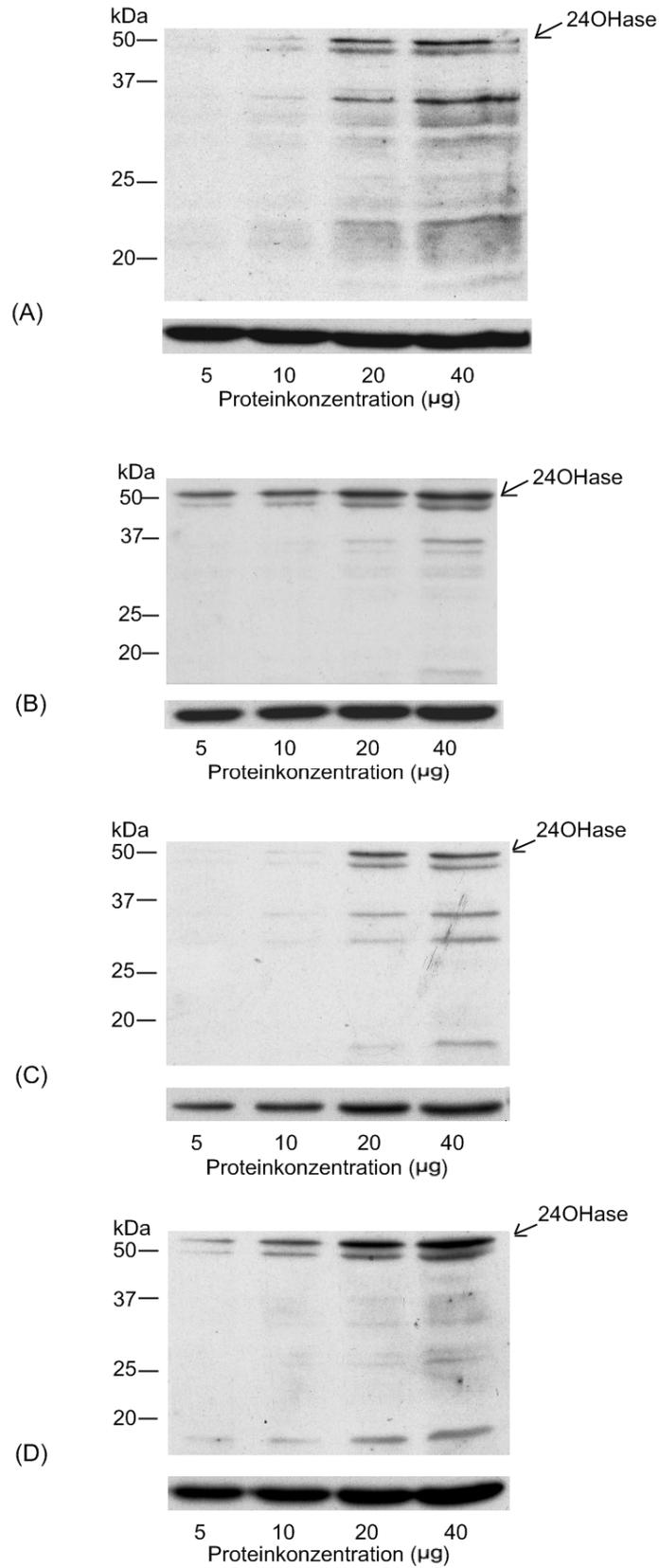


Abb. A.16: Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration in GLZ (A), HGL5 (B), OVCAR-3 (C) und COV434 (D) (je n=1)

Anhang

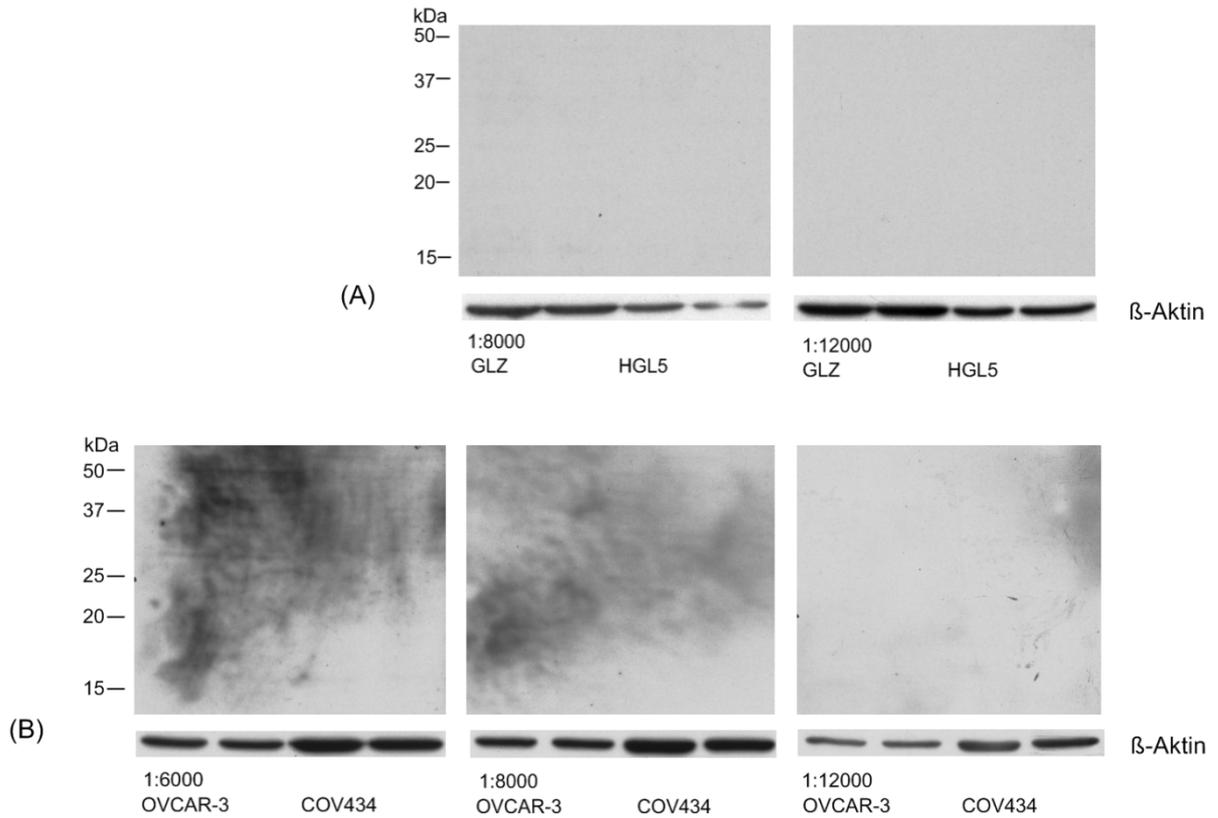


Abb. A.17: Bestimmung der optimalen Sekundär-Ak-Konzentration mit den Verdünnungen 1:8000 und 1:12000 in GLZ/HGL5 (A) und zusätzlich mit der Verdünnung 1:6000 in OVCAR-3/COV434 (B) (je n=2)

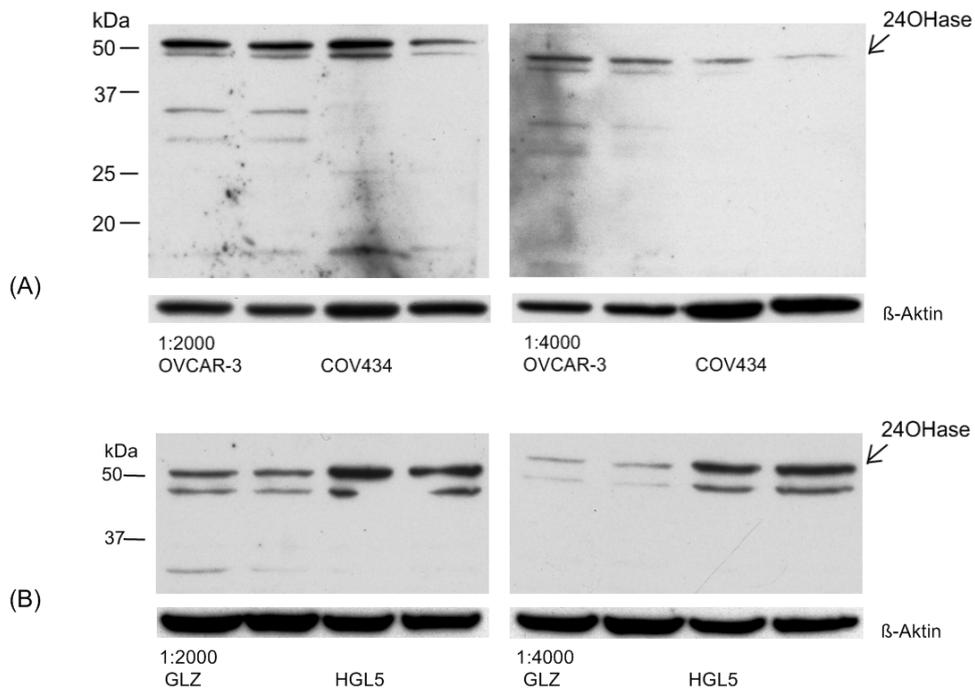


Abb. A.18: Bestimmung der optimalen Primär-Ak-Konzentration in OVCAR-3/COV434 (A) und in GLZ/HGL5 (B) (je n=2)

A5. Votum der Ethikkommission



Im Focus das Leben
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Stellv. Vorsitzende:

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Dr. Angelika Hüppe

Tel.: +49 451 500 5854

Fax: +49 451 500 3026

angelika.hueppe@uk-sh.de

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau
PD Dr. med. D. Fischer
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

im Hause

nachrichtlich:

Herr Prof. Dr. Diedrich, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe

Aktenzeichen: 04-018

Datum: 23. 11. 2009

Ihr Schreiben an die Ethik-Kommission vom 10. November 2009 mit Anlagen

Sehr verehrte Fr. Fischer,

Sie informierten die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck über eine im Rahmen einer Doktorarbeit durchgeführte Studie mit dem Titel „Regulation des Vitamin D Metabolismus beim Ovarialkarzinom.“ Fälschlicher Weise war eine Stellungnahme der Ethikkommission (AZ 04-018) als positives Votum missverstanden worden.

Nach den von Ihnen zur Studie nun nachträglich gemachten Angaben kann ich bestätigen, dass gegen die Durchführung der oben genannten Studie aus ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten meinerseits keine Bedenken bestehen.

Mit freundlichem Gruß

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Vorsitzender

Danksagung

Ich danke Prof. Diedrich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in Lübeck durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Fischer für die Überlassung des Themas, die zuverlässige und professionelle Betreuung meiner Arbeit sowie für die Hilfe und Unterstützung über die wissenschaftliche Arbeit hinaus.

Weiterhin danke ich Dipl.-Biol. Steffi Becker für die wissenschaftliche Betreuung im Labor und dafür, dass ich durch sie die Schwierigkeiten im Rahmen einer solchen Arbeit kennen- und lösen gelernt habe.

Für die praktische Hilfe im Labor und die Bereitschaft, mich auch in kleinen Dingen zu unterstützen, danke ich insbesondere Birte Münchow und Stephan Polack.

Meinem Mann Mark danke ich für seine große Hilfsbereitschaft in vielerlei Hinsicht und das Mittragen von Belastungen, die mit einer solchen Arbeit einhergehen.

Nicht zuletzt danke ich auch meinen Eltern für die Ermöglichung meines Medizinstudiums, die bedingungslose Unterstützung und die vielen ermutigenden Worte während schwieriger Zeiten.

Lebenslauf

Name: Marlene Thomé
Geburtsname: Dütting
Geboren: 30.08.1983 in Steinheim / Westfalen
Eltern: Friedhelm und Almut Dütting
Familienstand: verheiratet
Kinder: eine Tochter, geb.16.01.2009
Staatsangehörigkeit: deutsch
Religion: katholisch



Schule

1990 – 1994 Grundschule Oeynhausen
1994 – 2003 Christian Dietrich Grabbe – Gymnasium Detmold
2003 Abitur

Studium

Seit 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
08/2005 1. Staatsexamen

06/2007 – 04/2008 Studentischer Blutentnahmediensnt
Seit 03/2008 Studentische Hilfskraft in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Dissertation

06/2006 – 07/2008 Experimentelle Arbeit im Labor
01/2008 – 05/2009 Schriftliche Ausarbeitung

Famulaturen

02/2006 – 03/2006	Unfallchirurgie, Klinikum Lippe-Detmold
08/2007	Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinik Lübeck
09/2007	Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinik Lübeck
02/2008 – 03/2008	Praxisfamulatur Gynäkologie, Lübeck
03/2008	Praxisfamulatur Allgemeinmedizin, Horn-Bad Meinberg
09/2008	Psychiatrie und Psychotherapie, Ameos-Klinik Lübeck

Interessen

Klavier (ABRMS Grade 7)

Alt- und Sopransaxophon, 1995-2003 im Orchester

Moderne Kunst, Malen mit Acryl auf Leinwand

Schwimmen, Badminton, Rudern