

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Thomssen**

**Die Bedeutung des 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus
beim Ovarialkarzinom**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)**

**vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von Lena Marie Mohr
geboren am 14.05.1983 in Berlin**

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer

**Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer
Prof. Dr. med. Pauline Wimberger, Dresden
Prof. Dr. med. Elmar Stickeler, Freiburg**

**Eröffnungsdatum: 18.06.2013
Datum der Verteidigung: 19.05.2014**

Für meine Eltern

Referat

Der Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) zeigte sich in mehreren Studien als prognostischer Faktor beim Ovarialkarzinom. Durch Inhibition der Matrixdegradation durch Plasmin über Hemmung von uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ), durch Interaktion mit Vitronektin und durch Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden mittels Bindung an den uPA-uPA-Rezeptor-Komplex hat PAI-1 eine komplexe Funktion in der Zelladhäsion, Zellmigration, Metastasierung und Tumorangio-genese. Der biallelische 4G/5G-Polymorphismus im Promotorbereich des PAI-1-Gens variiert die Transkription von PAI-1 mit einer vermehrten Transkription bei Vorliegen des 4G-Allels und beeinflusst somit möglicherweise auch die Aggressivität und Prognose des Ovarialkarzinoms. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Erkrankungs-chance für ein Ovarialkarzinom, dem Alter bei Diagnosestellung, der Tumorhistologie, dem FIGO-Stadium, dem Vorliegen von Aszites, dem Grading und der Prognose, gemessen am rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben, untersucht. Hierzu wurde die DNA aus dem Blut von 104 Patientinnen und 157 Kontrollen isoliert und der 4G/5G-Polymorphismus mittels PCR bestimmt. Es ergaben sich einige subsignifikante Tendenzen für die Assoziation verschiedener Genotypen bzw. Allele mit den untersuchten Faktoren, die möglicherweise durch die multiplen Funktionen von PAI-1 bedingt sind. Diese könnten je nach Umgebung auf unterschiedliche Weise zur Ausprägung kommen, sodass PAI-1 sowohl zu einem tumorfördernden als auch tumorsupprimierenden Faktor werden könnte. In der Subgruppe der 20 Patientinnen mit G1- oder G2-Tumor zeigte sich, dass Patientinnen mit dem 4G-Allel ein statistisch signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben hatten. Dies unterstützt die Annahme, dass das 4G-Allel bei diesen Patientinnen über eine vermehrte PAI-1-Expression zu einem maligneren Phänotyp des Ovarialkarzinoms führt und so den Krankheitsverlauf negativ beeinflusst. Weitere Studien an größeren Patientenkollektiven sind nötig, um die Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus beim Ovarialkarzinom und insbesondere für dessen Prognose einschätzen zu können.

Mohr, Lena Marie: Die Bedeutung des 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus beim Ovarialkarzinom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Ovarialkarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie des Ovarialkarzinoms	1
1.1.2	Klassifikation des Ovarialkarzinoms.....	1
1.1.3	Histologie des Ovarialkarzinoms	2
1.1.4	Karzinogenese des Ovarialkarzinoms	3
1.1.5	Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms	4
1.1.6	Diagnostik des Ovarialkarzinoms	4
1.1.7	Therapie des Ovarialkarzinoms.....	5
1.1.8	Prognostische und prädiktive Faktoren des Ovarialkarzinoms	5
1.2	PAI-1	6
1.2.1	Das Protein PAI-1	6
1.2.2	Das Plasminogenaktivierungssystem (PAS)	7
1.2.3	Das PAS und seine Bedeutung für die Zellmigration und Zellinvasion	8
1.2.4	Das PAS und seine Bedeutung für die Tumorprogression, Tumorangiogenese und Metastasierung.....	9
1.2.5	Die Bedeutung von PAI-1 und dem PAS für verschiedene Erkrankungen und Malignome insbesondere für das Ovarialkarzinom.....	10
1.2.6	Das humane PAI-1 Gen und die Regulation seiner Aktivität	11
1.2.7	Der 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus.....	13
1.2.8	Die klinische Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus für kardiovaskuläre Erkrankungen und Malignome insbesondere für das Ovarialkarzinom	14
2	Zielstellung	16
3	Material und Methodik	17
3.1	Substanzen und Geräte	17
3.2	Das Patienten- und das Kontrollkollektiv.....	19
3.2.1	Das Patientenkollektiv.....	19
3.2.2	Das Kontrollkollektiv	22

3.3	Untersuchungsmaterial.....	22
3.4	Isolierung genomischer DNA.....	22
3.4.1	DNA-Isolierung aus Leukozyten.....	22
3.4.2	DNA-Isolierung aus Vollblut und Buffy Coat	23
3.5	DNA-Konzentrationsmessung.....	23
3.6	PCR.....	24
3.7	Genotypisierung und DNA-Restriktion.....	25
3.8	Gelelektrophorese.....	26
3.9	Statistische Auswertung	27
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Der 4G/5G-Polymorphismus und die Chance an einem Ovarialkarzinom zu erkranken	28
4.2	Der 4G/5G-Polymorphismus im Patientenkollektiv und im Teilkollektiv.....	29
4.3	Das seröse und das nicht-seröse Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus	29
4.3.1	Die Chance an einem serösen und nicht-serösen Ovarialkarzinom zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus.....	30
4.4	Das FIGO-Stadium und der 4G/5G-Polymorphismus	30
4.4.1	Das FIGO-Stadium beim serösen Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus.....	31
4.5	Aszites und der 4G/5G-Polymorphismus.....	31
4.5.1	Die Chance an einem Ovarialkarzinom mit und ohne Aszites zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus.....	32
4.5.2	Aszites beim serösem Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus.....	32
4.5.3	Die Chance an einem serösen Ovarialkarzinom mit und ohne Aszites zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus.....	33
4.6	Das Grading und der 4G/5G-Polymorphismus	33
4.6.1	Das Grading beim serösen Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus	34
4.7	Das Alter bei Diagnosestellung und der 4G/5G-Polymorphismus.....	34
4.7.1	Das Alter bei Diagnosestellung der Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus.....	35

4.8	Der 4G/5G-Polymorphismus und die Prognose des Ovarialkarzinoms	36
4.8.1	Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus im Patientenkollektiv.....	36
4.8.2	Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach der Histologie ...	37
4.8.3	Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach FIGO-Stadium..	37
4.8.4	Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach Resttumor	38
4.8.5	Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach Aszites	40
4.8.6	Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach Grading.....	42
5	Diskussion	44
5.1	PAI-1 und die Inzidenz von Karzinomen insbesondere vom Ovarialkarzinom.....	44
5.2	PAI-1 und die Karzinomhistologie.....	45
5.3	PAI-1 und die Tumorprogression.....	46
5.4	PAI-1 und Aszites.....	47
5.5	PAI-1 und das Grading.....	49
5.6	PAI-1 und das Alter bei Diagnosestellung	50
5.7	PAI-1 und die Krankheitsprognose	51
5.7.1	Erklärungsmodelle der verschiedenen Einflüsse des 4G/5G-Polymorphismus in den verschiedenen Subgruppen.....	51
5.7.2	Der 4G/5G-Polymorphismus und die Prognose verschiedener maligner Tumoren	54
5.7.3	PAI-1 und die Prognose des Ovarialkarzinoms	55
5.8	Schlussbetrachtung.....	55
6	Zusammenfassung	57
7	Literaturverzeichnis	58
8	Thesen.....	78

Abkürzungen

4G/5G-Polymorphismus	4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
APST	atypical proliferative serous tumor
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AT II	Angiotensin II
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMAL	brain and muscle ARNT-like
BOT	Borderline-Tumor
b	Basen
bp	Basenpaar
BRCA	breast cancer susceptibility gene
CA 125	cancer antigen 125
CA 15-3	cancer antigen 15-3
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
COX-2	Cyclooxygenase-2
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DM 2	Diabetes Mellitus Typ 2
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
Elk-1	ETS-like transcription factor 1
ERK	extracellular signal-regulated kinases
Ets-1	E26 transformation specific sequence
EZM	Extrazelluläre Matrix
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

GOG	Gynecologic Oncology Group
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HE-4	human epididymis protein 4
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
kbp	Kilobasenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LDL	low-density-lipoprotein
LDLR	low-density-lipoprotein-receptor
LRP	LDL-receptor related protein
MALDI-TOF	matrix-assisted laser-desorption/ionization – time of flight
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MEK 1,2	MAPK/ERK Kinase 1,2
MMP	Matrixmetalloprotease
MPSC	intraepithelial or noninvasive micropapillary serous carcinoma
NF-κB	nuclear factor kappa B
OR	odds ratio (Chancenverhältnis)
p53	Protein 53
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PAS	Plasminogenaktivierungssystem
Pat.	Patientinnen
PCR	polymerase chain reaction
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
SAPK	stress-activated protein kinase
SBT	serous borderline tumor (seröser Borderline Tumor)
Smad	zusammengesetzt aus: Caenorhabditis elegans-Sma (small mutants) und Drosophila melanogaster-Mad (mothers against decapentaplegic)
SNP	single nucleotid polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SP 1	specificity protein 1

TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TNM	Tumor-Node-Metastasis (Klassifikation zur Stadieneinteilung maligner Tumoren)
tPA	Plaminogenaktivator vom Tissue-Typ
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ
uPAR	Urokinase-Plasminogenaktivator-Rezeptor
USF-1/2	upstream stimulatory factor-1/2
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelial groth factor
VLDL	very-low-density-lipoprotein
VLDLR	very-low-density-lipoprotein-receptor
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom ist die sechsthäufigste Krebsneuerkrankung bei deutschen Frauen nach bösartigen Tumoren der Brustdrüse, des Darms, der Lunge, des Gebärmutterkörpers und dem malignen Melanom und ist der zweithäufigste maligne Tumor des weiblichen Genitaltraktes. Bezogen auf alle Krebsneuerkrankungen der Frauen sind 3,5% Ovarialkarzinome [1]. Diese machen 90% der malignen Tumoren der Eierstöcke aus [2]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren. Jährlich erkranken ca. 7-8.000 Frauen in Deutschland an einem Ovarialkarzinom. Die altersstandardisierte Inzidenzrate von ca. 11-12/100.000 in Deutschland ist ähnlich hoch wie z. B. in den USA. Das Ovarialkarzinom hat die höchste Letalität der gynäkologischen Malignome. Die Mortalität liegt bei ca. 8/100.000. Es starben 2008 in Deutschland 5.529 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Er ist die fünfhäufigste Todesursache durch Krebs bei deutschen Frauen nach bösartigen Tumoren von Brustdrüse, Darm, Lunge und Bauchspeicheldrüse. Die Überlebenseaussichten von Patientinnen mit Ovarialkarzinom sind im Vergleich zu anderen malignen Erkrankungen der weiblichen Genitalorgane schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 40% [1, 3].

1.1.2 Klassifikation des Ovarialkarzinoms

Das Tumorstadium des Ovarialkarzinoms wird mittels der TNM-Klassifikation bzw. der FIGO-Klassifikation beschrieben (s. Tab.1). Bei der von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) ausgearbeiteten TNM-Klassifikation steht das T für die Tumorgöße, N für den Nodalstatus und M für Fernmetastasen. Die FIGO-Klassifikation der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique fasst diese drei Merkmale zusammen. Das Staging hat große Bedeutung für die Prognose, denn die Überlebensraten korrelieren negativ mit dem FIGO-Stadium [4]. Grundvoraussetzung für die Einteilung ist die Durchführung einer adäquaten Operation mit Lymphonodektomie und Untersuchung des Aszites bzw. der Flüssigkeit der Peritonealspülung auf maligne Zellen.

Tab.1: FIGO- und TNM-Klassifikation maligner Ovarialtumore nach der AWMF-Leitlinie für Ovarialtumoren [5]. (Die Leitlinie ist seit dem 01.05.2012 in Überarbeitung.)

FIGO	Befund	TNM
I	Tumor begrenzt auf die Ovarien	T1
IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars	T1a
IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt, kein Tumor auf der Oberfläche der Ovarien	T1b
IC	Tumor begrenzt auf eine oder beide Ovarien, Kapselruptur, Tumor auf der Oberfläche oder maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung	T1c
II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus	T2
IIA	Befall von Uterus und/oder Tube(n)	T2a
IIB	Befall von anderem Beckengewebe	T2b
IIC	Zusätzlich zu IIA oder IIB maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung	T2c
III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen	T3
IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens	T3a
IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens, größte Ausdehnung ≤ 2 cm	T3b
IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens, größte Ausdehnung > 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen	T3c
IV	Fernmetastasen	M1
	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	NX
	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	N0
	Regionäre Lymphknotenmetastasen	N1

1.1.3 Histologie des Ovarialkarzinoms

Die WHO (World Health Organization) unterscheidet seröse, muzinöse, endometrioid, klarzellige, übergangszellige (transitionalzellige), plattenepitheliale, gemischtzellig epitheliale, undifferenzierte und unklassifizierte Ovarialkarzinome [6]. Die Häufigkeitsverteilung ist stadienabhängig. Bei Patientinnen mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium sind ca. 73% der Ovarialkarzinome serös, 7% endometrioid, 3% je muzinös, klarzellig oder undifferenziert und $< 1\%$ transitionalzellig [7]. Einige Autoren fassen inzwischen die verschiedenen histologischen Typen zu Typ 1- und Typ 2-Tumoren zusammen. Typ 1-Tumoren sind genetisch relativ stabil und bei der Diagnosestellung meist auf das Ovar begrenzt. Es handelt sich um low-grade seröse, low-grade endometrioid, klarzellige, muzinöse und transitionalzellige Karzinome. Jeder dieser histologischen Typen hat ein eigenes Mutationsprofil, typischerweise ohne Mutation von p53. Typ 2-Tumoren sind hoch aggressiv, wachsen schnell und präsentieren sich meist in fortgeschrittenem Stadium. Hierzu gehören high-grade seröse, high-grade endometrioid, undifferenzierte Karzinome sowie Karzinosarkome. Sie haben typischerweise Mutationen von p53 [8].

1.1.4 Karzinogenese des Ovarialkarzinoms

Es gibt viele Theorien zur Entstehung von Ovarialkarzinomen. Einige Autoren gehen davon aus, dass Ovarialkarzinome aus epithelialen Invaginationszysten entstehen, die maligne transformieren. Sie vermuten, dass die ständige Ovulation („Incessant Ovulation Hypothesis“), die zu Kontakt des Epithels mit östrogenreicher Flüssigkeit und vermehrter Zellteilung beim postovulatorischen Wundverschluss führt, mit dem steigenden Risiko genetischer Aberrationen einhergeht [9]. Andere Autoren postulieren, dass eine maligne Entartung des Epithels durch postmenopausal erhöhte Gonadotropine oder zyklisch erhöhte Östrogene (Gonadotropin-hypothese) stimuliert wird [10, 11] oder durch aufsteigende Umweltkarzinogene [12].

Die Vielzahl der histologischen Typen wird von einigen Autoren durch Metaplasie des Ovarialepithels bzw. Inklusionszysten erklärt oder durch Entstehung aus dem sekundären Müllerschen System, Restgewebe des Müllerganges, dem u. a. paraovariale und paratubale Zysten und Endometriose- und Endosalpingioseherde zugeordnet werden [13]. Inzwischen existiert eine Theorie, die besagt, dass der Ursprung der verschiedenen histologischen Typen in anderen Organen liegt und das Ovar erst sekundär involviert wird. So wird vermutet, dass seröse Tumoren aus implantiertem Tuben-Epithel entstehen, endometrioide und klarzellige Tumoren aus Endometrium des Uterus bzw. Endometrioseherden und transitionalzellige und muzinöse Karzinome aus transitionalzelligen Zellnestern an der Tuben-Mesothel-Grenze [8]. Während seröse low-grade-Karzinome sich schrittweise aus einem Adenom bzw. Borderline-Tumor durch eine Adenom-Karzinom-Sequenz entwickeln, entstehen high-grade-Karzinome ohne bekannte Tumorstufen [14, 15].

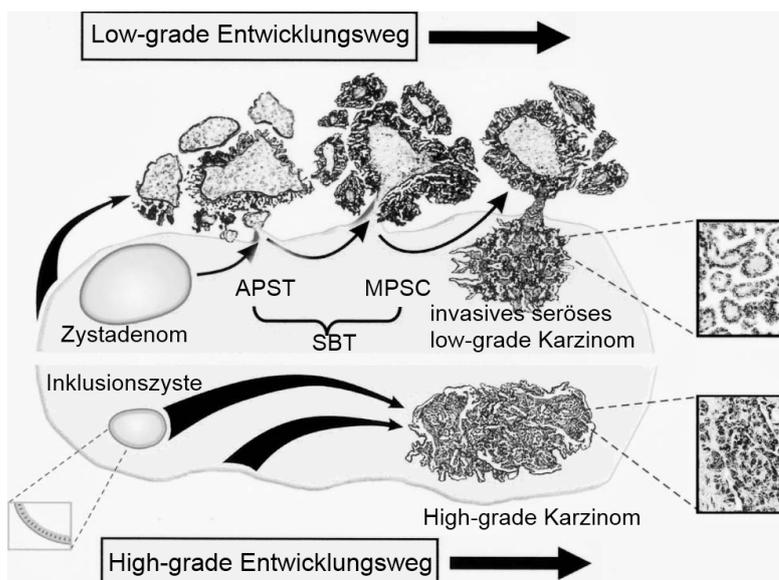


Abb. 1: Modell der Entwicklungswege des serösen high-grade und low-grade Karzinoms modifiziert nach [16]. APST: atypisch proliferierender seröser Tumor; MPSC: intraepitheliales oder nichtinvasives mikropapilläres seröses Karzinom; SBT: seröser Borderline-Tumor

1.1.5 Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms

Das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Lebensalter. Die deutliche Mehrheit der Patientinnen ist über 55 Jahre alt [3]. Das polyzystische Ovarsyndrom ist ebenfalls ein Risikofaktor für das Ovarialkarzinom, dies wurde jedoch nicht in allen Untersuchungen bestätigt [17–19]. Auch eine späte gegenüber einer frühen Menopause erhöht das Risiko, allerdings nicht in allen Studien [20–22], ebenso die postmenopausale Hormonersatztherapie [23–25]. Während unklare Infertilität ein Risikofaktor zu sein scheint, konnte keine Risikoerhöhung durch Ovulationsstimulation demonstriert werden [23, 26]. Ungefähr 5-10% aller Ovarialkarzinome haben eine hereditäre Ursache, sodass eine positive Familienanamnese ein Risikofaktor ist [27]. Das Lebenszeitrisiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, ist erhöht für Trägerinnen einer BRCA 1- oder BRCA 2-Mutation [28, 29], ebenso im Rahmen des hereditären Lynch-II-Syndroms [30]. Protektive Faktoren sind Hysterektomie, einseitige Oophorektomie, Tubenligatur [23, 31, 32], Schwangerschaft [21, 33, 34] und die Einnahme oraler Kontrazeptiva [22, 34–36]. Letztere senken das Risiko auch für Frauen mit einer BRCA 1- oder BRCA 2-Mutation [37]. Ob Stillen ein protektiver Faktor ist, ist umstritten [38, 39].

Neben diesen von der AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie) angegebenen Risiko- bzw. protektiven Faktoren [40] scheinen auch Talk, Ernährung und Rauchen das Risiko für ein Ovarialkarzinom zu erhöhen [41]. Allerdings ist die Datenlage über den perinealen Gebrauch von Talkumpuder als Risikofaktor uneinheitlich [42–45]. Der Konsum von Fleisch, tierischem Fett und gesättigten Fettsäuren erhöht das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [46, 47]. Rauchen erhöht speziell das Risiko für ein muzinöses Ovarialkarzinom [48, 49].

1.1.6 Diagnostik des Ovarialkarzinoms

Da Ovarialkarzinome meist erst in fortgeschrittenen Stadien Symptome verursachen, wird die Erkrankung überwiegend spät diagnostiziert. Abdominale Schmerzen und ein geblähter oder geschwollener Bauch sind die häufigsten Symptome [50]. Die transvaginale Sonographie ist das wichtigste bildgebende diagnostische Verfahren. Für das Staging kann es die Operation aber nicht ersetzen. Ein Screening wird in der AWMF-Leitlinie (seit dem 01.05.2012 in Überarbeitung) derzeit nicht empfohlen, da weder der Tumormarker CA 125 noch die vaginale Sonographie sicher eine Früherkennung ermöglichen [5]. Zukünftig sollte der mögliche nicht-ovarielle Ursprung verschiedener histologischer Typen in die Suche nach geeigneten Screening-Verfahren einbezogen werden [51].

1.1.7 Therapie des Ovarialkarzinoms

Die Primärtherapie des Ovarialkarzinoms besteht in einer Operation mit maximaler Tumorsektion und adjuvanter platinhaltiger Chemotherapie, die lediglich von Patientinnen im Stadium IA mit einem G1-Tumor nicht benötigt wird [52]. Alle anderen Patientinnen profitieren von einer platinhaltigen Chemotherapie [53, 54]. Der Standard ist eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (FIGO IIB-IV) [55]. Die Addition des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab, der VEGF (vascular endothelial growth factor) bindet und so die Angiogenese hemmt, verlängert das progressionsfreie Überleben. Daten zum Gesamtüberleben stehen noch aus [56, 57]. Von einer Intervalloperation profitieren nur Patientinnen, die initial nicht von einem Spezialisten operiert wurden oder bei denen keine maximale Tumorsektion gelang [58]. Die Mehrheit der Patientinnen erleidet innerhalb von drei Jahren ein Rezidiv und verstirbt innerhalb von fünf Jahren [59]. Platinrefraktäre Rezidive treten innerhalb von sechs Monaten nach Ende der Primärtherapie auf. Eine Rezidivoperation kann im Einzelfall indiziert sein. Es werden nicht platinhaltige Chemotherapeutika angewendet wie Topotecan, pegyliertes liposomales Doxorubicin und Paclitaxel [60–62]. Bei platinsensiblen Rezidiven, die nach über sechs Monaten nach Ende der Primärtherapie auftreten, ist eine komplette Tumorsektion offenbar mit einem verlängerten Überleben verbunden [63], wenngleich die Daten einer prospektiv-randomisierten Studie (DESKTOP III) zu dieser Frage noch ausstehen. Die Patientinnen profitieren von einer erneuten platinhaltigen Kombinationstherapie mit Carboplatin und Gemcitabine, Paclitaxel oder pegyliertem liposomalem Doxorubicin [64–66]. Die Addition von Bevacizumab verlängert auch bei diesen Patientinnen das progressionsfreie Überleben [67].

1.1.8 Prognostische und prädiktive Faktoren des Ovarialkarzinoms

Prognostische Faktoren erlauben Rückschlüsse auf den Verlauf einer Erkrankung, prädiktive Faktoren geben Hinweise auf das Ansprechen einer Therapie. Das Tumorstadium ist ein starker prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben beim Ovarialkarzinom [68]. Die 5-Jahres-Überlebensrate sinkt mit zunehmendem FIGO-Stadium: Stadium I: 94%, Stadium II: 78%, Stadium III: 45%, Stadium IV: 19% [4]. Der maximale Durchmesser des postoperativen Resttumors ist bei fortgeschrittenem Tumorstadium der stärkste prognostische Faktor [69]. Je kleiner der Resttumor, desto länger leben die Patientinnen [68, 70–73]. Am prognostisch günstigsten ist die makroskopische Tumorfreiheit [74]. Ein eingeschränkter Allgemeinzustand ist ein negativer prognostischer Faktor [68, 70, 75]. Das Alter, als eigenständiger prognostischer Faktor, wird kontrovers diskutiert. Es scheint so zu sein, dass ältere Patientinnen mit Ovarialkarzinom kürzer leben als jüngere Patientinnen [68, 75]. Das histologische Grading ist lediglich im FIGO-Stadium I von Bedeutung [76].

Patientinnen im Stadium I mit gutem Differenzierungsgrad haben eine bessere Prognose als Patientinnen mit schlecht differenzierten Karzinomen [77, 78]. Die Datenlage bezüglich des Einflusses des histologischen Typs auf die Prognose ist heterogen [79, 80]. Überwiegend wird davon ausgegangen, dass Patientinnen mit klarzelligen und muzinösen Ovarialkarzinomen eine schlechtere Prognose haben als Patientinnen mit serösen oder endometrioiden Karzinomen [81, 82] und auch schlechter als diese auf konventionelle Chemotherapie ansprechen [83–85]. Neben diesen etablierten, in der AWMF-Leitlinie für Ovarialtumoren (seit dem 01.05.2012 in Überarbeitung) genannten Prognosefaktoren [5], werden weitere Faktoren diskutiert wie die Anwesenheit von Aszites, die CA 125-Expression, der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, die Expression des Oberflächenproteins CD-24, die Ploidie, die Expression verschiedener Zytokine, die HER-2/neu-Expression, der p53-Tumorsuppressorgen-Status, die COX-2-Expression, sowie die Expression von VEGF, MMPs, uPA und PAI-1 [86]. Letztgenannter Faktor war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2 PAI-1

1.2.1 Das Protein PAI-1

Das Glykoprotein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) gehört zur Familie der Serinprotease-Inhibitoren (Serpine) [87]. Es wird auch als Serpin E1 bezeichnet. Bei seiner Entdeckung wurde zirkulierendes PAI als PAI-1, intrazelluläres als PAI-2 und der Protein C Inhibitor als PAI-3 bezeichnet [88]. PAI hemmt u. a. die Plasminogenaktivierung durch uPA (Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ) und tPA (Plasminogen-Aktivator vom Tissue-Typ). Im Rahmen der Fibrinolyse ist tPA für die intravaskuläre Plasminaktivierung verantwortlich [89]. Aktives uPA bindet an den uPA-Rezeptor (uPAR) in der Membran migrierender Zellen und spielt vor allem bei der Plasminogenaktivierung im Rahmen der Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) eine Rolle [90].

Nach posttranslationaler Prozessierung und Abspaltung eines Signalpeptides entsteht ein reifes PAI-1 Protein mit 379 oder 381 Aminosäuren [91]. Aktives PAI-1 kann spontan seine Konformation ändern und zu einer latenten Form konvertieren, die durch Behandlung mit denaturierenden Stoffen wie Natriumdodecylsulfat wieder in die aktive Form überführt werden kann [92, 93]. Außerdem existiert eine sogenannte Substrat-Form, die von uPA und tPA degradiert und inaktiviert wird ohne diese zu inhibieren [94]. PAI-1 wird u. a. in Hepatozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Thrombozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten und Adipozyten gebildet und sezerniert [95, 96]. Der normale Plasmaspiegel von PAI-1 beträgt ca. $21,0 \pm 7,2$ ng/ml [97]. Plasma-PAI-1 hat eine hohe Aktivität. Im Gegensatz dazu ist die PAI-1-Aktivität in Thrombozyten trotz hoher Konzentrationen recht niedrig [97]. Im Blut ist PAI-1 an Vitronektin gebunden [98, 99].

Vitronektin stabilisiert PAI-1 und verlängert seine biologische Halbwertszeit von < 3 auf > 24 Stunden [100, 101]. Andere Liganden von PAI-1 sind Heparin, Glykosaminoglykane und LDL-Rezeptoren [88]. Die kurze Halbwertszeit, der niedrige Plasmaspiegel, die komplexe Regulation und die Induzierbarkeit in vielen Geweben unterscheiden PAI-1 von anderen Serpinen [102].

1.2.2 Das Plasminogenaktivierungssystem (PAS)

Die Serinprotease Plasmin degradiert Fibrin sowie Proteine der Basalmembran und EZM und aktiviert andere Proteasen, wie Matrixmetalloproteasen (MMPs), und auch Wachstumsfaktoren. Ihr Inhibitor ist α_2 -Antiplasmin. Ein Plasminfragment, Angiostatin, das aus Plasmin entweder durch Metalloproteasen-induzierte Spaltung oder durch Autoproteolyse entsteht, hemmt die Angiogenese. Plasmin entsteht aus dem Zymogen Plasminogen durch Spaltung durch tPA oder uPA. Plasmin aktiviert wiederum uPA aus pro-uPA. Neben den beiden Plasminogen-Aktivatoren (PA) gehören auch die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 sowie der uPA-Rezeptor uPAR zum Plasminogenaktivierungssystem (PAS) (s. Abb. 2) [103].

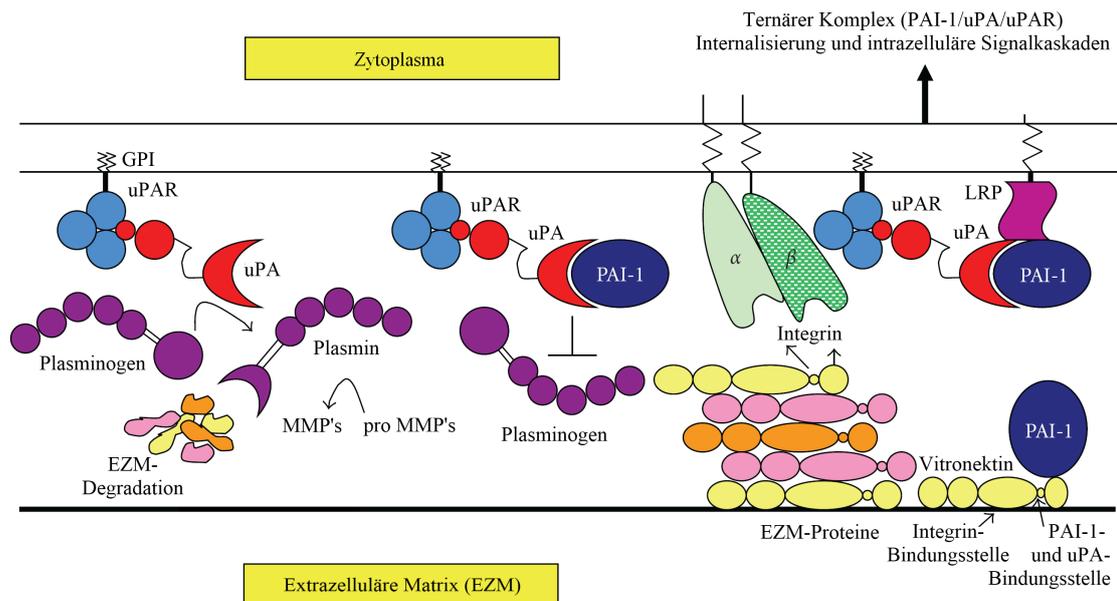


Abb. 2: Das PAS an der Zelloberfläche modifiziert nach [104]. GPI: Glycosylphosphatidylinositol-Anker, LRP: LDL-receptor related protein; MMP's: Matrixmetalloproteasen, uPA: Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ, uPAR: uPA-Rezeptor, PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1.

PAI-2 hemmt uPA und tPA langsamer als PAI-1. uPAR ist ein membranständiger Rezeptor. Es existiert jedoch auch eine nicht-membranassoziierte lösliche Form von uPAR. Die Bindung an den Membranrezeptor uPAR fördert die Umwandlung von pro-uPA zu uPA und verstärkt dessen Wirkung. An uPAR gebundenes uPA konzentriert die Plasminogenaktivierung auf die Zelloberfläche. PAI-1 hemmt freies und uPAR-gebundenes uPA gleichermaßen und dadurch die Plasminogenaktivierung [105–107]. Neben der Plasminogenaktivierung hat dieses System jedoch auch plasminunabhängige Funktionen, nämlich die Interaktion mit Vitronektin und

Integrinen sowie die intrazelluläre Signaltransduktion. uPAR bindet an Integrine und Vitronektin und verstärkt so die Zelladhäsion an die EZM [108]. Die uPAR-Vitronektin-Bindung wird durch pro-uPA, uPA und den uPA-PAI-1-Komplex stimuliert, aber durch PAI-1 gehemmt. PAI-1 bindet mit hoher Affinität an Vitronektin und schützt es vor dem Abbau durch Plasmin, allerdings nicht, wenn PAI-1 als Komplex mit uPA vorliegt. PAI-1 konkurriert mit uPAR und Integrinen an verschiedenen Bindungsstellen um die Bindung an Vitronektin. Außerdem werden durch uPA-PAI-1-Komplexe und uPAR mittels Interaktionen mit Tyrosinkinaserzeptoren, G-Proteinen oder LDLR (low-density-lipoprotein-Rezeptoren) verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst. Daneben werden durch die uPAR-Integrin-Interaktion adhäsionsabhängige Signalkaskaden aktiviert. Bindet und inaktiviert PAI-1 uPAR-gebundenes uPA, so wird der ternäre PAI-1-uPA-uPAR-Komplex durch Endozytose mittels Interaktion mit Rezeptoren der LDLR-Familie (α_2 -Makroglobulinrezeptor (LRP) und VLDLR (very low-density-lipoprotein-Rezeptor)) internalisiert. Während PAI-1 und uPA intrazellulär abgebaut werden, gelangt uPAR wieder an die Zelloberfläche [105–107, 109–111].

1.2.3 Das PAS und seine Bedeutung für die Zellmigration und Zellinvasion

Bei der Zellmigration spielen die Interaktionen zwischen Integrinen und anderen Adhäsionsrezeptoren, wie uPAR, und Proteinen der EZM, wie Vitronektin, eine große Rolle. Während am führenden Zellpol der migrierenden Zelle neue Verbindungen zwischen Adhäsionsmolekülen und der EZM entstehen müssen, um die Zelle zu leiten und vorwärts zu ziehen, müssen am hinteren Zellpol die Verbindungen zwischen der Zelle und der EZM gelöst werden [112]. Membranproteine wie Integrine oder uPAR werden am hinteren Zellpol endozytiert, zum führenden Zellpol transportiert und dort exozytiert (s. Abb. 3) [113].

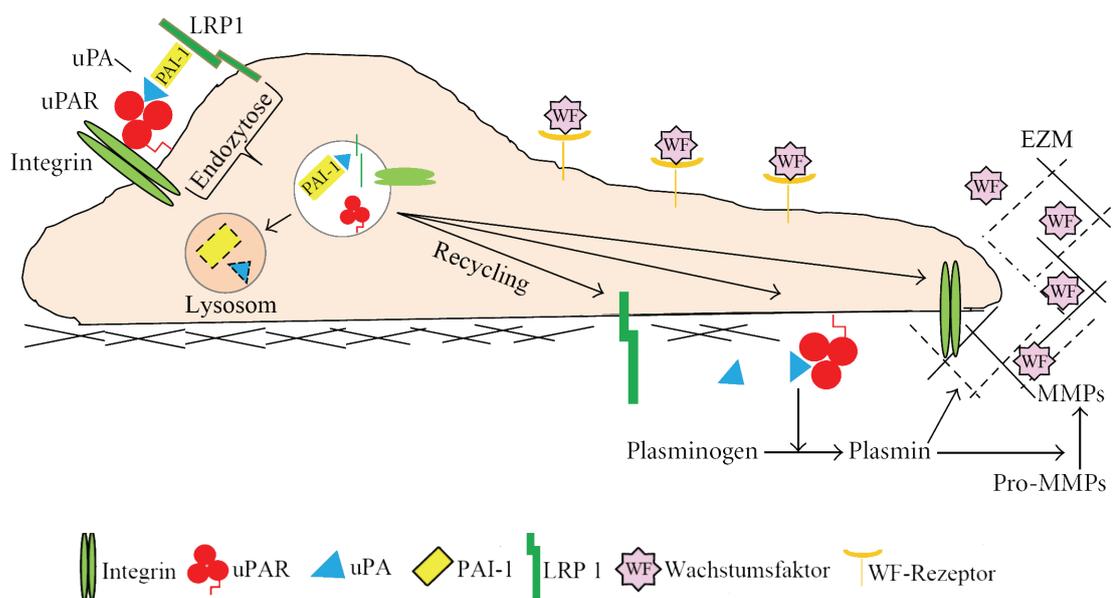


Abb. 3: Die Beeinflussung der Zellmigration durch das PAS modifiziert nach [114].

Plasmin löst den hinteren Zellpol durch Degradation von Adhäsionsmolekülen und Proteinen der EZM. uPA wirkt promigratorisch durch Plasminogenaktivierung am hinteren Zellpol und durch Stimulierung der uPAR-Vitronektin-Bindung und uPAR-Integrin-Bindung am führenden Zellpol. Denkbar wäre auch eine promigratorische Signalkaskade ausgelöst durch uPA-uPAR-Bindung. PAI-1 kann pro- oder antimigratorisch wirken. PAI-1 kann promigratorisch wirken, wenn es am führenden Zellpol Vitronektin vor dem uPA-induzierten Abbau schützt und wenn es am hinteren Zellpol den uPA-uPAR-Komplex aus seiner Verbindung mit Vitronektin verdrängt, da dadurch die Adhäsion zwischen der Zelle und der EZM beendet wird. Zusätzlich wirkt PAI-1 promigratorisch, wenn es an den uPA-uPAR-Komplex bindet, denn so wird der Komplex internalisiert und uPAR wird am führenden Zellpol recycelt, um dort neue Verbindungen zur EZM aufzubauen. PAI-1 kann antimigratorisch wirken, also die Zelladhäsion fördern, wenn es am führenden Zellpol die Bindung von uPAR an Integrine und Vitronektin hemmt und am hinteren Zellpol die Plasminogenaktivierung hemmt. Bei der Invasion bewegt sich die Zelle durch die EZM, entweder durch proteolytische Zerstörung der EZM oder durch amöboide Bewegung. Auch hier sind bei der Degradation der EZM uPA und PAI-1 beteiligt (s. Abb. 3). PAI-1 wird einerseits für die uPA/uPAR-abhängige Invasion benötigt, kann sie aber andererseits auch hemmen. Der Effekt von PAI-1 ist also abhängig von der Expression der anderen Komponenten des PAS, der Endozytoserezeptoren, der Integrine und Vitronektin. Vermutlich kommen daher die bisherigen Studien bezüglich der Rolle von PAI-1 bei Adhäsion, Migration und Invasion zu verschiedenen Ergebnissen [105, 110, 115–119].

1.2.4 Das PAS und seine Bedeutung für die Tumorprogression, Tumorangiogenese und Metastasierung

Das PAS ist bedeutend für die Fähigkeit maligner Tumoren zu metastasieren. Die Expression von uPA und von uPAR korreliert mit der Metastasierung und der Tumorprogression. Studien über PAI-1 demonstrierten in verschiedenen experimentellen Modellen und an verschiedenen Tumorentitäten sowohl eine die Metastasierung hemmende als auch eine fördernde Wirkung [105, 110, 115].

Die Komponenten des PAS haben prognostische Bedeutung für verschiedene maligne Tumoren. In den meisten Studien zeigten sich uPA, uPAR und PAI-1 als negative prognostische Faktoren, während tPA und PAI-2 sich als positive prognostische Faktoren herausstellten. Die Expressionsmuster der Komponenten des PAS variieren zwischen verschiedenen Tumorentitäten. uPA, uPAR und PAI-1 werden in den Tumoren nicht nur von den Tumorzellen selbst, sondern auch von Fibroblasten des Stromas, Entzündungszellen und Endothelzellen exprimiert. Somit spielt das PAS nicht nur eine Rolle bei der Migration und der Invasion der Krebszellen, sondern auch bei Veränderungen um den Tumor, im Sinne einer Desmoplasie, und

bei der Tumorangiogenese. Daher gibt es vermutlich mehr als nur einen Mechanismus, mit dem das PAS die Tumorprogression und damit die Prognose beeinflusst. Der Ort der Expression der Komponenten kann sich bei zunehmender Tumorprogression ändern, sich z. B. bei zunehmender Dedifferenzierung ins Stroma verlagern. Verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine und parakrine Stimulation beeinflussen die Expressionsmuster der Komponenten des PAS. Es wäre denkbar, dass das PAS in Tumoren nur mit der schlechten Prognose korreliert, ohne sie selbst zu verursachen. Allerdings sprechen Daten, die durch z. B. PAI-1-defiziente Mäuse erhalten wurden, für eine kausale Rolle des PAS und insbesondere eine tumorfördernde Wirkung von PAI-1 [110, 115, 118]. uPA fördert die Tumorangiogenese und korreliert mit der Dichte kleiner Gefäße beim Mammakarzinom. Demgegenüber hemmt das Plasminfragment Angiostatin die Angiogenese. PAI-1 wirkt diesbezüglich dosisabhängig. Es fördert die Tumorangiogenese bei physiologischen und hemmt sie bei sehr hohen Leveln. Sowohl die Begrenzung der Plasminogenaktivierung als auch die Interaktion mit Vitronektin durch PAI-1 scheinen für die Tumorangiogenese von Bedeutung zu sein [105, 110, 120–122]. PAI-1 induziert zudem die zelluläre Seneszenz u. a. als Zielgen von p53. Dadurch schützt es vor maligner Transformation und hemmt die Proliferation. Diese antiproliferative Wirkung wird aber möglicherweise dadurch abgeschwächt oder sogar aufgehoben, dass seneszente Zellen benachbarte Zellen parakrin zur Proliferation anregen können [123, 124]. Bei MCF-7-Brustkrebszellen hat PAI-1 eine proliferative Wirkung, wenn es als PAI-1-uPA-Komplex an uPAR und VLDLR bindet. Die resultierende anhaltende ERK-Aktivierung (extracellular signal-regulated kinases) stimuliert das Zellwachstum [125]. Insgesamt gibt es sowohl Hinweise auf eine hemmende als auch auf eine fördernde Wirkung von PAI-1 auf die Proliferation [110]. PAI-1 ist auch in die Regulation der zellulären Apoptose involviert. Während PAI-1 bei normalen Zellen sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirkt, hat es bei Krebszellen wohl eher einen anti-apoptotischen Effekt [126].

1.2.5 Die Bedeutung von PAI-1 und dem PAS für verschiedene Erkrankungen und Malignome insbesondere für das Ovarialkarzinom

Erhöhte PAI-1-Plasmalevel werden häufig bei Malignomen und anderen Krankheiten beobachtet, wie kardiovaskulären Erkrankungen und dem metabolischen Syndrom. Daneben spielt PAI-1 bei Rheuma, Asthma, chronischem Stress, Sepsis und Nierenkrankheiten eine Rolle [88, 127]. Tumor-PAI-1, -uPA und teilweise auch -uPAR sind prognostische Faktoren u. a. bei Nierenkrebs [128], Magenkrebs [129], Darmkrebs [130] und Brustkrebs [131]. Beim Mammakarzinom haben uPA und PAI-1 aus dem Tumorgewebe prognostische Bedeutung und können beim nodalnegativen Mammakarzinom zur Therapieentscheidung herangezogen werden [132]. Das PAS ist auch bei malignen Ovarialtumoren von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass

maligne Ovarialzellen uPA sezernieren [133] und uPAR exprimieren [134]. Eine hohe Expression von PAI-1 wurden in malignem Aszites nachgewiesen [135] und 50% bis nahezu 100% der malignen Ovarialtumoren exprimieren PAI-1 [136–138]. Neben den Tumorzellen bilden es auch Stroma- und Endothelzellen [136, 138, 139]. Die Expression von uPA und PAI-1 im Gewebe von Ovarialkarzinomen ist höher als die in benignen Ovarialtumoren [138–143], Borderline-Tumoren [144, 145] und normalem Ovarialgewebe [146–148]. Allerdings konnten nicht alle Autoren diese Unterschiede belegen [149]. Auch in der Flüssigkeit von Zysten maligner Ovarialtumoren waren PAI-1- und uPA-Level höher als in benignen oder Borderline-Tumoren [150, 151]. Omentummetastasen eines Ovarialkarzinoms exprimieren mehr PAI-1 und uPA als der Primärtumor [141, 145, 146, 149, 152]. Andere Autoren konnten dies nur für uPA belegen, nicht aber für PAI-1 [144].

Die PAI-1- und uPA-Expression im Tumorgewebe von Ovarialkarzinomen korreliert in einigen Untersuchungen mit klinisch-pathologischen Faktoren, wie z. B. dem Grading [149]. Andere konnten diese Korrelation nicht demonstrieren [136]. In einigen Studien zeigten sich PAI-1 und uPA als prognostische Faktoren beim Ovarialkarzinom [140, 144]. Die Expression von PAI-1 korreliert schwach bis mittelstark mit der von uPA im ovariellen Tumorgewebe mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von 0,26 bis 0,55 [137, 144, 149, 153, 154]. uPAR wird als prognostischer Faktor beim Ovarialkarzinom kontrovers diskutiert [149, 155].

1.2.6 Das humane PAI-1 Gen und die Regulation seiner Aktivität

Beim Menschen ist das PAI-1-Gen auf dem langen Arm von Chromosom sieben in der Region q21,3 – q22 lokalisiert [156]. Es ist ca. 12,2 kbp lang und enthält neun Exons und acht Introns [157, 158]. Es werden zwei unterschiedlich lange mRNAs gebildet, die ca. 3,5 kbp und 2,4 kbp lang sind [158]. Diese entstehen wahrscheinlich durch unterschiedliche Polyadenylierung [157]. Dem kodierenden Bereich des Gens ist am 5'-Ende die Promotorregion vorangestellt, die selbst nicht transkribiert wird. Hier binden diverse Transkriptionsfaktoren, wie SMAD3 (SMA, small mutants/Mad, mothers against decapentaplegic 3) (s. Abb. 4), und bilden zusammen mit der RNA-Polymerase und Kofaktoren einen Transkriptionskomplex, der das PAI-1-Gen transkribieren kann [159, 160].

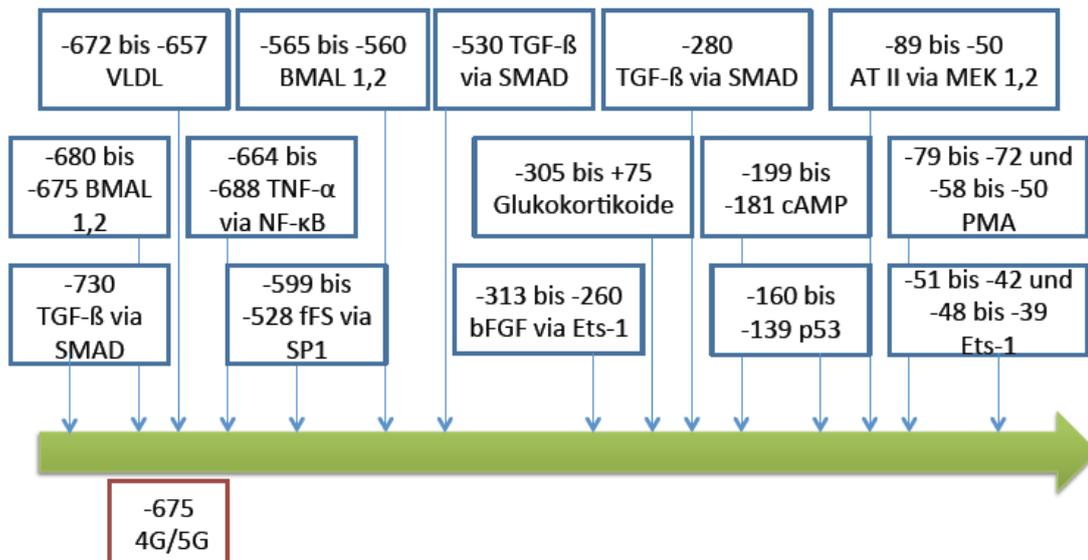


Abb. 4: PAI-1-Promotor angelehnt an [88]. Stimulatoren: VLDL: very-low-density-lipoprotein, TGF-β: transforming growth factor β, AT II: Angiotensin II, TNF-α: tumor necrosis factor α, Glukokortikoide, PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate, fFS: freie Fettsäuren, bFGF: basic fibroblast growth factor. Second messenger: cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat. Bestandteil von Signalkaskaden: MEK: MAPK (mitogen activated protein kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinases) Kinase. Transkriptionsfaktoren: BMAL: brain and muscle ARNT-like, SMAD: Sma (small mutants)/Mad (mothers against decapentaplegic), NF-κB: nuclear factor kappa B, SP1: specificity protein 1, Ets-1: E26 transformation specific sequence, p53: Protein 53

Die PAI-1-Aktivität wird stark auf der Ebene der Transkription reguliert. Das PAI-1-Gen gehört zu den in der akuten Phase regulierten Genen [102]. Interleukin-1 und Lipopolysaccharide aus der Wand gramnegativer Bakterien verstärken die PAI-1-Transkription [161, 162]. Auch TNF-α erhöht die Transkription von PAI-1 in Mesangiumzellen via SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase) [163] und in Endothelzellen via reaktiver Sauerstoffspezies, die den Transkriptionsfaktor NF-κB (nuclear factor kappa B) aktivieren. Dessen responsives Element liegt im Bereich -664 bis -680 bp relativ zum Transkriptionsstart nahe des 4G/5G-Polymorphismus (s. Abb. 4) [164]. TGF-β ist einer der wichtigsten Regulatoren der PAI-1-Expression [88]. Es erhöht die PAI-1-Transkription über CAGA-Box-bindende SMAD-Proteine [159]. PAI-1 ist u. a. von Bedeutung für das Herz-Kreislaufsystem. Die Gen-Expression von PAI-1 wird durch Gluko- und Mineralokortikoide gesteigert [165–168]. Angiotensin II (AT II) stimuliert die PAI-1-Expression über AT1-Rezeptoren [169] und Aktivierung des MEK 1/2-Signalweges (MAPK, mitogen activated protein kinase/ERK, extracellular signal-regulated kinases 1/2) mit Bindung an den PAI-1-Promotor in dem Bereich -89 bis -50 bp relativ zum Transkriptionsstart [170]. cAMP reguliert die PAI-1-Expression hoch oder herunter in Abhängigkeit vom Zelltyp [171–175]. Die Stimulation mit bFGF (basic fibroblast growth factor) erhöht die Transkription von PAI-1 in Endothelzellen über den Transkriptionsfaktor Ets-1 (E26 transformation specific sequence) [176], über den auch Scherspannung wirkt [177] (s. Abb. 4.). PAI-1 wird abhängig vom zirkadianen Rhythmus exprimiert und seine Transkription wird durch CLOCK-BMAL 1/2-Komplexe (circadian locomotor output cycles kaput / brain and muscle ARNT-like 1/2) verstärkt [178]. Es gibt auch

Zusammenhänge zwischen dem Stoffwechsel und der PAI-1-Expression. LDL, VLDL und freie Fettsäuren (fFS) verstärken die PAI-1-Transkription. LDL wirkt über die Proteinkinase C, VLDL über das VLDL-responsive Element im Promotor [179] und freie Fettsäuren über SP1 [180]. Linolsäure erhöht über SMAD die PAI-1-abhängige Migration von Brustkrebszellen [181]. Insulin kann über zwei verschiedene Signalwege die Transkription von PAI-1 sowohl verstärken als auch hemmen [182]. Für die Rolle von PAI-1 bei Tumoren ist interessant, dass die Gen-Expression von PAI-1 durch Phorbolester, wie PMA, [183] gesteigert werden kann. Hypoxie induziert PAI-1 über einen Tyrosin-Kinase-Signalweg in aortalen Rinderendothelzellen [184]. Dieser Mechanismus könnte auch in Tumoren von Bedeutung sein [110]. EGF (epidermal growth factor) fördert die Tumorprogression und induziert die PAI-1-Expression via Elk-1 (ETS-like transcription factor 1) [185]. PAI-1 wird auch von dem Tumorsuppressor p53 reguliert, der direkt an den PAI-1-Promotor im Bereich von -160 bis -139 bp relativ zum Transkriptionsstart bindet und die Transkription verstärkt. Mutierte Varianten von p53 haben weniger Effekt auf die Transkription von PAI-1, was interessant ist im Hinblick auf die PAI-1-Expression in Tumorzellen, in denen p53 oft mutiert ist [186].

1.2.7 Der 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus

Im PAI-1-Promotor existiert ein Polymorphismus bei -675, also 675 bp upstream von dem Startpunkt der Transkription aus gesehen. Der 4G/5G-Polymorphismus (rs1799889) ist ein biallelischer Insertions-Deletions-Polymorphismus und gehört zu den SNPs (single nucleotide polymorphisms). Entweder folgen vier (4G-Allel) oder fünf Guaninbasen (5G-Allel) aufeinander [187].



Abb. 5: Der 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus, entdeckt durch Dawson et al. [187].

Während sowohl das 4G- als auch das 5G-Allel in HepG2-Zellen einen Aktivator binden können, kann nur das 5G-Allel einen Repressor binden [187, 188]. Allerdings konnten andere Studien, z. T. an anderen Zelllinien, dies nicht bestätigen [189, 190]. Eriksson und seine Arbeitsgruppe zeigten einen Einfluss des 4G/5G-Polymorphismus auf die basale Transkriptionsaktivität in HepG2-Zellen. Sie war bei Vorliegen des 4G-Allels im Gegensatz zum 5G-Allel gesteigert [188]. Andere Arbeitsgruppen demonstrierten an HepG2-Zellen keine allelbedingte Differenz in der basalen Transkriptionsaktivität [187, 189–191]. Viele Gruppen

belegten aber eine allelabhängige PAI-1-Transkription unter verschiedenen Stimuli. IL-1, ein Botenstoff der Akute-Phase-Reaktion, steigerte die PAI-1-Transkription in HepG2-Zellen, wenn das 4G-Allel vorlag. Dies tat es nicht oder weniger, wenn das 5G-Allel vorlag [187, 192]. Ebenso verhielt es sich mit Angiotensin II in Endothelzellen [193], VLDL in Endothelzellen [194], BMAL/CLOCK in Fibroblasten der Niere [195] und USF-1 (upstream stimulatory factor-1/2) in Mastzellen [190]. In Adipozyten war die USF-1-abhängige PAI-1-Transkription unabhängig vom 4G/5G-Polymorphismus [191]. Die Regulation der PAI-1-Expression durch den 4G/5G-Polymorphismus scheint also abhängig von verschiedenen Stimuli bzw. Transkriptionsfaktoren und vom Zelltyp zu sein.

Eine Zunahme des PAI-1-Plasmalevels vom 5G/5G- über den 4G/5G- zum 4G/4G-Genotyp wurde mehrfach bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben [187, 188, 196, 197]. Zudem scheint der Polymorphismus auch die Relation von PAI-1-Leveln und Umweltfaktoren zu beeinflussen, so zeigte sich beispielsweise in einer Untersuchung ein Zusammenhang zwischen PAI-1-Leveln und Cholesterol nur für Patienten mit dem 5G/5G-Genotyp [198]. Der Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem PAI-1-Plasmalevel wurde wiederholt auch bei gesunden Probanden bzw. in bevölkerungsbasierten Studien beobachtet [188, 198–201]. Andere Untersuchungen konnten dies jedoch nicht belegen [202, 203]. Allerdings hat der 4G/5G-Polymorphismus einen eher geringen Anteil an der interindividuellen Variabilität des PAI-1-Levelns von etwa 1%, während z. B. die Insulinresistenz etwa 20% der interindividuellen Variabilität des PAI-1-Levelns bedingt [199, 200]. Das 4G-Allel ist in der weißen Bevölkerung Europas und der USA geringfügig häufiger als das 5G-Allel. Die Verteilung ist ungefähr 4G: 54%, 5G: 46%. Der heterozygote Genotyp ist der häufigste mit einem Anteil von ca. 50% gefolgt vom 4G/4G-Genotyp mit ca. 30% und dem 5G/5G-Genotyp mit ca. 20% [188, 198, 201]. Eine große bevölkerungsbasierte Studie belegte keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung zwischen weißen und schwarzen US-Amerikanern [200].

1.2.8 Die klinische Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus für kardiovaskuläre Erkrankungen und Malignome insbesondere für das Ovarialkarzinom

Der 4G/5G-Polymorphismus ist bei diversen Erkrankungen von Bedeutung [204]. Er beeinflusst u. a. das Auftreten von IgE-vermittelten Allergien [205], den Verlauf einer Sepsis [206] und das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [207]. Patienten mit koronarer Herzerkrankung zeigen häufig einen erhöhten PAI-1-Plasmalevel [208], der auch von prognostischer Bedeutung ist [209]. Eine schwedische Fallkontrollstudie mit jungen Männern zeigte, dass der 4G/4G-Genotyp verglichen mit den anderen Genotypen die Chance, einen Myokardinfarkt zu erleiden, mehr als verdoppelte [188]. Während einige Autoren dies bestätigten [196], demonstrierten

andere keinen Zusammenhang [200, 210]. Eine Metaanalyse von 37 Studien ergab lediglich eine minimale Risikoerhöhung für einen Myokardinfarkt von 1,04 (95% KI [1,00-1,09]) pro vorhandenem 4G-Allel [211]. Das Überleben nach Myokardinfarkt [212] oder das Ausmaß einer Restenose [213] beeinflusst der 4G/5G-Polymorphismus nicht. In der Subgruppe von Patienten ohne Diabetes oder Hyperlipidämie war das 4G-Allel jedoch in einer Untersuchung mit einem erhöhten Reinfarktisiko verknüpft [214]. Der PAI-1-Plasmalevel korreliert auch mit den Faktoren des metabolischen Syndroms [215]. Diese variieren ihn stärker als der 4G/5G-Polymorphismus [216]. Der 4G/4G-Genotyp ist mit etwas höheren Werten für Blutdruck, BMI, Triglyzeride [217], Glukose und tendenziell auch Insulin assoziiert [218]. Andere Autoren konnten dies nicht bestätigen [219]. Insulinresistenz erhöht das Herzinfarktisiko interessanterweise besonders stark beim Vorliegen des 4G/4G-Genotyps [197]. Für den ischämischen Schlaganfall zeigten sich für das 4G-Allel risikoerhöhende [220] und risikomindernde Effekte [221]. Eine Metaanalyse von 22 Studien konnte keine Assoziation des 4G/5G-Polymorphismus mit dem Schlaganfallrisiko belegen [222]. Möglicherweise hat PAI-1 bei dieser Erkrankung sowohl schützende als auch schädigende Eigenschaften [207]. Auf die Prognose von Schlaganfallpatienten hat der 4G/5G-Polymorphismus keinen Einfluss [223, 224]. PAI-1 ist häufig erhöht bei Patienten mit gestörter Fibrinolyse und venösen Thrombosen [225]. Während einige Autoren für deren Bildung keine Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus demonstrierten [210, 226], belegten andere eine Risikominderung durch das 5G-Allel [227]. Zwei Metaanalysen zeigten, dass das 4G-Allel ein milder Risikofaktor für die Entstehung venöser Thrombosen ist [228], v. a. in Kombination mit anderen thrombophilen Mutationen [229]. Die Rezidivrate venöser Thrombosen ist unabhängig vom 4G/5G-Polymorphismus [226, 230]. Eine kleine Studie wies allerdings nach, dass bei Patienten mit persistierenden venösen Thromben häufig hohe PAI-1-Plasmalevel und das 4G-Allel vorliegen [231].

Da der 4G/5G-Polymorphismus die Expression von PAI-1 mitbestimmt und PAI-1 durch seinen Einfluss auf die Zellmigration, Invasivität und Angiogenese für die Tumorprogression von Bedeutung ist, wurde dieser Polymorphismus schon in Bezug auf verschiedene Malignome untersucht. Der 4G/5G-Polymorphismus spielt u. a. eine Rolle für das hepatozelluläre Karzinom [232], das Endometriumkarzinom [233] und das Mammakarzinom [234]. Zum letztgenannten gibt es die meisten Untersuchungen. Allerdings waren die Ergebnisse teilweise widersprüchlich. Weniger untersucht ist der Einfluss des 4G/5G-Polymorphismus auf den Verlauf oder die Inzidenz des Ovarialkarzinoms. Bisher liegen zwei Studien vor, die den 4G/5G-Polymorphismus von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und gesunden Probandinnen vergleichen, ohne signifikante Unterschiede zu demonstrieren [235, 236].

2 Zielstellung

Es gibt viele Hinweise darauf, dass PAI-1 die Tumorprogression bei vielen Malignomen beeinflusst, wie z. B. beim Mammakarzinom, aber auch beim Ovarialkarzinom. Mehrere Studien *in vitro* und *in vivo* demonstrierten, dass sich der 4G/5G-Polymorphismus auf die PAI-1-Expression und den PAI-1-Plasmalevel auswirkt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Inzidenz, der Prognose und einigen klinisch-pathologischen Faktoren des Ovarialkarzinoms zu untersuchen und so einen Beitrag zur Erforschung der Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus beim Ovarialkarzinom zu leisten. Die Assoziation eines Allels bzw. eines Genotyps des 4G/5G-Polymorphismus mit einer höheren Erkrankungschance könnte zur Identifizierung einer Risikogruppe und möglicherweise zur Früherkennung eines Ovarialkarzinoms durch gezielte Screening-Untersuchungen beitragen. Zudem könnte die Feststellung eines Einflusses des 4G/5G-Polymorphismus auf den Krankheitsverlauf möglicherweise eine Anpassung der individuellen Therapie ermöglichen.

3 Material und Methodik

3.1 Substanzen und Geräte

Chemikalien

Agarose	Agarose Serva, Standard EEO, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumacetat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BsII-Restriktionsenzym	New England BioLabs (NEB), Frankfurt/Main, Deutschland
NEBuffer 3	New England BioLabs
Chloroform	AppliChem
EDTA	AppliChem
Ethanol 70 Vol-%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol 100 Vol-%	Carl Roth
NP 40	AppliChem
NaCl	AppliChem
PCR-Primer	MWG-Eurofin, Ebersberg, Deutschland
Phenol	AppliChem
Phenol-Chloroform	AppliChem
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
RNase A	Promega, Madison, USA
SDS	AppliChem
Tris Base	Carl Roth
Wasser	Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
GoTaq Green Mastermix 2x	Promega

Puffer-Zusammensetzung

NEBuffer 3 von BsII	100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCL; 10 MgCl ₂ ; 1 mM DTT; pH 7,9
5x TBE- Puffer	54 g Tris Base; 27,5 g Borsäure; 20 ml EDTA (ad 1000 ml deionisiertes Wasser; pH 8,0)
Proteinase-K-Puffer	50 mM Tris (pH 7,6), 25 mM EDTA, 0,5% NP 40 und 0,5% SDS
GoTaq Green Mastermix	GoTaq®-DNA-Polymerase in 2x Green GoTaq Reaction

Buffer (pH 8,5) je 400 μ M dATP, dGTP, dCTP, dTTP;
3 mM MgCl₂; enthält zwei Farbstoffe zur ungefähren
Beurteilung der DNA-Auftrennung

Geräte

Geldokumentationssystem	Intas Modular, Royal Biotech GmbH, Potsdam, Deutschland
Elektrophoresekammer	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Inkubationswasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Inkubator	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Küvetten 100 μ l	Hellma, Müllheim, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR 3000, Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikrowellengerät	Bosch, Stuttgart, Deutschland
PCR-Gerät	T Gradient, Biometra GmbH
Pipettierhilfe Pipettboy	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Schüttler	Hyper Shaker, neoLap, Heidelberg, Deutschland
Spannungsgerät	Standard Power Pack P25, Biometra GmbH
Spectrophotometer	Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech, Deutschland
Thermometer	Carl Roth
UV-Transilluminator	Typ NU-72, Carl Roth
Vortexer	Heidolph REAX 2000, Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Waage Scaltec SPB62	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 13000 RPM	Biofuge pico, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge 6000 RPM	Micro Centrifuge, Carl Roth

Gebrauchswaren

Glaswaren	Fisherbrand, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Deutschland; MultiGuard Barrier Tips, Sorenson, BioScience, Inc, Allentown, USA
1,5 ml und 2,0 ml Tubes	Eppendorf AG, Deutschland
0,2 ml Thermo-Strip	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Handschuhe	Latexhandschuhe, Transatlanti Handelsgesellschaft Stolpe und Co. GmbH, Wehrheim, Deutschland; Nitratrex Nitrile, Ansell, München, Deutschland

Primer	Richtung	Primersequenz	Länge
PAI-BsiY1-Forw1	vorwärts	5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'	22 b
PAI-BsiY1-Forw3	vorwärts	5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGTGGGGG-3'	27 b
PAI-BsiY1-Rev	rückwärts	5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'	21 b

DNA-Ladder

pUC Mix Marker 8, Fermentas
 Ladder 50 bp DNA Ladder, New England Biolabs
 O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder ready to use, Invitrogen

Ovarzelllinien

Efo 27, OAW, Efo 21, SKOV, OVCar	Humanes Adenokarzinom des Ovars
A 2780	Humanes Karzinom des Ovars
HOSE	Humanes immortales Epithel des Ovars
Es 2	Humanes klarzelliges Karzinom des Ovars
PA-1	Humanes Teratokarzinom des Ovars

3.2 Das Patienten- und das Kontrollkollektiv

3.2.1 Das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 104 Patientinnen mit Ovarial-, Peritoneal- oder Tubenkarzinom, die sich im Zeitraum von 1999 bis 2008 im Universitätsklinikum Halle (Saale) vorgestellt hatten. Es wurden nur Patientinnen rekrutiert, bei denen das Datum der Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms bekannt war und von denen Blut zur Bearbeitung zur Verfügung stand. Bei 75 Patientinnen, die im Universitätsklinikum Halle therapiert wurden, beurteilte das Institut für Pathologie der medizinischen Fakultät der Universität Halle-Wittenberg die Tumoren. Weitere 15 Patientinnen stellten sich erst zur Therapie der Primärerkrankung vor, bzw. zur Therapie einer Progression oder eines Rezidivs oder um eine Zweitmeinung einzuholen. Die restlichen 14 Patientinnen stellten sich bei bekanntem Ovarialkarzinom unabhängig von ihrer malignen Erkrankung vor. Bei den beiden letztgenannten Gruppen lagen nur unzureichende klinisch-pathologische Daten vor, sodass die Subgruppenanalyse in dieser Arbeit ausschließlich mit den Patientinnen durchgeführt wurde, bei denen der histologische Befund durch das Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Halle-Wittenberg festgestellt oder bestätigt wurde. Lediglich zur Berechnung der Erkrankungschance und der Altersverteilung in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

wurden alle Patientinnen eingeschlossen. Die Datenerhebung erfolgte retrospektiv durch Akteneinsicht. Das Blut der Ovarialkarzinom-Patientinnen wurde im Zeitraum von 1999 bis 2008 abgenommen und asserviert. Das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung lag zwischen 23 und 89 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 61 (60,8) Jahre (Standartabweichung $\sigma = 11,7$). Bei den 75 Patientinnen, deren Tumorhistologie in Halle bestimmt wurde, betrug das Durchschnittsalter 61,5 Jahre (Standartabweichung $\sigma = 12,2$). Bei den in Halle bestimmten Tumorhistologien handelte es sich um 62 (82,7%) primäre Ovarialkarzinome, neun (12,0%) primäre Peritonealkarzinome und vier (5,3%) primäre Tubenkarzinome. Wegen ihrer gemeinsamen embryologischen Herkunft aus dem Zölomepithel wurden auch das primäre Peritoneal- und Tubenkarzinom zu der Gruppe der Ovarialkarzinome gerechnet. Die überwiegende Anzahl der Ovarialkarzinome (64 von 75, 85,3%) hatte eine seröse Histologie. Von den verbleibenden Tumoren waren sechs (8,0%) endometrioid, zwei (2,7%) klarzellig, zwei (2,7%) transitionalzellig und eins (1,3%) gemischtzellig (s. Tab. 2). Bei nur neun (12,0%) Patientinnen wurde ein frühes Stadium des Ovarialkarzinoms (FIGO I-IIA) diagnostiziert, bei den anderen 66 (88,0%) Patientinnen ein fortgeschrittenes Stadium (FIGO IIB-IV) (s. Tab. 3). Da die Daten für die TNM-Klassifikation nicht vollständig waren, erfolgte diesbezüglich keine gesonderte Auswertung. Bei 73 Patientinnen wurde der Aszites-Status dokumentiert. Von diesen Patientinnen konnte bei 50 (68,5%) mindestens 500 ml Aszites nachgewiesen werden, bei 23 (31,5%) kein Aszites oder weniger als 500 ml. Bei 64 Patientinnen lagen Daten zum Grading des Tumors vor. Bei sieben (10,9%) Patientinnen war der Tumor gut differenziert (G1), bei 18 (28,1%) Patientinnen mittelgradig (G2) und bei 39 (60,9%) Patientinnen gering differenziert (G3). Von den 75 Patientinnen, deren Tumorhistologie im Institut für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg beurteilt wurde, wurden 68 Patientinnen einer platinhaltigen Chemotherapie unterzogen. Bei 56 von Ihnen lagen Informationen über den weiteren Verlauf vor. Diese wurden bezüglich ihres rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens untersucht. Bei insgesamt 39 (69,6%) dieser 56 Patientinnen wurde ein Rezidiv, bzw. Progress oder Tod durch das Ovarialkarzinom nachgewiesen. Insgesamt starben 36 (64,3%) der 56 Patientinnen. Das durchschnittliche Follow-up betrug 51 Monate, das kürzeste Follow-up 14 Monate und das längste Follow-up 149 Monate. Von den 56 Patientinnen, bei denen Informationen zum weiteren Verlauf vorlagen, wurden 25 (44,6%) Patientinnen ohne Resttumor operiert, bei 31 (55,4%) Patientinnen lag postoperativ ein Tumorrest vor, bzw. erfolgte keine Operation.

Tab. 2: Übersicht über die Patientencharakteristika

Variable	Anzahl der einbezogenen Patientinnen	Häufigkeit
Alter	104	
23-89 Jahre		
Durchschnitt 60,8 Jahre; Median 62 Jahre		
Valide klinisch-pathologische Daten	75	
Ursprungsort		
Primäres Ovarialkarzinom	62	82,7%
Primäres Peritonealkarzinom	9	12,0%
Primäres Tubenkarzinom	4	5,3%
Histologie		
Serös	64	85,3%
Endometrioid	6	8,0%
Klarzellig	2	2,7%
Transitionalzellig	2	2,7%
Gemischtzellig	1	1,3%
FIGO-Stadium		
Frühes Stadium (FIGO I-IIA)	9 (davon 4 serös)	12,0%
Fortgeschrittenes Stadium (FIGO IIB-IV)	66 (davon 60 serös)	88,0%
Aszites	73	
< 500 ml	23 (davon 19 serös)	31,5%
>= 500 ml	50 (davon 43 serös)	68,5%
Grading	64	
G1	7 (davon 6 serös)	10,9%
G2	18 (davon 16 serös)	28,1%
G3	39 (davon 34 serös)	60,9%
Überlebensanalyse	56	
Rezidiv	39	69,6%
Tod	36	64,3%
Resttumor	31	55,4%

Tab. 3: Verteilung der FIGO-Stadien

FIGO-Stadium	IA	IB	IC	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC	IV
Patientinnen	3	0	6	0	0	4	2	3	38	19

3.2.2 Das Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bestand aus 157 Frauen ohne bekannte Tumorerkrankung. Es setzt sich zusammen aus 81 Blutspenderinnen und 76 Patientinnen mit einer urogynäkologischen Erkrankung. Das Durchschnittsalter und der Altersmedian der Kontrollgruppe waren mit 59,5 Jahren bzw. 60 Jahren dem des Ovarialkarzinompatienten-Kollektivs (60,8 Jahre bzw. 62 Jahre) ähnlich. Die Proben des Kontrollkollektivs wurden im Zeitraum von 2001 bis 2008 im Universitätsklinikum Halle (Saale) abgenommen und asserviert.

3.3 Untersuchungsmaterial

Die DNA für die Untersuchung des 4G/5G-Polymorphismus wurde aus dem Blut der Patientinnen und Probandinnen isoliert. Ein positives Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für diese Untersuchung lag vor. Das Material der Patientinnen und Kontrollprobandinnen mit einer urogynäkologischen Erkrankung wurde bis zur Bearbeitung bei -80 °C kryokonserviert. Die Buffy Coat-Schichten der Blutspenden wurden bei -20 °C aufbewahrt und zügig bearbeitet. Bereits isolierte Leukozyten, Buffy Coat und Vollblut standen als Untersuchungsmaterial zur Verfügung.

3.4 Isolierung genomischer DNA

3.4.1 DNA-Isolierung aus Leukozyten

Zur DNA-Isolierung aus Leukozyten wurden die Zellen mit 400 µl Proteinase-K-Puffer, der mit 15 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE-Puffer gelöst) versetzt war, für drei Stunden bei 56 °C inkubiert. Um die angedauten Proteine zu entfernen, wurde der nun homogenen viskösen Lösung das gleiche Volumen Phenol zugesetzt. Das Gemisch wurde vorsichtig drei Minuten geschwenkt und die proteinhaltige Phenol-Phase von der DNA-haltigen wässrigen Phase durch Zentrifugieren in einer Mikrofuge bei 13000 g für drei Minuten getrennt. Die DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgten zwei weitere Extraktionen mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) und Chloroform allein, um restliches Protein und Phenol zu entfernen. Zur Fällung der DNA wurde erst ein Drittel des Volumens an 10 M Ammoniumacetat (NH₄Ac) hinzugefügt, dann das Doppelte des nun bestehenden Volumens an 100%igem Isopropanol. Durch Schwenken des Gemisches fiel die DNA aus. Für eine vollständige Fällung wurde das Gemisch über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C bei 13000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert, das Ethanol vorsichtig entfernt und das Pellet dann 10-15 Minuten an der Luft getrocknet. Dann wurde die DNA in 10 µl sterilem Wasser oder TE-

Puffer über Nacht bei 4 °C gelöst. Anschließend wurden die Proben mit 2 µl RNase (10 mg/ml) für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert.

3.4.2 DNA-Isolierung aus Vollblut und Buffy Coat

Die DNA-Isolierung aus Vollblut und Buffy Coat wurde mit Hilfe des Wizard Genomic Purification Kit der Firma Promega nach Herstellervorschrift durchgeführt.

300 µl EDTA-versetztes Blut oder Buffy Coat wurden mit 900 µl Erythrozyten-lysender Lösung versetzt und die Suspension vorsichtig fünf- bis sechsmal gewendet. Die Mischung wurde zehn Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und in dieser Zeit zwei- bis dreimal gewendet. Die Leukozyten wurden durch Zentrifugieren bei 13000 g für 20 Sekunden pelletiert. War das Pellet noch rötlich, wurde die Lyse der Erythrozyten so oft wiederholt, bis das Pellet weiß war. Zur Lyse der Leukozyten wurde das Pellet kräftig gevortext. Dann wurden 300 µl kernlysierende Lösung zugegeben und die Mischung fünf- bis sechsmal in einer Pipette hochgezogen, wodurch die Lösung viskös wurde. Bei sichtbarem Debris wurde die Mischung eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert und ggf. weitere 100 µl kernlysierende Lösung zugegeben. Die RNA wurde dann durch Zugabe von 1,5 µl RNase-Lösung (4 mg/ml) und Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten verdaut. Die Proteine wurden durch Zugabe von 100 µl Proteinfällungslösung, 10-20 Sekunden Vortexen und anschließendes Zentrifugieren bei 13000 g bei Raumtemperatur für drei Minuten entfernt. Zur DNA-Fällung wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 300 µl Isopropanol überführt. Die DNA-Fällung und -Lösung wurde dann wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

3.5 DNA-Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentration wurde mittels Spektralphotometrie ermittelt. Das Prinzip beruht auf der Absorption von Licht (Extinktion E) in Flüssigkeiten, wobei gilt:

$$E = \log \frac{I_0}{I_1}$$

I_0 = Eintrittsintensität des Lichtes [W/m²]; I_1 = Austrittsintensität [W/m²]

Nach dem Lambert-Beer-Gesetz kann die Konzentration des gelösten Stoffes aus der Intensität des ein- und austretenden Lichtes wie folgt berechnet werden:

$$c = \log \frac{I_0}{I_1} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d}$$

c = Konzentration der zu analysierenden Substanz [mol/l]; ϵ = spezifischer molarer Extinktionskoeffizient [cm²/mol];

d = Schichtdicke der Lösung in der Küvette [cm]

Die Konzentration der DNA wurde in einer Quarzküvette bei 260 nm gemessen. Messungen wurden auch bei 230 nm (Absorptionsminimum der DNA), bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) und bei 330 nm (nahezu keine Absorption von DNA) durchgeführt. Von der Extinktion bei 260 nm wurde die Extinktion bei 330 nm subtrahiert. Eine DNA-Lösung mit einer Extinktion von 1 enthält ~ 50 µg/ml DNA. Die DNA-Konzentration [DNA] in µg/ml von einer unbekanntem DNA-Lösung lässt sich also wie folgt berechnen:

$$[\text{DNA}] \text{ µg/ml} = E_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 50 \text{ µg/ml}$$

Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (E_{260}/E_{280}) erlaubt eine Einschätzung der Reinheit der DNA. Der Wert sollte bei 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination mit Proteinen hin. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 230 nm (E_{260}/E_{230}) zeigt an, ob Verunreinigungen, wie EDTA, in der Probe vorhanden sind. Die Werte sollten zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

3.6 PCR

Die von Mullis und Faloona erfundene PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Vermehrung von bekannten spezifischen DNA-Abschnitten [237]. Drei Phasen unterschiedlicher Dauer und Temperatur werden zyklisch wiederholt:

1. die Denaturierung der DNA zu Einzelsträngen bei ca. 95 °C; 2. die Anlagerung von zwei spezifischen Primern, einem Vorwärts- und einem Rückwärts-Primer, bei 50-70 °C (Primer sind synthetische Oligonukleotide, die meist aus 18-30 Nukleotiden bestehen und deren Basensequenz komplementär zu der Zielsequenz der zu vermehrenden DNA ist.); 3. die eigentliche DNA-Synthese bei ca. 72 °C durch eine thermostabile DNA-Polymerase, wie z. B. die Taq-Polymerase. Durch Wiederholung der Schritte in einem Thermocycler steigt die Menge des spezifischen DNA-Abschnitts exponentiell an, begrenzt durch die Menge an vorhandenen Primern und dNTPs.

Es wurden 2,0 µl steriles Wasser mit 1,0 µl Primer PAI-BsiY1-Forw1 oder PAI-BsiY1-Forw3 (Kontrolle), 1,0 µl Primer PAI-BsiY1-Rev, 6,0 µl 2x Go Taq Mastermix und 2,0 µl DNA (50 ng/µl) gemischt. Der verwendete Go Taq Mastermix enthält bereits die Nukleotide und die DNA-Polymerase, eine Hot-start Taq-Polymerase, die durch einen Antikörper inhibiert und erst durch hohe Temperaturen aktiviert wird. Dies soll die Vermehrung von Sequenzen, an die sich Primer bei niedrigen Temperaturen unspezifisch anlagern können, verhindern. Für jede DNA-Probe wurde die PCR mit dem PAI-BsiY1-Forw1- und PAI-BsiY1-Forw3-Primer durchgeführt. Außerdem wurde ein Negativansatz ohne DNA mitgeführt. Die PCR wurde anlehnend an die von den Arbeitsgruppen um Margaglione [238] und Alvarez-Millán [239] beschriebenen Protokolle durchgeführt und durch die Doktorandin Ute Benesch in unserem Labor etabliert (PCR-Einstellungen s. Tab. 4).

Tab. 4: PCR-Einstellungen

Vorgang	Temperatur	Dauer
Hot Start	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	60 °C	1 min
Synthese	72 °C	2 min
Stopp	4 °C	

3.7 Genotypisierung und DNA-Restriktion

Zur Genotypisierung der 4G/5G-polymorphen Sequenz im PAI-1-Promotor wurden zwei verschiedene Vorwärtsprimer (PAI-BsiY1-Forw1 und PAI-BsiY1-Forw3) und ein Rückwärtsprimer (PAI-BsiY1-Rev) benutzt. Beide Vorwärtsprimer erkennen eine Sequenz in unmittelbarer Nähe der 4G/5G-polymorphen Sequenz. In beiden Vorwärtsprimern ist ein Adenin durch Cytosin ersetzt, um den 5-terminalen Teil der Erkennungssequenz, also CC, für das Restriktionsenzym BsiI (BsiY1) zu erzeugen. Denn bei Vorliegen eines GG-Dinukleotids im Abstand von sieben Nukleotiden von CC in 3'-Richtung schneidet BsiI die DNA. Dies ist bei Benutzung des PAI-BsiY1-Forw1-Primers nur dann der Fall, wenn ein 5G-Allel vorliegt. PCR-Produkte mit einem 4G-Allel werden also nicht geschnitten. Beim PAI-BsiY1-Forw3-Primer ist die BsiI-Sequenz bereits in der Primersequenz enthalten. Er erzeugt also künstlich ein PCR-Produkt mit dem 5G-Allel. Daher werden PCR-Produkte, die mit dem PAI-BsiY1-Forw3-Primer entstehen, immer durch BsiI geschnitten und dienen als positive Kontrolle.

BsiI schneidet seine Erkennungssequenz wie folgt:

sense-strand: 5'...CCNNNNN | NNGG ...3', antisense-strand: 3'...GGNN | NNNNNCC... 5'

Bei Vorliegen eines 5G-Allels wird ein 100bp-PCR-Fragment erzeugt, das in zwei Fragmente geschnitten wird, welche 23 bp und 77 bp lang sind. Liegt ein 4G-Allel vor, entsteht ein 99bp-Fragment, das nicht geschnitten wird (s. Abb. 6). Bei einem heterozygoten 4G/5G-Genotyp findet man drei Fragmente: ein 99bp-, ein 77bp- und ein 23bp-Fragment. Für den Verdau mit dem Restriktionsenzym BsiI wurden 6 µl PCR-Produkt mit 3,5 µl Wasser und 0,5 µl BsiI (5 Units) versetzt und für eine Stunde bei 55 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden weitere 6 µl PCR-Produkt mit Puffer ohne Enzym inkubiert.

5' - CACAGAGAGAGTCTGGC CACGTGGGAGTCAGCCGTGTATCATCGGAGGC
 GGCCGGGCACATGGCAGGGATGAGGGAAAGACCAAGAGTCCTCTGTTGG - 3'
 PCR-Produkt bei Vorliegen eines 4G-Allels (99 bp)

5' - CACAGAGAGAGTCTGGC CACGTG/GGGGAGTCAGCCGTGTATCATCGGAGGC
 GGCCGGGCACATGGCAGGGATGAGGGAAAGACCAAGAGTCCTCTGTTGG - 3'
 PCR-Produkt bei Vorliegen eines 5G-Allels (100 bp)

Abb. 6: PCR-Produkte, wenn der Primer PAI-BsiY1-Forw1 benutzt wurde; gelb: Sequenz des Forwärts-Primers PAI-BsiY1-Forw1, pink: Cytosin, welches das Adenosin des natürlichen DNA-Stranges ersetzt, um ein künstliches CC-Dinukleotid zu erzeugen, welches Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym BslI ist, grün: 4G/5G-Polymorphismus, blau: komplementäre Sequenz zum Rückwärtsprimer PAI-BsiY1-Rev, Querstrich: Schnittstelle von BslI

3.8 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte mittels einer DNA-Elektrophorese in einem 2,1%igen Agarosegel. Da im Go Taq Mastermix bereits Ladungspuffer enthalten ist, konnten die Proben direkt in die Gel-Slots pipettiert werden. DNA-Größenmarker, z. B. der pUC Mix Marker 8, dienten zur Beurteilung der Fragmentgrößen. Die Proben wurden in 0,5 x TBE-Puffer 45 Minuten bei 160 Volt elektrophoretisch separiert. Anschließend wurde das Gel unter Verwendung von 2 µg/ml Ethidiumbromid 20 Minuten auf einem Schüttler in einem Volumen von 300 ml 0,5 x TBE-Puffer gefärbt und das Gel kurz mit TBE-Puffer gewaschen. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert (s. Abb. 7).

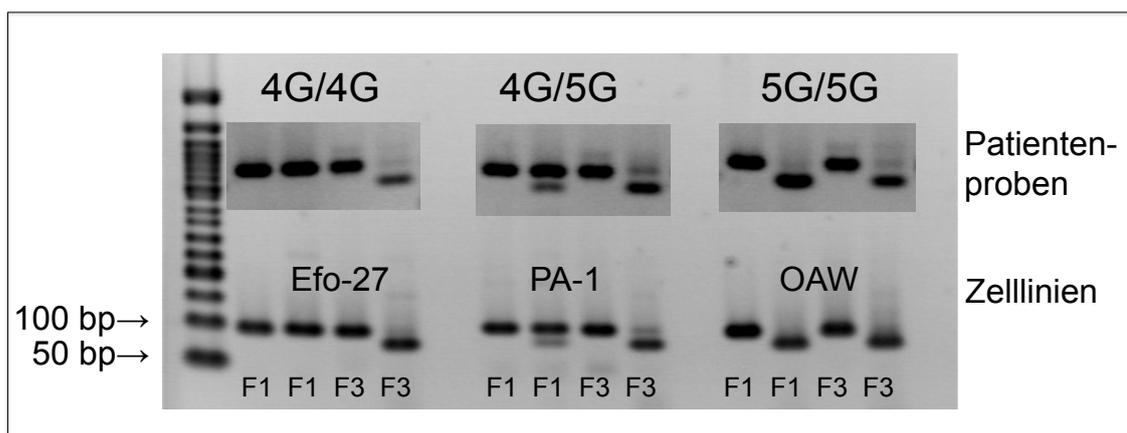


Abb. 7: Die Genotypen des 4G/5G-Polymorphismus. Vier Slots pro Probe. Slot 1: PAI-BsiY1-Forw1-Primer (F1) unverdaut; Slot 2: PAI-BsiY1-Forw1-Primer (F1) verdaut mit BslI; Slot 3: PAI-BsiY1-Forw3 (F3) unverdaut; Slot 4: PAI-BsiY1-Forw3 (F3) geschnitten durch BslI. Der F3-Primer enthält bereits die komplette Erkennungssequenz des Restriktionsenzym und erlaubt daher eine vollständige Spaltung des PCR-Produkts durch das Enzym unabhängig vom Genotyp. Dies diente zur positiven Kontrolle.

3.9 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Zur Berechnung der Erkrankungschance in Abhängigkeit vom Genotyp oder der Allelpositivität wurden Odds Ratios und 95%-Konfidenzintervalle mittels logistischer Modelle kalkuliert. Unterschiede in der Häufigkeit der Genotypen und Allele zwischen Fällen und Kontrollen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet. Wenn der Chi-Quadrat-Test nicht sinnvoll war, d.h. mindestens eine Zelle in der Tabelle der erwarteten Häufigkeiten einen Wert < 5 enthielt, wurde der ANOVA-Test verwendet und mit ihm die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen (Genotypen oder Allele) verglichen. Die Verteilung der Allele, also die Allelpositivität, wurde für beide Allele einzeln untersucht. Patientinnen mit mindestens einem 4G-Allel (4G/4G-Genotyp und 4G/5G-Genotyp) wurden mit den Patientinnen ohne 4G-Allel (5G/5G-Genotyp) verglichen. Zusätzlich wurden Patientinnen mit mindestens einem 5G-Allel (5G/5G- und 4G/5G-Genotyp) mit den Patientinnen ohne 5G-Allel (4G/4G-Genotyp) verglichen. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde die Altersverteilung im Untersuchungskollektiv in Abhängigkeit vom Genotyp oder der Allele beurteilt. Für die Beurteilung eines möglichen Einflusses des Genotyps oder der Allele auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben wurde die Kaplan-Meier-Methode verwendet. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank-Test verglichen. Als signifikant galten p -Werte $< 0,05$. Zur Berechnung des Hardy-Weinberg-Equilibriums wurde die DeFinetti-Software genutzt. Diese ist kostenlos auf der Homepage des Instituts für Humangenetik der Technischen Universität München und des Helmholtz-Zentrums (<http://ihg.gsf.de>) verfügbar.

4 Ergebnisse

4.1 Der 4G/5G-Polymorphismus und die Chance an einem Ovarialkarzinom zu erkranken

Die Verteilung der Genotypen des 4G/5G-Polymorphismus der Patienten wurde mit der Verteilung der Genotypen der Kontrollpersonen verglichen (s. Tab. 5 und Tab. 6). Im gesamten Patientenkollektiv hatten tendenziell mehr Patientinnen den 4G/5G-Genotyp (55,8%) und weniger Patientinnen den 4G/4G- oder 5G/5G-Genotyp als Probandinnen der Kontrollgruppe (49,1%). Daher hatten Frauen mit dem 4G/5G-Genotyp auch tendenziell eine ca. 1,3-fach (95% KI [0,638-2,469]) größere Chance, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Diese Tendenzen waren jedoch statistisch weder bei der Untersuchung der Genotypen, noch des 4G- oder 5G-Allels signifikant. Die Allelfrequenz, also die relative Häufigkeit der Allele, betrug im Patientenkollektiv 0,55 für das 4G-Allel und 0,45 für das 5G-Allel. Die Allelfrequenz in der Kontrollgruppe war 0,56 für das 4G-Allel und 0,44 für das 5G-Allel. Die Allelfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant. Beide Gruppen waren im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) (s. Tab. 5).

Tab. 5: Genotypen, Allele und Allelfrequenzen des 4G/5G-Polymorphismus im gesamten Patientenkollektiv, im Teilkollektiv mit bekannten klinisch-pathologischen Faktoren und im Kontrollkollektiv

		Gesamtes Patientenkollektiv N = 104	Kollektiv mit bekannten klinisch-pathologischen Faktoren N = 75	Kontrollen N = 157
Genotyp	4G/4G	28 (26,9%)	20 (26,7%)	50 (31,8%)
	4G/5G	58 (55,8%)	39 (52,0%)	77 (49,1%)
	5G/5G	18 (17,3%)	16 (21,3%)	30 (19,1%)
Allelpositivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	86 (82,7%)	59 (78,7%)	127 (80,9%)
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	76 (73,1%)	55 (73,3%)	107 (68,2%)
Allelfrequenz	Anzahl der 4G-Allele	114 (0,55)	79 (0,53)	177 (0,56)
	Anzahl der 5G-Allele	94 (0,45)	71 (0,47)	137 (0,44)
	HWE p-Wert	p = 0,603	p = 0,710	p = 0,970

Tab. 6: Chancenverhältnis (OR = odds ratio) an einem Ovarialkarzinom zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

		OR [95% KI]	p-Wert
Genotyp	4G/4G vs. 5G/5G	0,933 [0,443-1,967]	0,856
	4G/5G vs. 5G/5G	1,255 [0,638-2,469]	0,510
Allelpositivität	Mind. ein 4G-Allel vs. kein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G vs. 5G/5G)	1,129 [0,592-2,152]	0,713
	Mind. ein 5G-Allel vs. kein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G vs. 4G/4G)	1,268 [0,733-2,194]	0,395

4.2 Der 4G/5G-Polymorphismus im Patientenkollektiv und im Teilkollektiv

In dem Teilkollektiv (N=75) mit bekannten klinisch-pathologischen Faktoren trugen mit 52,0% weniger Patientinnen den heterozygoten 4G/5G-Genotyp (Gesamtkollektiv: 55,8%) und mit 21,3% mehr Patientinnen den homozygoten 5G/5G-Genotyp (Gesamtkollektiv 17,3%) als im Gesamtkollektiv, während der Anteil des homozygoten 4G/4G-Genotyps ungefähr gleich groß war (s. Tab. 5). Die Unterschiede zwischen dem Teil- und dem Gesamtkollektiv waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,784$). Auch für die Verteilung der Allele zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (s. Tab. 6). Im Teilkollektiv betragen die Allelfrequenzen 0,53 für das 4G-Allel und 0,47 für das 5G-Allel. Es war ebenfalls im Hardy-Weinberg-Equilibrium (s. Tab. 5).

4.3 Das seröse und das nicht-seröse Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus

Von den 75 Ovarialkarzinomen mit bekannten klinisch-pathologischen Faktoren (Teilkollektiv in Tab. 5) waren 64 serös und elf nicht serös. Während Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom eine ähnlich hohe Häufigkeit des 4G/5G-Genotyps zeigten wie die Kontrollgruppe (51,5% vs. 49,1%), war der 4G/5G-Genotyp bei Patientinnen mit nicht-serösem Ovarialkarzinom etwas häufiger (54,5%). Letztere hatten besonders häufig den 5G/5G-Genotyp (36,4%). In der kleinen Gruppe der elf Patientinnen mit nicht-serösem Ovarialkarzinom hatten die Patientinnen tendenziell aber statistisch nicht signifikant häufiger das 5G-Allel (s. Tab. 7) als Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom ($p = 0,158$). Letztere hatten ungefähr genauso häufig das 4G-Allel wie die Kontrollen und tendenziell häufiger das 4G-Allel als Patientinnen mit einem nicht-serösen Ovarialkarzinom ($p = 0,193$).

Tab. 7: Der 4G/5G-Polymorphismus bei Patientinnen mit serösem und nicht-serösem Ovarialkarzinom und bei den Kontrollen

		Pat. mit serösem Ovarialkarzinom N = 64	Pat. mit nicht- serösem Ovarialkarzinom N = 11	p-Wert	Kontrollen N = 157
Genotyp	4G/4G	19 (29,7%)	1 (9,0%)	0,245	50 (31,8%)
	4G/5G	33 (51,5%)	6 (54,5%)		77 (49,1%)
	5G/5G	12 (18,8%)	4 (36,4%)		30 (19,1%)
Allel- positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	52 (81,3%)	7 (63,6%)	0,193	127 (80,9%)
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	45 (70,3%)	10 (90,9%)	0,158	107 (68,2%)

4.3.1 Die Chance an einem serösen und nicht-serösen Ovarialkarzinom zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Chance, an einem serösen Ovarialkarzinom zu erkranken, gezeigt werden; das Chancenverhältnis war hier stets sehr nahe der eins (s. Tab. 8). Im Gegensatz dazu scheint nach den erhobenen Daten die Chance, an einem nicht-serösen Ovarialkarzinom zu erkranken, für eine Frau mit einem 5G/5G-Genotyp im Vergleich einer Frau mit einem 4G/4G-Genotyp tendenziell mehr als sechsfach (1: 0,150) höher zu sein. Leider konnte dieser Befund aufgrund der geringen Probenzahl von elf Patientinnen statistisch nicht abgesichert werden (95% KI [0,016-1,406]).

Tab. 8: Chancenverhältnis (OR) an einem Ovarialkarzinom mit seröser und mit nicht-seröser Histologie zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

	Ovarialkarzinom mit seröser Histologie		Ovarialkarzinom mit nicht-seröser Histologie	
	OR [95% KI]	p-Wert	OR [95% KI]	p-Wert
4G/4G vs. 5G/5G	0,950 [0,405-2,229]	0,906	0,150 [0,016-1,406]	0,097
4G/5G v s. 5G/5G	1,071 [0,489-2,346]	0,863	0,584 [0,154-2,218]	0,430
Mind. ein 4G-Allel vs. kein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G vs. 5G/5G)	1,024 [0,487-2,152]	0,951	0,413 [0,114-1,504]	0,180
Mind. ein 5G-Allel vs. kein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G vs. 4G/4G)	1,107 [0,588-2,084]	0,753	4,673 [0,582-37,511]	0,147

4.4 Das FIGO-Stadium und der 4G/5G-Polymorphismus

Bei neun Patientinnen wurde ein frühes (IA-IIA) und bei 66 Patientinnen ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium (IIB-IV) diagnostiziert (s. Tab. 9). In der kleinen Gruppe mit frühem FIGO-Stadium hatten tendenziell mehr Patientinnen das 5G-Allel, also einen 4G/5G- (66,7%) oder 5G/5G-Genotyp (22,2%) als Patientinnen mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium und Kontrollen. Das 4G-Allel kam hingegen in beiden Subgruppen ungefähr gleich häufig vor. Die statistische Untersuchung ergab keine signifikante Assoziation der Genotypen, des 4G- oder des 5G-Allels mit dem FIGO-Stadium.

Tab. 9: Der 4G/5G-Polymorphismus bei Patientinnen mit frühem und fortgeschrittenem FIGO-Stadium und bei den Kontrollen

		Pat. mit frühem FIGO-Stadium (IA-IIA) N = 9	Pat. mit fortgeschr. FIGO-Stadium (IIB-IV) N = 66	p-Wert	Kontrollen N = 157
Genotyp	4G/4G	1 (11,1%)	19 (28,8%)	0,519	50 (31,8%)
	4G/5G	6 (66,7%)	33 (50,0%)		77 (49,1%)
	5G/5G	2 (22,2%)	14 (21,2%)		30 (19,1%)
Allel-positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	7 (77,8%)	52 (78,8%)	0,946	127 (80,9%)
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	8 (88,9%)	47 (71,2%)	0,267	107 (68,2%)

4.4.1 Das FIGO-Stadium beim serösen Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus

Da die histologischen Typen des Ovarialkarzinoms möglicherweise verschiedenen Ursprungs sind [8], erscheint es sinnvoll, die verschiedenen Histologien und ihren Zusammenhang mit dem 4G/5G-Polymorphismus getrennt zu betrachten. Leider war nur die Gruppe der 64 Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom groß genug, um sie gesondert zu untersuchen. In dieser Subgruppe hatten lediglich vier Patientinnen ein frühes FIGO-Stadium (IA-IIA) und 60 Patientinnen ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium (IIB-IV). Bei Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom lag das 4G-Allel (also der 4G/4G- und 4G/5G-Genotyp) tendenziell häufiger im fortgeschrittenen (83,3%) als im frühen FIGO-Stadium (50,0%, $p = 0,101$) vor. Die geringe Größe dieser Gruppe (vier Personen) muss bei der Interpretation berücksichtigt werden.

Tab. 10: Der 4G/5G-Polymorphismus bei Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom im frühen und fortgeschrittenen FIGO-Stadium und bei den Kontrollen

		Pat. mit serösem Ovarialkarzinom mit frühem FIGO-Stadium (I-IIA) N = 4	Pat. mit serösem Ovarialkarzinom mit fortgeschr. FIGO-Stadium (IIB-IV) N = 60	p-Wert	Kontrollen N = 157
Genotyp	4G/4G	1 (25,0%)	18 (30,0%)	0,251	50 (31,8%)
	4G/5G	1 (25,0%)	32 (53,3%)		77 (49,1%)
	5G/5G	2 (50,0%)	10 (16,7%)		30 (19,1%)
Allel-positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	2 (50,0%)	50 (83,3%)	0,101	127 (80,9%)
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	3 (75,0%)	42 (70,0%)	0,835	107 (68,2%)

4.5 Aszites und der 4G/5G-Polymorphismus

Bei 50 Patientinnen konnte mindestens 500 ml Aszites nachgewiesen werden und bei 23 kein Aszites oder weniger als 500 ml. Patientinnen ohne Aszites hatten tendenziell, jedoch statistisch nicht signifikant, häufiger das 5G-Allel (82,6%), also den 4G/5G- oder 5G/5G-Genotyp, als Patientinnen mit Aszites (68,0%, $p = 0,194$) oder Frauen der Kontrollgruppe.

Tab. 11: Der 4G/5G-Polymorphismus bei Patientinnen ohne und mit Aszites und bei den Kontrollen

		Pat. ohne Aszites N = 23	Pat. mit Aszites N = 50	p-Wert	Kontrollen N = 157
Genotyp	4G/4G	4 (17,3%)	16 (32,0%)	0,423	50 (31,8%)
	4G/5G	13 (56,5%)	24 (48,0%)		77 (49,1%)
	5G/5G	6 (26,1%)	10 (20,0%)		30 (19,1%)
Allel-positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	17 (73,9%)	40 (80,0%)	0,559	127 (80,9%)
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	19 (82,6%)	34 (68,0%)	0,194	107 (68,2%)

4.5.1 Die Chance an einem Ovarialkarzinom mit und ohne Aszites zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

Der allgemeine Entstehungsmechanismus von malignem Aszites ist bekannt. Um besser zu verstehen, warum jedoch ein Ovarialkarzinom Aszites verursacht und ein anderes nicht, wurde hier untersucht, ob ein Zusammenhang besteht zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Chance, an einem Ovarialkarzinom mit bzw. ohne Aszites zu erkranken. Die Chance, an einem Ovarialkarzinom ohne Aszites zu erkranken, war für Frauen mit 5G-Allel tendenziell, wenn auch statistisch nicht signifikant, ca. 2,2-fach höher als für Frauen ohne 5G-Allel (95% KI [0,718-6,866]). Zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Chance, an einem Ovarialkarzinom mit Aszites zu erkranken, zeigte sich kein Zusammenhang (s. Tab. 12).

Tab. 12: Chancenverhältnis (OR) an einem Ovarialkarzinom ohne und mit Aszites zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus.

	Ovarialkarzinom ohne Aszites		Ovarialkarzinom mit Aszites	
	OR [95% KI]	p-Wert	OR [95% KI]	p-Wert
4G/4G vs. 5G/5G	0,400 [0,104-1,533]	0,181	0,960 [0,386-2,386]	0,930
4G/5G vs. 5G/5G	0,844 [0,294-2,425]	0,753	0,953 [0,400-2,187]	0,877
Mind. ein 4G-Allel vs. kein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G vs. 5G/5G)	0,669 [0,243-1,842]	0,437	0,945 [0,425-2,101]	0,889
Mind. ein 5G-Allel vs. kein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G vs. 4G/4G)	2,220 [0,718-6,866]	0,166	0,993 [0,502-1,965]	0,984

4.5.2 Aszites beim serösem Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus

Bei 62 der 64 Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom war der Aszites-Status bekannt. Auch wenn Patientinnen ohne Aszites tendenziell häufiger das 5G-Allel (78,9%), also den 5G/5G- oder 4G/5G-Genotyp, hatten als Patientinnen mit Aszites (65,1%) und Kontrollen (68,2%), konnte diese Tendenz statistisch nicht gesichert werden (s. Tab. 13).

Tab. 13: Der 4G/5G-Polymorphismus bei Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom ohne und mit Aszites und bei den Kontrollen

	Pat. mit serösem Ovarialkarzinom ohne Aszites	Pat. mit serösem Ovarialkarzinom mit Aszites	p-Wert	Kontrollen N = 157
	N = 19	N = 43		
Genotyp	4G/4G	4 (21,1%)	15 (34,9%)	50 (31,8%)
	4G/5G	10 (52,6%)	21 (48,8%)	77 (49,1%)
	5G/5G	5 (26,3%)	7 (16,3%)	30 (19,1%)
Allel-positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	14 (73,7%)	36 (83,7%)	127 (80,9%)
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	15 (78,9%)	28 (65,1%)	107 (68,2%)

4.5.3 Die Chance an einem serösen Ovarialkarzinom mit und ohne Aszites zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

Tendenziell, wenn auch statistisch nicht signifikant, hatten Frauen mit dem 4G/4G-Genotyp eine etwa halb so große Chance, an einem serösen Ovarialkarzinom ohne Aszites zu erkranken, wie Frauen mit dem 5G/5G-Genotyp (s. Tab. 14) (OR=0,480; 95% KI [0,119-1,928]) und tendenziell eine ca. 1,3-fach höhere Chance, an einem serösen Ovarialkarzinom mit Aszites zu erkranken (95% KI [0,471-3,512]).

Tab. 14: Chancenverhältnis (OR) an einem Ovarialkarzinom mit seröser Histologie ohne und mit Aszites zu erkranken in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

	Ovarialkarzinom mit seröser Histologie ohne Aszites		Ovarialkarzinom mit seröser Histologie mit Aszites	
	OR [95% KI]	p-Wert	OR [95% KI]	p-Wert
4G/4G vs. 5G/5G	0,480 [0,119-1,928]	0,301	1,286 [0,471-3,512]	0,624
4G/5G vs. 5G/5G	0,779 [0,246-2,469]	0,672	1,169 [0,450-3,034]	0,749
Mind. ein 4G-Allel vs. kein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G vs. 5G/5G)	0,661 [0,221-1,979]	0,460	1,215 [0,493-2,994]	0,672
Mind. ein 5G-Allel vs. kein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G vs. 4G/4G)	1,752 [0,553-5,550]	0,340	0,872 [0,428-1,777]	0,707

4.6 Das Grading und der 4G/5G-Polymorphismus

Bei 64 Patientinnen lagen Daten zum histologischen Grading vor (s.Tab. 15). Aufgrund der geringen Anzahl der G1- und G2-Tumoren wurden diese zusammengefasst, wie es schon in anderen Studien beschrieben wurde [149]. Die Patientinnen mit einem G1- oder G2-Tumor hatten tendenziell häufiger den 4G/5G-Genotyp (56,0%) als Patientinnen mit einem G3-Tumor (48,7%, p = 0,850) oder die Kontrollen (49,1%). Die statistische Untersuchung zeigte jedoch sowohl für die Genotypen als auch für das 4G- und 5G-Allel keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Grading des Ovarialkarzinoms.

Tab. 15: Verteilung der Genotypen und Allele des 4G/5G-Polymorphismus bei Patientinnen mit G1- oder G2-Tumor und mit G3-Tumor und bei den Kontrollen

		Pat. mit G1- oder G2-Tumor N = 25	Pat. mit G3-Tumor N = 39	p-Wert	Kontrollen N = 157
Genotyp	4G/4G	6 (24,0%)	11 (28,2%)	0,850	50 (31,8%)
	4G/5G	14 (56,0%)	19 (48,7%)		77 (49,1%)
	5G/5G	5 (20,0%)	9 (23,1%)		30 (19,1%)
Allel-positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	20 (80,0%)	30 (76,9%)	0,776	127 (80,9%)
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	19 (76,0%)	28 (71,8%)	0,715	107 (68,2%)

4.6.1 Das Grading beim serösen Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus

Bei 56 der 64 Patientinnen mit seröser Histologie war das Grading bekannt. Hier hatten Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom mit einem G1- oder G2-Tumor tendenziell häufiger das 5G-Allel (72,7%) als Patientinnen mit einem serösen G3-Tumor (67,6%). Diese Tendenz ließ sich jedoch nicht statistisch absichern ($p = 0,693$) (s. Tab. 16).

Tab. 16: Verteilung der Genotypen und Allele des 4G/5G-Polymorphismus bei Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom und mit G1- oder G2-Tumor und mit G3-Tumor und bei den Kontrollen

		Pat. mit serösem Ovarialkarzinom mit G1- oder G2-Tumor N = 22	Pat. mit serösem Ovarialkarzinom mit G3-Tumor N = 34	p-Wert	Kontrollen N = 157
Genotyp	4G/4G	6 (27,3%)	11 (32,6%)	0,924	50 (31,8%)
	4G/5G	11 (50,0%)	16 (47,1%)		77 (49,1%)
	5G/5G	5 (22,7%)	7 (20,6%)		30 (19,1%)
Allel-positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	17 (77,3%)	27 (79,4%)	0,852	127 (80,9%)
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	16 (72,7%)	23 (67,6%)	0,693	107 (68,2%)

4.7 Das Alter bei Diagnosestellung und der 4G/5G-Polymorphismus

Das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung in den verschiedenen Genotypgruppen wurde verglichen. Es wurden alle Patientinnen (N=104) in dieser Analyse berücksichtigt. Der Median und das arithmetische Mittel des Alters der Patientinnen nahmen, bei großer Streuung der Werte, tendenziell leicht vom 5G/5G- über den 4G/5G- zum 4G/4G-Genotyp zu. Auch der mittlere Rang im Kruskal-Wallis-Test zeigte diese Tendenz ($p = 0,638$). Beim Kruskal-Wallis-Test wurden Rangplätze für das Alter der Patientinnen vergeben und Rangplatzsummen gebildet, gruppiert nach Genotypen oder Vorhandensein des 4G- bzw. des 5G-Allels. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 17 und Abb. 8).

Tab. 17: Alters-Mittelwerte und Alters-Mediane der Patientinnen und mittlere Ränge des Kruskal-Wallis-Tests

		Alter (arith. Mittel)	Alter (Median)	Mittlerer Rang im Kruskal-Wallis-Test N = 104	p-Wert
Genotyp	4G/4G	62,0 Jahre	64,5 Jahre	56,6	0,638
	4G/5G	60,8 Jahre	61,5 Jahre	51,8	
	5G/5G	59,3 Jahre	59,5 Jahre	48,3	
Allel-positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	61,2 Jahre	62,5 Jahre	53,4	0,516
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	60,4 Jahre	61,0 Jahre	51,0	0,399

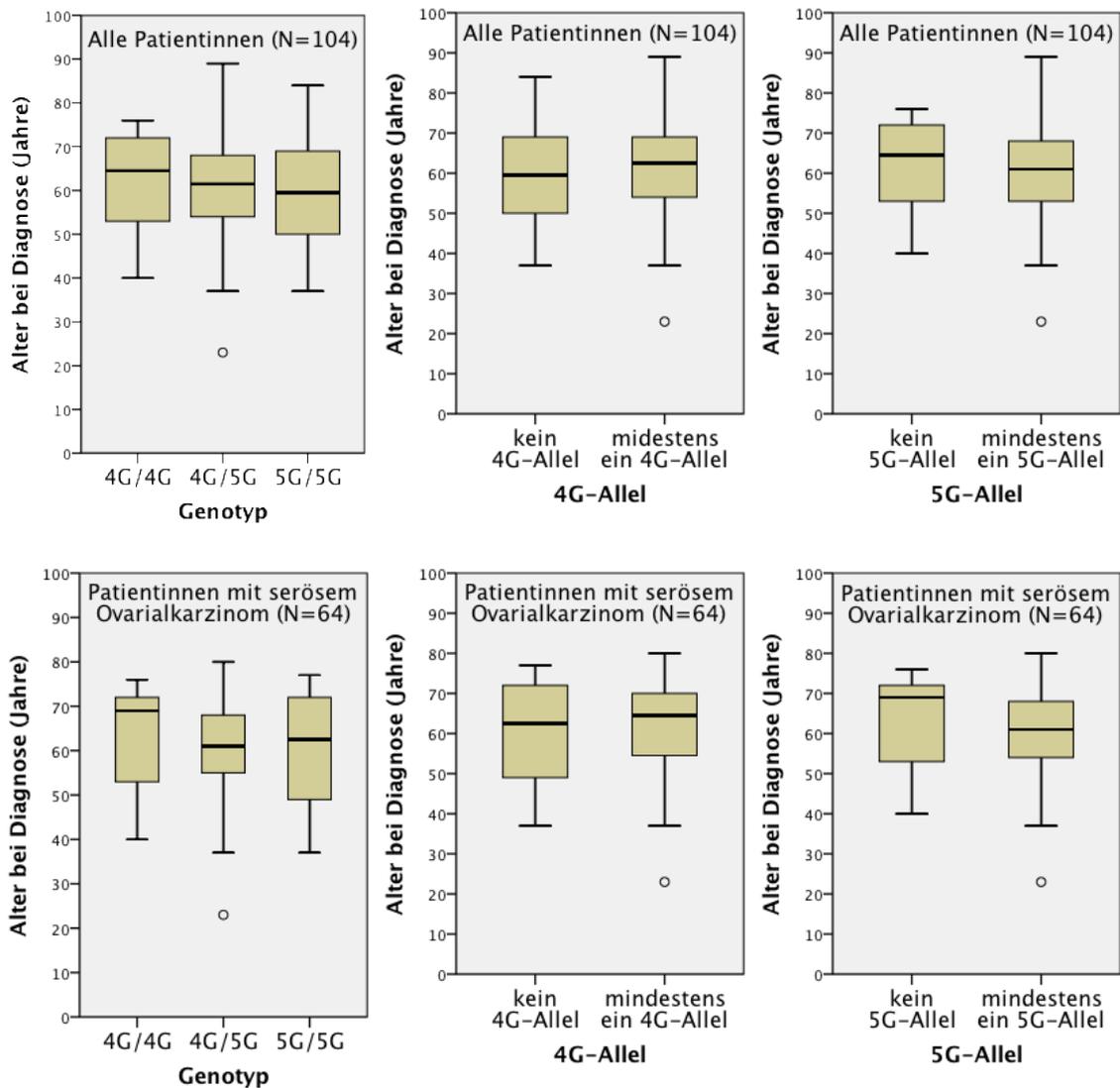


Abb. 8: Boxplots für das Alter in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus für das gesamte Patientenkollektiv und für Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom

4.7.1 Das Alter bei Diagnosestellung der Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom und der 4G/5G-Polymorphismus

Wie im Gesamtkollektiv waren Patientinnen mit einem 5G/5G-Genotyp oder 4G/5G-Genotyp auch in der Subgruppe mit serösem Ovarialkarzinom tendenziell jünger als Patientinnen mit einem 4G/4G-Genotyp. Auch der mittlere Rang im Kruskal-Wallis-Test zeigte eine ähnliche Tendenz. Es scheint, dass tendenziell Frauen mit einem 5G-Allel früher an einem serösen Ovarialkarzinom erkranken als Frauen mit einem 4G-Allel. Allerdings konnte statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Erkrankungs- bzw. Diagnosealter gesichert werden, weder für die Genotypen noch für das 4G- oder das 5G-Allel (s. Tab. 18).

Tab. 18: Alters-Mittelwerte und Alters-Mediane der Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom und mittlere Ränge des Kruskal-Wallis-Tests

		Alter (arith. Mittel) der Pat. mit serösem Ovarial- karzinom	Alter (Median) der Pat. mit serösem Ovarial- karzinom	Mittlerer Rang im Kruskal- Wallis-Test der Pat. mit serösem Ovarialkarzinom N = 64	p-Wert
Genotyp	4G/4G	62,8 Jahre	69,0 Jahre	36,5	
	4G/5G	60,3 Jahre	61,0 Jahre	30,7	
	5G/5G	59,5 Jahre	62,5 Jahre	31,2	0,529
Allel- positivität	Mind. ein 4G-Allel (4G/4G + 4G/5G)	61,2 Jahre	64,5 Jahre	32,8	0,790
	Mind. ein 5G-Allel (5G/5G + 4G/5G)	60,1 Jahre	61,0 Jahre	30,8	0,261

4.8 Der 4G/5G-Polymorphismus und die Prognose des Ovarialkarzinoms

Bei der Untersuchung, ob eine Assoziation zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Krankheitsverlauf der Patientinnen in Bezug auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben besteht, wurde als Rezidiv zusätzlich zum Rezidiv selbst auch ein Progress und der Tod durch das Ovarialkarzinom gewertet. Nur die 56 Patientinnen, die eine platinhaltige Chemotherapie erhielten und über die valide Follow-up-Daten vorlagen, wurden eingeschlossen.

4.8.1 Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus im Patientenkollektiv

Von den 56 eingeschlossenen Patientinnen hatten 39 ein Rezidiv und 36 verstarben. Die 3-Jahres-Überlebensrate (3-JÜR) für das rezidivfreie Überleben betrug 50% für den 4G/4G-Genotyp, 32% für den 4G/5G-Genotyp und 35% für den 5G/5G-Genotyp. Die 5-JÜR für das rezidivfreie Überleben war 42% für den 4G/4G-Genotyp und 36% für den 5G/5G-Genotyp. Die letzte Patientin mit dem 4G/5G-Genotyp wurde zwei Monate vor Abschluss der fünf Jahre zensuriert. (Die Rate für das rezidivfreie Überleben nach 58 Monaten für den 4G/5G-Genotyp betrug 20%.) Für das Gesamtüberleben betrug die 3-JÜR 57% für den 4G/4G-Genotyp, 83% für den 4G/5G-Genotyp und 73% für den 5G/5G-Genotyp. Die 5-JÜR für das Gesamtüberleben lag bei 43% für den 4G/4G-Genotyp, 48% für den 4G/5G-Genotyp und 34% für den 5G/5G-Genotyp.

Der Verlauf der Überlebenskurven lässt vermuten, dass Patientinnen mit dem 4G/5G-Genotyp tendenziell das kürzeste rezidivfreie Überleben haben (s. Abb. 9). Die Kurven des rezidivfreien Überlebens unterscheiden sich erst zu einem späten Zeitpunkt nach Primärdiagnose, sodass sich der Genotyp nur auf Patientinnen auswirken könnte, die über einen langen Zeitraum kein Rezidiv bekamen. Die Kurven des Gesamtüberlebens verliefen sehr nah beieinander. Im Log-

Rank Test ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem rezidivfreien Überleben / Gesamtüberleben und den Genotypen, dem 4G- oder dem 5G-Allel demonstrieren.

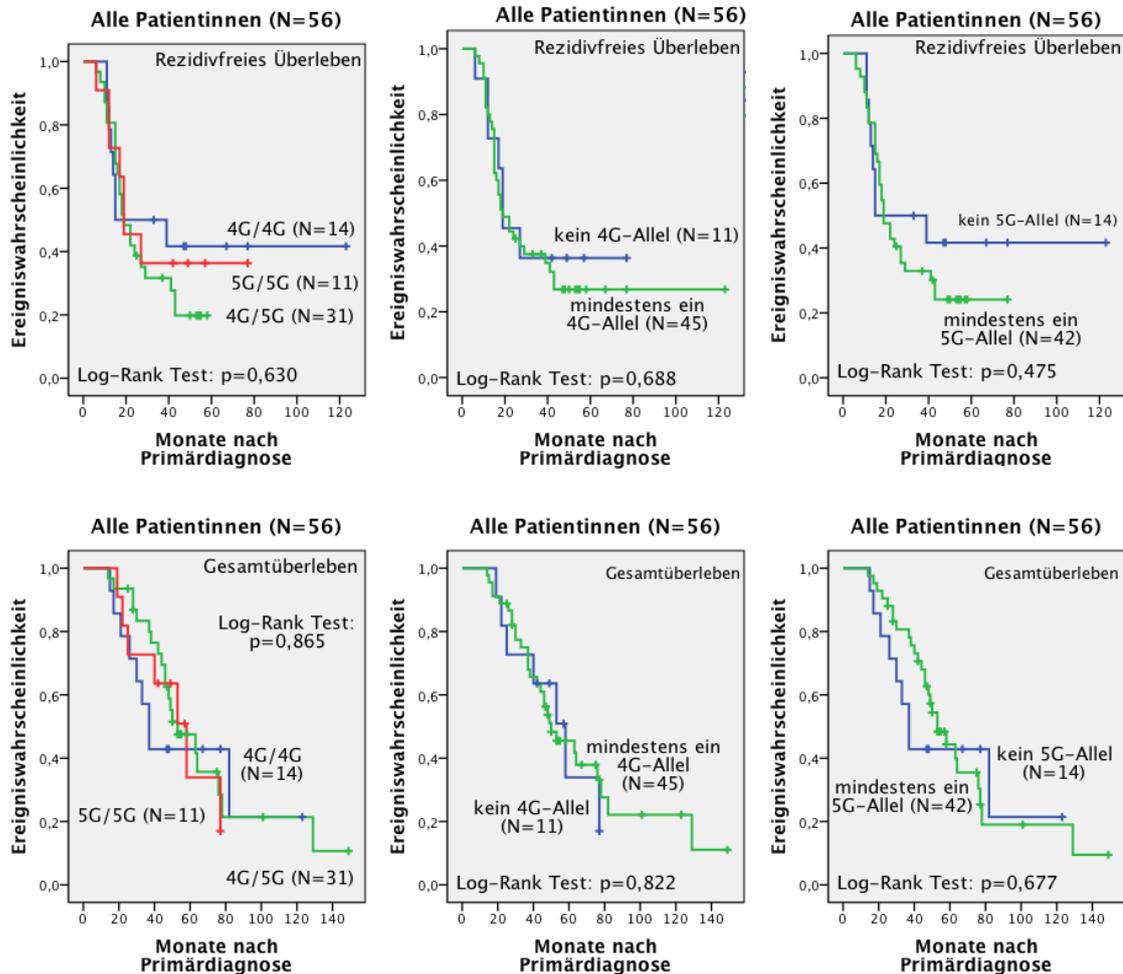


Abb. 9: Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben der Patientinnen, die eine platinhaltige Chemotherapie erhalten haben, in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

4.8.2 Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach der Histologie

51 der 56 Patientinnen hatten ein seröses Ovarialkarzinom. Die Kurvenverläufe ähneln aufgrund der großen Überschneidung sehr stark den oben gezeigten und waren ohne statistisch signifikante Unterschiede. Sie sind daher nicht extra aufgeführt. Nur fünf Patientinnen hatten ein nicht-seröses Ovarialkarzinom, sodass eine Beschreibung und Darstellung der Kurvenverläufe nicht sinnvoll war.

4.8.3 Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach FIGO-Stadium

Die Überlebenskurven der Subgruppe der 51 Patientinnen mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium ähnelten ebenfalls sehr stark den nicht stratifizierten Kurven und unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der Genotypen, des 4G- oder 5G-Allels des 4G/5G-Polymorphismus.

Daher werden sie hier nicht gezeigt. Die Subgruppe der Patientinnen mit frühem FIGO-Stadium war mit nur fünf Patientinnen so klein, dass keine weitere Untersuchung sinnvoll war.

4.8.4 Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach Resttumor

Der postoperative Tumorrest gilt als der stärkste klinische Prognosefaktor [86]. Eine Stratifizierung nach Resttumor erschien sinnvoll, da die Arbeitsgruppe um Kuhn einen negativen Einfluss der PAI-1-Expression im Ovarialkarzinom auf das Gesamtüberleben der Patientinnen mit FIGO-Stadium III ohne Resttumor zeigte [140] und erst später auch mit Resttumor [143]. Von den 25 Patientinnen ohne Resttumor hatten 13 Patientinnen ein Rezidiv und 13 verstarben. Von den 31 Patientinnen mit Resttumor, bzw. ohne erfolgte Operation, hatten 26 Patientinnen ein Rezidiv und 23 starben. In der Gruppe der 25 Patientinnen ohne Resttumor war der 4G/5G-Genotyp tendenziell mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert ($p = 0,095$). Die Kurven der Allele lassen sich hiermit vereinbaren. Für das Gesamtüberleben der Patientinnen ohne Resttumor zeigte sich keine Assoziation mit dem 4G/5G-Polymorphismus (s. Abb. 10).

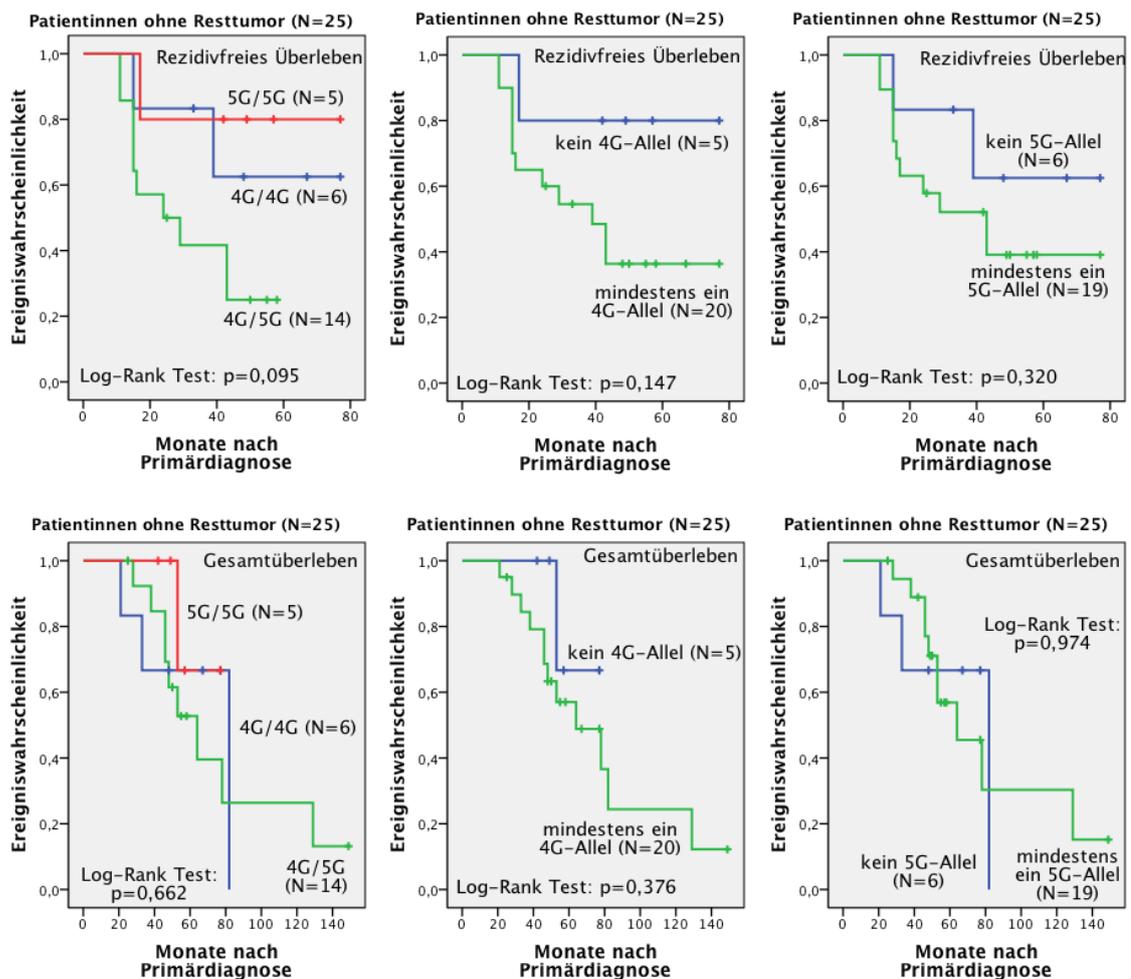


Abb. 10: Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben der Patientinnen ohne Resttumor in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

In der Gruppe der 31 Patientinnen mit Resttumor wirkte sich das 4G-Allel tendenziell positiv auf das rezidivfreie Überleben aus ($p = 0,390$) (s. Abb. 11). Die statistische Prüfung ergab aber keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Genotypen, das 4G- und das 5G-Allel. Die Überlebenskurven, die das Gesamtüberleben der Patientinnen mit Resttumor in Abhängigkeit von den Genotypen, dem 4G- oder 5G-Allel zeigten, verliefen ohne statistisch signifikante Unterschiede sehr nah beieinander.

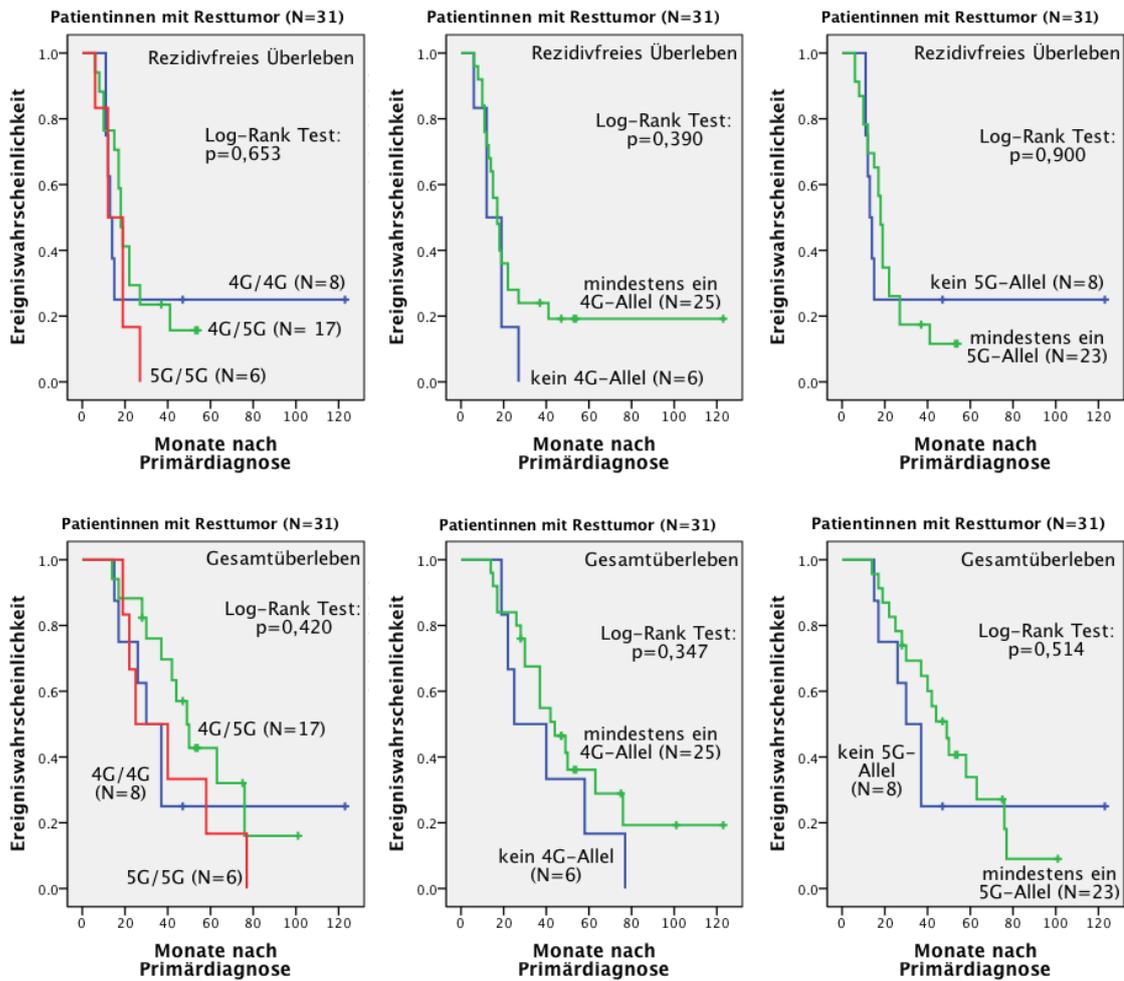


Abb. 11: Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben der Patientinnen mit Resttumor in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

4.8.5 Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach Aszites

Es konnten 54 Patientinnen in die Analyse einbezogen werden. Von den 38 Patientinnen mit Aszites hatten 28 Patientinnen ein Rezidiv und 26 starben. Von den 16 Patientinnen ohne Aszites hatten zehn ein Rezidiv und neun Patientinnen verstarben. Bei den Patientinnen ohne Aszites war der 4G/5G-Genotyp tendenziell mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert ($p = 0,172$). Die Kurvenverläufe der Allele sind mit dieser Annahme vereinbar. Die Kurven des Gesamtüberlebens lassen ebenfalls tendenziell einen negativen Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Genotyp und dem Gesamtüberleben vermuten. Mit $p = 0,361$ konnte statistisch jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Gesamtüberleben gezeigt werden (s. Abb. 12).

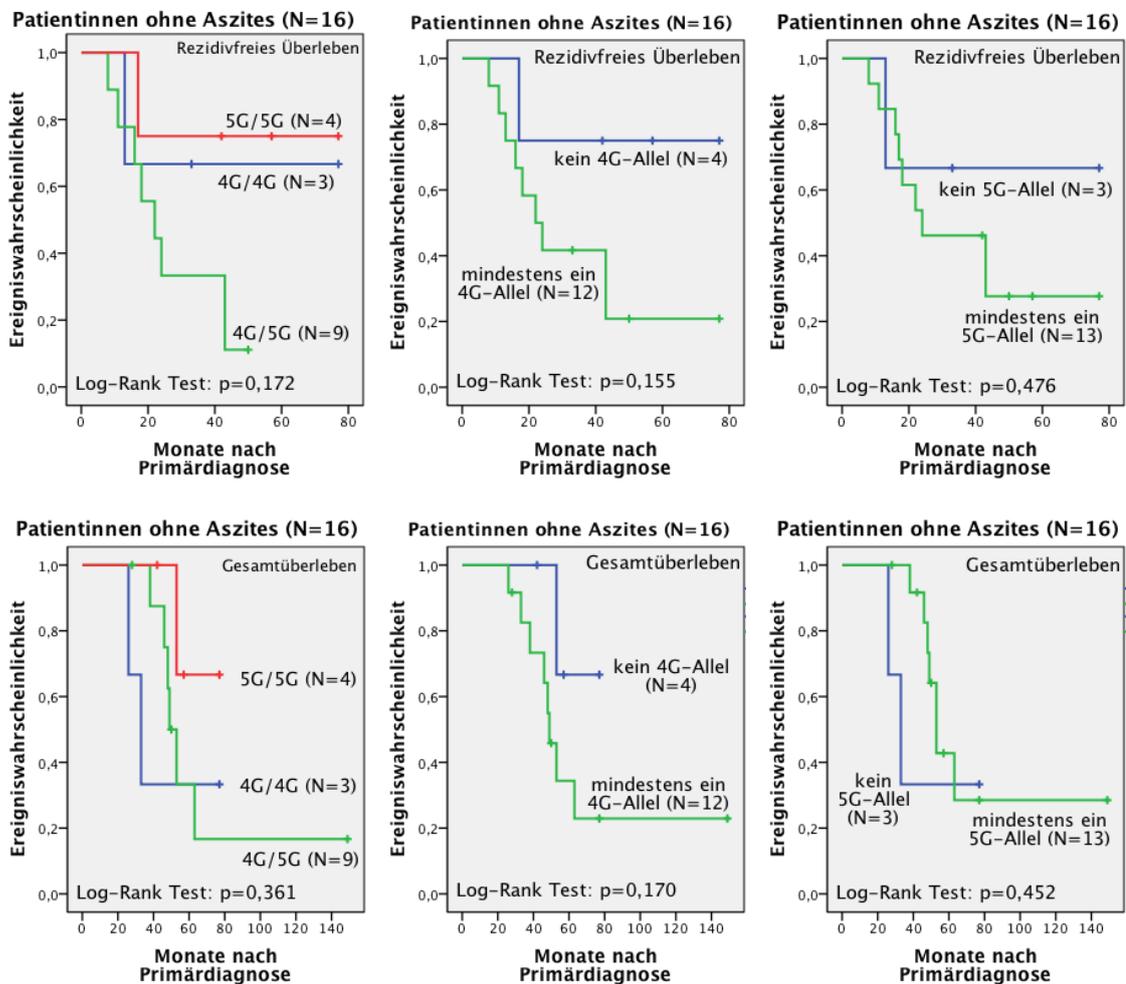


Abb. 12: Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben der Patientinnen ohne Aszites in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

In der Gruppe der Patientinnen mit Aszites könnte man aufgrund des Kurvenverlaufs annehmen, dass sich das 4G-Allel tendenziell positiv auf das rezidivfreie Überleben auswirkt (s. Abb. 13). Eine statistisch signifikante Assoziation konnte aber nicht demonstriert werden ($p = 0,508$). Die Kurven des Gesamtüberlebens verlaufen so nah beieinander, dass vermutlich kein Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Gesamtüberleben besteht. Auch statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kurven der Genotypen oder der Allele gezeigt werden.

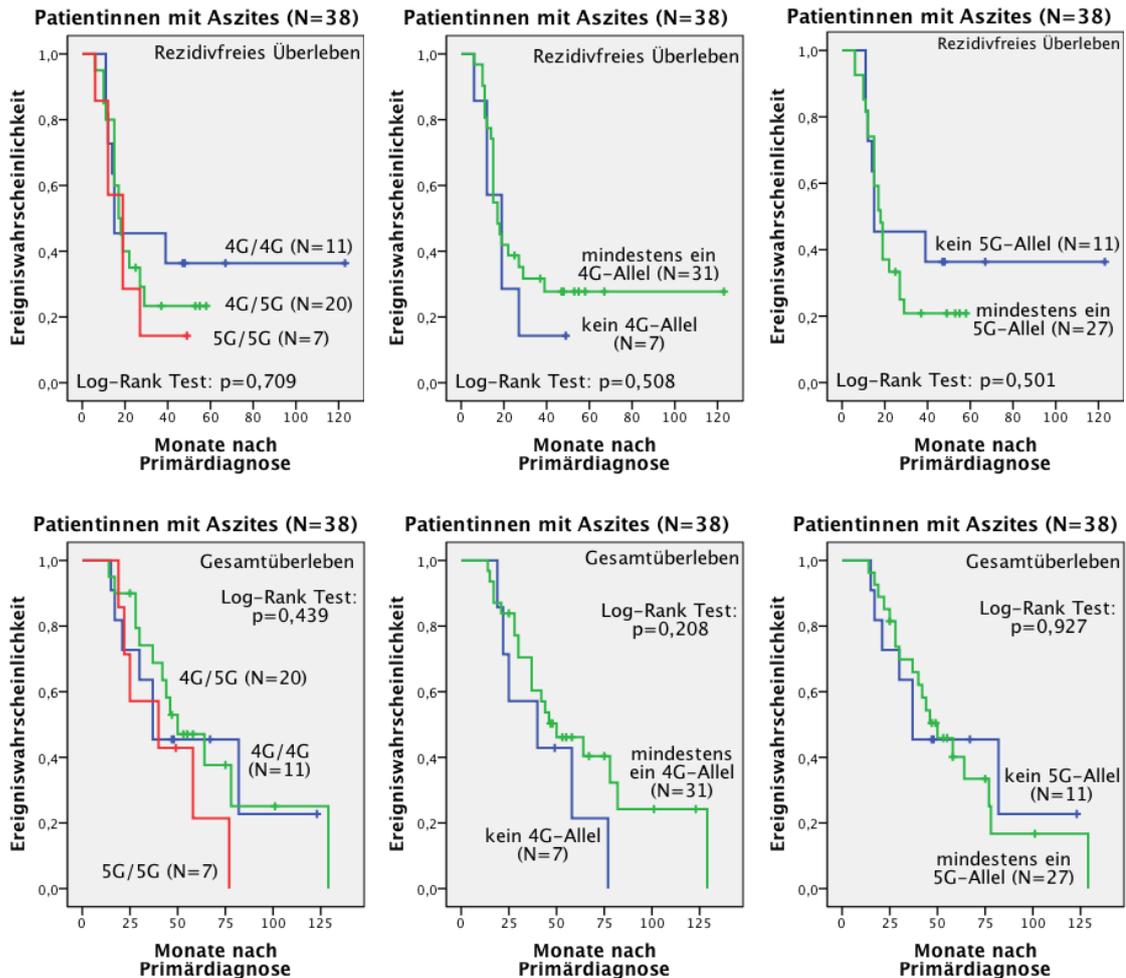


Abb. 13: Rezidivfreies und Gesamtüberleben der Patientinnen mit Aszites in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

4.8.6 Die Prognose und der 4G/5G-Polymorphismus stratifiziert nach Grading

Es konnten 51 Patientinnen in die Analyse einbezogen werden. Von den 20 Patientinnen mit einem G1- oder G2-Tumor hatten 13 ein Rezidiv und zwölf Patientinnen verstarben. Von den 31 Patientinnen mit einem G3-Tumor hatten 21 Patientinnen ein Rezidiv und 20 starben. Bei den Patientinnen mit einem G1- oder G2-Tumor war das 4G-Allel signifikant mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert ($p = 0,042$) und tendenziell auch mit einem kürzeren Gesamtüberleben ($p = 0,128$). Die Kurvenverläufe in Abhängigkeit vom Genotyp und vom 5G-Allel sind damit vereinbar. Zu beachten ist, dass die Patientengruppe, die kein 4G-Allel hatte, mit nur drei Patientinnen sehr klein war (s. Abb. 14).

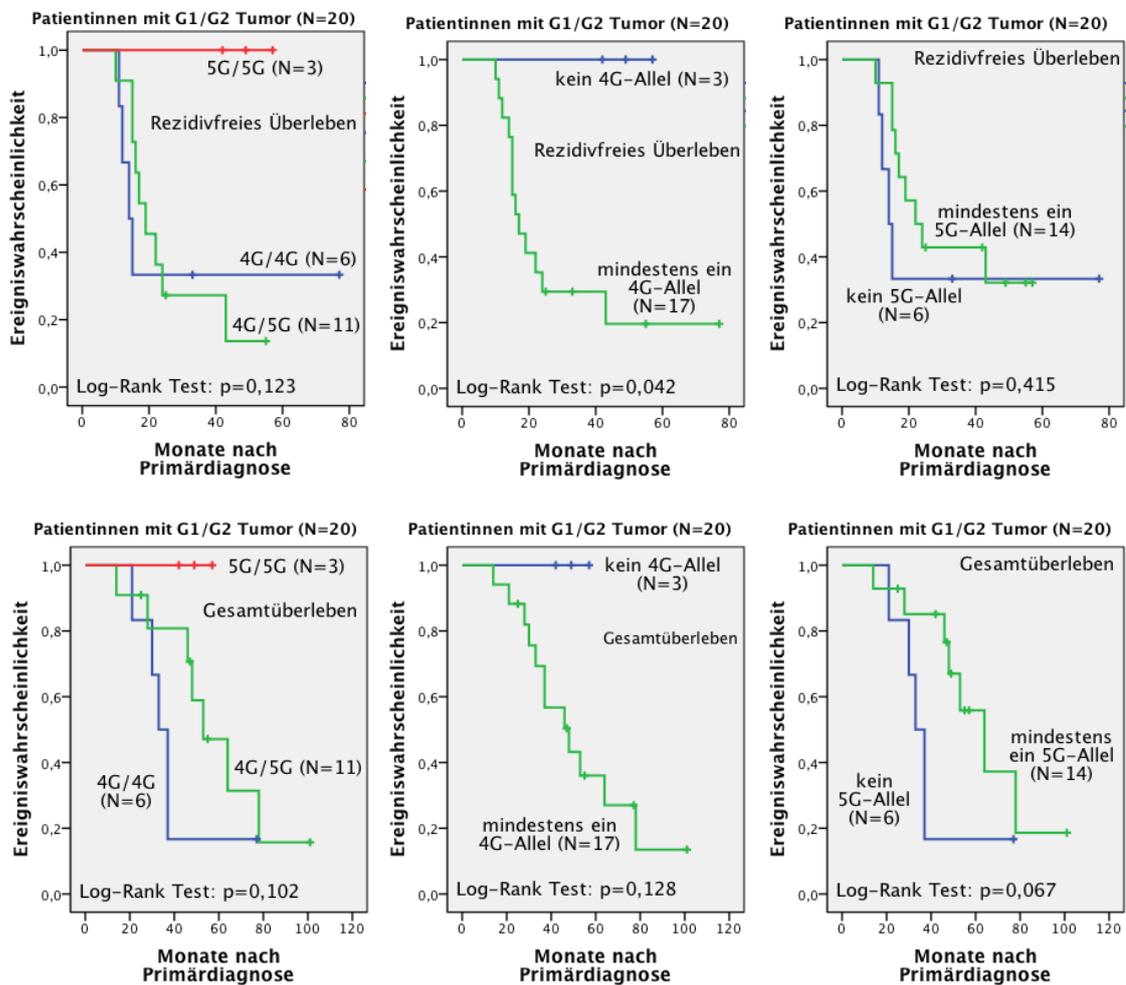


Abb. 14: Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben der Patientinnen mit G1- oder G2-Tumor in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

Bei den Patientinnen mit einem G3-Tumor war im Gegensatz zu den Patientinnen mit G1- oder G3-Tumor das 4G-Allel tendenziell mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert ($p = 0,158$). Die Kurvenverläufe in Abhängigkeit vom Genotyp und vom 5G-Allel sind damit vereinbar. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Gesamtüberleben wurde in dieser Subgruppe nicht deutlich (s. Abb. 15).

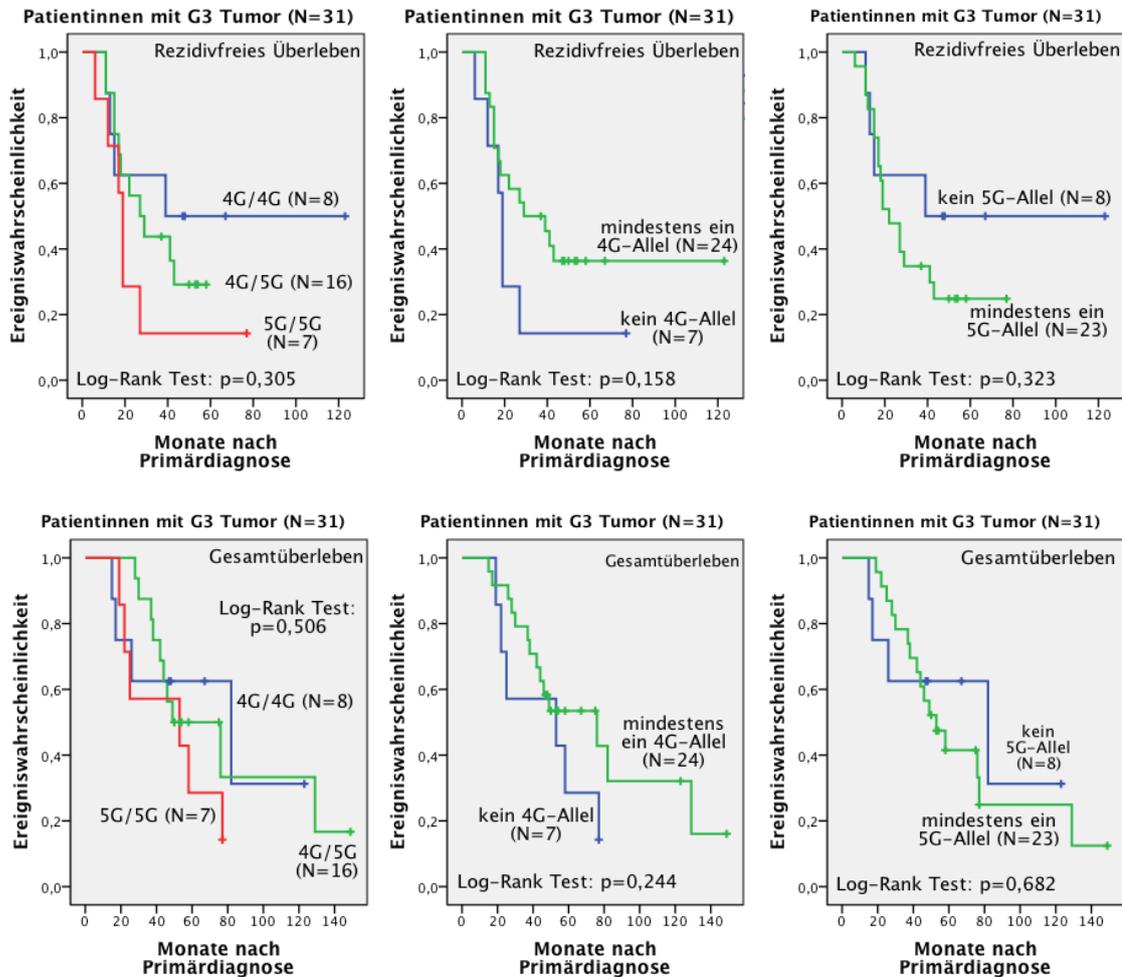


Abb. 15: Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben der Patientinnen mit G3-Tumor in Abhängigkeit vom 4G/5G-Polymorphismus

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus und der Chance, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, untersucht. Außerdem wurde das Auftreten der verschiedenen 4G/5G-Genotypen bzw. Allele in Relation gesetzt zu bestimmten klinisch-pathologischen Faktoren und der Prognose. Die DNA-Isolierung für die 4G/5G-Genotypisierung erfolgte aus Leukozyten, nicht aus Tumorgewebe, da die Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus als Keimbahnmutation untersucht werden sollte und nicht als eine somatische Mutation in Folge der Tumorentwicklung. Wie häufig somatische Mutationen an dieser Stelle des PAI-1-Promotors auftreten, ist wenig untersucht. Türkmen et al. zeigten anhand von fünf Patientinnen, dass die 4G/5G-Genotypen in Leukozyten und im ovarialen Tumorgewebe gleich sind [235]. Auch beim Kolonkarzinom entsprechen sich die 4G/5G-Genotypen im gesunden und im Tumor-Gewebe [240], während sie sich beim Magenkarzinom in 10% [241] und beim Mammakarzinom in 5% unterscheiden [242]. Da zum 4G/5G-Polymorphismus beim Ovarialkarzinom erst zwei Studien vorliegen [235, 236], wird in der Diskussion häufig Bezug genommen auf den PAI-1-Plasmalevel, die PAI-1-Expression im Ovarialkarzinom oder auf Karzinome anderer Entitäten. Meist wird dabei das Mammakarzinom diskutiert, das häufigste und diesbezüglich am besten untersuchte Malignom der Frau, für das PAI-1 von klinischer Bedeutung ist.

5.1 PAI-1 und die Inzidenz von Karzinomen insbesondere vom Ovarialkarzinom

Die Allelfrequenzen bei den Patientinnen (4G: 0,55; 5G: 0,45) und den Probandinnen in der Kontrollgruppe (4G: 0,56; 5G: 0,44) in den hier untersuchten Kollektiven entsprachen in etwa denen in anderen Studien mit gesunden Menschen von 4G: 0,56 und 5G: 0,44 [198] oder 4G: 0,54 und 5G: 0,46 [200]. Die Erkrankungschance für Frauen mit dem 4G/4G- und 5G/5G-Genotyp unterschied sich kaum. Frauen mit dem 4G/5G-Genotyp hatten in unserer Untersuchung tendenziell eine geringfügig (ca. 1,3-fach) höhere Chance, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, als Frauen mit dem 5G/5G-Genotyp. Dieser leichte Anstieg war statistisch aber nicht signifikant. Interessant ist dennoch, dass die Chance, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, bei Trägerinnen des heterozygoten 4G/5G-Genotyps tendenziell höher zu sein scheint als bei Trägerinnen einer der homozygoten Varianten. Auf diese Beobachtung wird unter 5.7.1 näher eingegangen. Zwei andere Studien konnten ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Inzidenz des Ovarialkarzinoms zeigen, weder in einer kleinen Untersuchung an 22 Patientinnen und 23 Kontrollen durch die Arbeitsgruppe um Türkmen [235], noch in einem großen Kollektiv von 775 Patientinnen und 889 Kontrollen durch die Arbeitsgruppe um Bentov [236]. Beide Studien isolierten den 4G/5G-Polymorphismus ebenfalls aus Blutzellen und nicht aus Tumorgewebe.

Türkmen et al. untersuchten nur diesen Polymorphismus mittels PCR und Sequenzierung. Bentov et al. nutzten die MALDI-TOF-Massenspektrometrie, um mehrere Polymorphismen zu bestimmen.

Während sich beim 4G/5G-Polymorphismus, wie beschrieben, keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientinnen und gesunden Frauen zeigten, ist der Plasma-PAI-1-Level bei Frauen mit Ovarialkarzinom höher als bei gesunden Frauen oder Frauen mit benignen ovariellen Zysten [147, 150, 243]. Kombiniert mit den Leveln von CA 125, HE4, Glycodelin, uPAR und CA 15-3 lässt sich mithilfe des PAI-1-Plasmalevels zwischen gesunden Frauen und Frauen mit Ovarialkarzinom im frühen Stadium mit einer Sensitivität von 80,5% und einer Spezifität von 96,5% unterscheiden. Fortgeschrittene Stadien werden noch besser erkannt. Allein untersucht, erreichte man mit der PAI-1-Messung eine Sensitivität von 65,4% und eine Spezifität von 76,0% [244]. So erscheint beim Ovarialkarzinom der Plasma-PAI-1-Level in Kombination mit anderen oben genannten Parametern aussagekräftiger als der 4G/5G-Polymorphismus.

Auch bei Frauen mit Mammakarzinom ist der PAI-1-Plasmalevel höher als bei gesunden Frauen [242]. Auch hier ließ der 4G/5G-Polymorphismus dagegen in den meisten Untersuchungen keine Aussage bezüglich des Auftretens des Mammakarzinoms zu [242, 245–248]. Zwei Studien deuten jedoch darauf hin, dass Patientinnen mit Mammakarzinom häufiger das 4G-Allel tragen als gesunde Probandinnen [249, 250]. Bei einigen Malignomen, wie bei hochgradigen Gliomen [251], dem Magenkarzinom [252] oder dem Kolonkarzinom, zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Inzidenz [253]. Jedoch zeigte sich interessanter Weise beim Kolonkarzinom tendenziell, dass der heterozygote Genotyp mit der geringsten Chance einherging, am Kolonkarzinom zu erkranken [254, 255]. Bei anderen Tumoren erhöht das Vorliegen des 4G-Allels das Erkrankungsrisiko, so beim Endometriumkarzinom [233, 256], beim hepatozellulären Karzinom [232, 257], beim Mundhöhlenkarzinom [258–260] und tendenziell auch bei der aggressiven Fibromatose bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis [261]. Dementgegen erhöht der 5G/5G-Genotyp das Risiko, an einem familiären Prostatakarzinom zu erkranken [262].

Es scheint, dass eine Assoziation des 4G/5G-Polymorphismus mit dem Auftreten eines Tumors nur für bestimmte Tumoren nachzuweisen ist, wobei keine einheitliche Zuordnung eines bestimmten Genotyps oder Allels mit einer erhöhten Inzidenz möglich ist.

5.2 PAI-1 und die Karzinomhistologie

Der Anteil der serösen Ovarialkarzinome war im hier untersuchten Patientenkollektiv etwas höher als in vergleichbaren publizierten Studien [7]. Keine der Patientinnen dieses Kollektivs hatte einen muzinösen Tumor. Die verschiedenen histologischen Typen des Ovarialkarzinoms werden von einigen Autoren als unterschiedliche Entitäten betrachtet [263] und beeinflussen die

Prognose [81]. Leider war nur die Gruppe der serösen Ovarialkarzinome groß genug, um sie als Subgruppe separat zu betrachten.

Tendenziell hatten Patientinnen mit einem nicht-serösen Ovarialkarzinom häufiger das 5G-Allel als Patientinnen mit einem serösen Ovarialkarzinom. Das 4G-Allel war bei Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom genauso häufig wie bei den Kontrollen und tendenziell etwas häufiger als bei Patientinnen mit nicht-serösem Ovarialkarzinom. Die Chance, an einem nicht-serösen Ovarialkarzinom zu erkranken, war für den 4G/4G-Genotyp im Vergleich zum 5G/5G-Genotyp tendenziell etwa sechsmal geringer, wenn auch nicht statistisch signifikant. Die Chance, an einem serösen Ovarialkarzinom zu erkranken, war unabhängig vom 4G/5G-Polymorphismus. Möglicherweise ist der 4G/5G-Polymorphismus demnach nur beim nicht-serösen Ovarialkarzinom von Bedeutung. Auch Bentov et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem histologischen Typ des Ovarialkarzinoms nachweisen [236]. Ebenso scheint die PAI-1-Expression in Ovarialkarzinomen unabhängig von der Tumorphistologie zu sein [136, 138, 142, 148, 153, 264, 265].

Auch beim Mammakarzinom war die PAI-1-Expression im Tumorgewebe in den meisten Studien unabhängig vom histologischen Typ [266–268]. Eine Studie zeigte hingegen, dass duktile Mammakarzinome mehr PAI-1 exprimieren als lobuläre Karzinome [269]. Für den 4G/5G-Polymorphismus konnte beim Mammakarzinom, wie auch beim Ovarialkarzinom, keine Assoziation mit dem histologischen Typ gezeigt werden [246].

5.3 PAI-1 und die Tumorprogression

Bei Diagnosestellung hatten 12% der Patientinnen unseres Kollektivs ein Ovarialkarzinom im frühen FIGO-Stadium und 88% eines im fortgeschrittenen Stadium. Diese Zahlen weichen etwas von den Angaben in der Literatur ab, wonach aber ebenfalls die Mehrheit (70%) im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird [270]. Die Einteilung in ein frühes und ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium ist in der Literatur uneinheitlich. Während in dieser Arbeit das fortgeschrittene Stadium entsprechend den Vorgaben der AGO mit dem FIGO-Stadium IIB festgelegt wurde, bezeichnen andere Autoren die Erkrankung erst ab dem FIGO-Stadium III als fortgeschritten [138]. U. a. hierauf ist vermutlich der im Vergleich mit der Literatur größere Anteil der Patientinnen in fortgeschrittenem Stadium in unserer Studie zurückzuführen.

Im untersuchten Kollektiv trat das 5G-Allel tendenziell häufiger bei Patientinnen mit frühem als bei Patientinnen mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium auf. Beim serösen Ovarialkarzinom war entsprechend das 4G-Allel tendenziell häufiger bei Patientinnen mit fortgeschrittenem als mit frühem FIGO-Stadium. Aufgrund der geringen Patientenzahl mit serösem Ovarialkarzinom und frühem FIGO-Stadium (N=4) ist diese Tendenz jedoch nur wenig aussagekräftig. Da diese Tendenzen nicht statistisch abgesichert werden konnten, kann man aufgrund der vorliegenden

Arbeit nicht sicher von einer Assoziation des 4G/5G-Polymorphismus mit dem FIGO-Stadium ausgehen. Möglicherweise ist jedoch das 4G-Allel durch vermehrte PAI-1-Expression mit einem aggressiveren Phänotyp und stärkerer Tumorprogression des Ovarialkarzinoms assoziiert als das 5G-Allel. Auch nimmt die PAI-1-Expression von normalem Ovarialgewebe über Adenome, Borderline-Tumoren hin zu Ovarialkarzinomen und deren Metastasen zu [145, 146] und korreliert also mit der Malignität. Dennoch zeigt die überwiegende Zahl der Studien keine Korrelation zwischen dem FIGO-Stadium und der PAI-1-Expression im Tumorgewebe von Ovarialkarzinomen [136, 144, 148, 264, 265]. Einige zeigten eine positive Assoziation von hohem Tumor-PAI-1 bzw. hohem PAI-1-Plasmalevel mit fortgeschrittenem Stadium [137, 142, 147]. Im Widerspruch dazu konnte eine Arbeitsgruppe in frühen FIGO-Stadien häufiger eine PAI-1-Expression beobachteten als in fortgeschrittenen [138]. Die Daten über die Rolle von PAI-1 bei der Tumorprogression des Ovarialkarzinoms sind also nach wie vor uneindeutig. Beim Mammakarzinom ist der PAI-1-Plasmalevel bei fortgeschrittenen Tumorstadien höher als bei niedrigen [242]. Die Daten über den Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expression im Tumorgewebe von Mammakarzinomen und dem Stadium sind widersprüchlich [271, 272]. In mehreren Studien gab es keine Assoziation zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Stadium des Mammakarzinoms [246], beurteilt anhand des Nodalstatus und der Tumorgröße [242, 245]. Andere Autoren zeigten eine positive Assoziation des 4G/4G-Genotyps mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium, gemessen an Lymphknotenmetastasen [247] bzw. Tumorgröße [234]. Hingegen zeigte eine chinesische Studie interessanterweise eine positive Assoziation des 5G/5G-Genotyps mit einem fortgeschrittenem Stadium des Mammakarzinoms [248]. Für das Mundhöhlenkarzinom wurden widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Während eine Studie zeigte, dass Patienten in frühen Stadien häufiger das 5G-Allel haben [260], deuten zwei andere Studien darauf hin, dass ein früheres Stadium häufiger mit dem 4G-Allel assoziiert ist [258, 259]. Beim Kolonkarzinom war der 4G/4G-Genotyp mit fortgeschrittenen Stadien assoziiert [254], allerdings bestätigten andere Autoren dies nicht [253]. Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom hatten in fortgeschrittenen Stadien häufiger das 4G- als das 5G-Allel [233]. Kein Zusammenhang besteht zwischen dem Stadium des Prostata- und Nierenzellkarzinoms und dem 4G/5G-Polymorphismus [262, 273, 274].

5.4 PAI-1 und Aszites

Bei 68% der Patientinnen im untersuchten Kollektiv wurde mindestens 500 ml Aszites nachgewiesen. Bei Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom war die Häufigkeit an Aszites ähnlich. Angaben zur Häufigkeit von Aszites beim Ovarialkarzinom schwanken in der Literatur zwischen 34% und 85%, da teilweise die Grenze für das Vorliegen von Aszites niedriger als 500 ml angesetzt wurde oder nur fortgeschrittene FIGO-Stadien untersucht wurden [275, 276].

Maligner Aszites entsteht durch verringerte Flüssigkeitsresorption aufgrund der Obstruktion der Lymphbahnen durch maligne Zellen [277] und durch Vermehrung der intraabdominellen Flüssigkeit aufgrund einer vergrößerten Filtrationsfläche durch Angiogenese im Ovarialtumor und im Peritoneum und einer erhöhten Kapillarpermeabilität mit konsekutiv vermehrt auftretenden Proteinen in der Bauchhöhle, was zur Flüssigkeitsaufnahme in der Bauchhöhle führt [278]. Die erhöhte Kapillarpermeabilität tritt im Rahmen der Tumorangio-genese auf und wird verursacht durch Wachstumsfaktoren, die u. a. von malignen Zellen produziert werden, wie VEGF oder TGF- β [278]. TGF- β aktiviert auch die Transkription von PAI-1 (s. Abb. 4) [88], das bei physiologischen Leveln für die Tumorangio-genese benötigt wird [110] und so die Aszitesbildung verstärken könnte. Beim Magenkarzinom fördert PAI-1 die Metastasierung und die Aszitesbildung. Beides konnte durch PAI-1-mRNA-Interferenz im Mausmodell reduziert werden [279].

Patientinnen mit dem 5G-Allel hatten tendenziell seltener Aszites und Frauen mit dem 5G-Allel hatten tendenziell eine doppelt so hohe Chance, an einem Ovarialkarzinom ohne Aszites zu erkranken, wie Frauen ohne 5G-Allel. Ähnliches zeigte sich auch bei gesonderter Betrachtung der serösen Ovarialkarzinome. Tendenzuell, wenn auch statistisch nicht signifikant, hatten Frauen mit dem 4G/4G-Genotyp eine etwa halb so große Chance, an einem serösen Ovarialkarzinom ohne Aszites zu erkranken, wie Trägerinnen des 5G/5G-Genotyps und tendenziell eine ca. 1,3-fach höhere Chance, an einem serösen Ovarialkarzinom mit Aszites zu erkranken. Ein denkbarer Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Aszitesbildung beim Ovarialkarzinom wäre, dass der 5G/5G-Genotyp zu einer geringeren PAI-1-Expression im Tumor führt und mit einer geringeren Tumorangio-genese und Aszitesbildung einhergeht und der 4G/4G-Genotyp hingegen über vermehrte PAI-1-Transkription und PAI-1-geförderte Tumorangio-genese zur Aszitesentstehung beiträgt. PAI-1 ist allerdings nur einer von sehr vielen Faktoren, die die Tumorangio-genese mitbestimmen und wird selbst durch viele Faktoren in der Transkription beeinflusst, sodass ein potenzieller Effekt des 4G/5G-Polymorphismus möglicherweise durch andere stärkere Einflüsse, wie z.B. VEGF [280] überdeckt werden könnte. Weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv sind nötig, um zu bestimmen, ob und wenn ja, welchen Einfluss der 4G/5G-Polymorphismus auf die Bildung von Aszites hat. Bisher konnte aber zwischen dem Vorhandensein von Aszites und der PAI-1-Expression im Tumorgewebe oder im Zystenfluid von Ovarialkarzinomen kein Zusammenhang nachgewiesen werden [136, 140, 146, 148, 151]. Allerdings ist der PAI-1-Plasmalevel postmenopausaler Patientinnen mit malignem Ovarialtumor mit Aszites höher als der Level der Patientinnen ohne Aszites [150]. Im Aszites selbst kann PAI-1 nachgewiesen werden. Die PAI-1-Konzentration im Aszites ist bei Vorliegen eines malignen Ovarialtumors höher als beim Vorliegen eines benignen Ovarialtumors [150] oder einer alkoholischen Leberzirrhose [281]. Der Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und Aszites wurde scheinbar bei

anderen Karzinomen, wie z. B. beim Leber-, Magen- oder Darmkarzinom, noch nicht untersucht.

5.5 PAI-1 und das Grading

Einen gut differenzierten Tumor (G1) hatten 11% der Patientinnen des untersuchten Kollektivs, einen G2-Tumor 28% und einen G3-Tumor 61%. Diese Verteilung ähnelt derjenigen in anderen Studien [138, 282]. Die beobachtete Verteilung der verschiedenen 4G/5G-Genotypen im untersuchten Kollektiv lässt vermuten, dass Patientinnen mit einem G1- oder G2-Tumor tendenziell häufiger heterozygot sind als Patientinnen mit einem G3-Tumor. In der Subgruppe der Patientinnen mit seröser Histologie war das 5G-Allel tendenziell häufiger bei Patientinnen mit G1- oder G3-Tumor. Möglicherweise ist also eine geringere bis mittlere PAI-1-Dosis, wie sie vermutlich beim 5G/5G- und 4G/5G-Genotyp auftritt, mit einer geringen bzw. mäßigen Dedifferenzierung des Ovarialkarzinoms assoziiert. Statistisch ließ sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Grading des Ovarialkarzinoms zeigen. Eine positive Korrelation der PAI-1-Expression in Ovarialkarzinomen mit dem Grading wurde mehrfach belegt [137, 139, 146, 149, 264, 265], d.h. dass PAI-1 bei zunehmender Dedifferenzierung vermehrt exprimiert zu werden scheint und vielleicht sogar kausal die Dedifferenzierung zu fördern vermag. Allerdings gibt es auch Studien, die diesen Zusammenhang nicht bestätigen konnten [136, 138, 140, 148].

Beim Mammakarzinom nahm die PAI-1-Expression gemäß einer Studie mit der Dedifferenzierung zu [283]. Auch hier gibt es andere Studien, die dies nicht belegen konnten [272, 284]. Auch ein Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Grading des Mammakarzinoms ist nicht eindeutig belegt. Trägerinnen des 4G-Allels hatten in zwei Studien häufiger einen G3-Tumor als Patientinnen ohne 4G-Allel [239, 249]. Andere Autoren konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Grading und dem 4G/5G-Polymorphismus nachweisen [246]. Patientinnen mit einem G3-Endometriumkarzinom hatten tendenziell häufiger den 4G/4G- als den 5G/5G-Genotyp [233]. Beim Prostatakarzinom zeigte sich diesbezüglich kein Zusammenhang [262, 285]. In einer Studie über das klarzellige Nierenzellkarzinom waren beide homozygote Genotypen (4G/4G und 5G/5G) mit starker Dedifferenzierung assoziiert. Allerdings war das untersuchte Kollektiv klein (N=69) und es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der PAI-1-Expression im Tumorgewebe festgestellt werden [274]. Ob der 4G/5G-Polymorphismus mit der Differenzierung assoziiert ist, muss also sowohl für das Ovarialkarzinom als auch für andere Tumorentitäten umfassender untersucht werden.

5.6 PAI-1 und das Alter bei Diagnosestellung

Das Alter der Patientinnen mit Ovarialkarzinom lag in unserer Studie zwischen 23 und 89 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 61 Jahre, der Altersmedian 62 Jahre. Damit waren die Patientinnen im Durchschnitt jünger als im bundesdeutschen Durchschnitt (69 Jahre) [1]. Auch wenn man aufgrund der Verteilung der Durchschnittswerte annehmen könnte, dass bei Vorliegen des 5G-Allels das Ovarialkarzinom tendenziell in jüngerem Alter auftritt, konnte statistisch kein signifikanter Zusammenhang des 4G/5G-Polymorphismus mit dem Erkrankungsalter der Patientinnen an einem Ovarialkarzinom bzw. einem serösen Ovarialkarzinom belegt werden. Bentov et al. konnten in ihrer großen Studie ebenfalls keine Assoziation zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Alter bei der Diagnosestellung eines Ovarialkarzinoms demonstrieren [236]. Auch die PAI-1-Expression im ovarialen Tumorgewebe zeigte sich in den meisten Studien unabhängig vom Alter [136, 140, 142, 146, 148, 264, 265]. Nur in einer Studie wurde bei jüngeren Patientinnen tendenziell häufiger eine PAI-1-Expression beobachtet als bei älteren [138]. Beim Mammakarzinom wurde ebenfalls in zwei Studien kein Zusammenhang zwischen dem Alter und der PAI-1-Expression im Tumorgewebe beobachtet [272, 286]. Eine Arbeit zeigte jedoch, dass ältere Patientinnen häufiger PAI-1 exprimieren als jüngere [283]. Der mögliche Zusammenhang zwischen dem Alter bei Diagnosestellung und dem 4G/5G-Polymorphismus wurde für das Mammakarzinom noch nicht untersucht. An einem familiären Prostatakarzinom erkrankten interessanterweise Männer mit dem 5G/5G-Genotyp früher als Männer mit dem 4G/4G-Genotyp [262]. Der PAI-1-Plasmalevel nimmt mit dem Alter zu. Dies könnte das gehäufte Auftreten von thrombotischen kardiovaskulären Erkrankungen im Alter mit verursachen [287]. Eine Studie demonstrierte sogar einen Anstieg des PAI-1-Plasmalevels im Alter nur für Menschen, die mindestens ein 4G-Allel tragen [288].

Replikative Seneszenz, ein irreversibler Zellzyklusarrest, führt dazu, dass sich die betroffenen Zellen nicht mehr teilen können und wirkt so als ein Mechanismus der Tumorsuppression. Der Anteil seneszenten Zellen nimmt mit dem Alter zu, was sich darin zeigt, dass ältere Gewebe mehr senescente Zellen haben als junge und dass sich Zellen älterer Menschen weniger häufig teilen können als die jüngerer Menschen. Senescente Zellen können jedoch das Wachstum benachbarter prämaligne Zellen stimulieren und so die Tumorentstehung und -progression fördern [289]. Für Fibroblasten der Mamma wurde gezeigt, dass ihre Zellalterung zu einer gesteigerten PAI-1-Expression proportional zur Verkürzung der Telomere führt, eine mögliche Ursache für das erhöhte Risiko, in höherem Alter an Brustkrebs zu erkranken [290]. PAI-1 kann zudem die replikative Seneszenz induzieren [123]. Möglicherweise ist es auf diese Art kausal mit dem Altern und der erhöhten Krebsinzidenz im Alter verknüpft. Der 4G/5G-Polymorphismus ist überwiegend gleich verteilt in sehr alten und jungen bzw. gemischten

Kollektiven [291, 292]. In einer Studie hatten sehr alte Menschen erstaunlicherweise häufiger das 4G-Allel. Möglicherweise wird dessen nachteiliger Effekt durch einen unbekanntem Faktor mit positiven Langzeitfolgen kompensiert [293].

5.7 PAI-1 und die Krankheitsprognose

Die Ergebnisse zur Assoziation des 4G/5G-Polymorphismus mit der Prognose des Ovarialkarzinoms in Form des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens waren heterogen. In der Gesamtgruppe und in einigen Subgruppen war die Prognose tendenziell am schlechtesten für Patientinnen mit dem heterozygoten Genotyp. In anderen Subgruppen war die Prognose tendenziell schlechter, wenn kein 4G-Allel vorhanden war. In wieder anderen war die Prognose signifikant schlechter, wenn das 4G-Allel vorhanden war.

5.7.1 Erklärungsmodelle der verschiedenen Einflüsse des 4G/5G-Polymorphismus in den verschiedenen Subgruppen

Die tendenziell negative Bedeutung des heterozygoten Genotyps

Für die gesamte Gruppe der Patientinnen mit validen Follow-up-Daten im untersuchten Kollektiv bestand kein Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem rezidivfreien Überleben oder dem Gesamtüberleben. Allerdings lässt der Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven vermuten, dass Patientinnen mit dem 4G/5G-Genotyp tendenziell ein kürzeres rezidivfreies Überleben haben als Patientinnen mit dem 4G/4G- oder dem 5G/5G-Genotyp, wie auch tendenziell Patientinnen der Subgruppen mit serösem Ovarialkarzinom oder mit fortgeschrittenem FIGO-Stadium. Auch Patientinnen mit dem 4G/5G-Genotyp der Subgruppen ohne Resttumor oder ohne Aszites hatten tendenziell ein kürzeres rezidivfreies Überleben. Letztere hatten tendenziell ebenfalls ein kürzeres Gesamtüberleben. Eine Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus für das Gesamtüberleben der anderen genannten Subgruppen stellte sich nicht dar. Statistisch konnten die genannten Tendenzen nicht gesichert werden.

Der heterozygote Genotyp ist mit mittleren physiologischen PAI-1-Plasmaleveln assoziiert [200, 201]. Die Wirkung von PAI-1 auf die Angiogenese ist dosisabhängig. Interessanterweise ist die stärkste proangiogenetische Wirkung bei einer mittleren PAI-1-Dosis zu beobachten. Im physiologischen Dosisbereich steigt der proangiogenetische Effekt proportional zur PAI-1-Menge, d.h. im physiologischen Rahmen fördert PAI-1 die Angiogenese und könnte dadurch potenziell einen aggressiveren Tumorphänotyp erzeugen und zu einer schlechteren Prognose beitragen. Bei höheren (pharmakologischen) Dosen, die weit über den physiologischen liegen, wirkt PAI-1 hingegen antiangiogenetisch [122, 294, 295]. D.h., wenn die Angiogenese im Verhältnis zur PAI-1-Dosis dargestellt wird, steigt der Graph im physiologischen Bereich an und fällt darüber wieder ab wie bei einer Gaußschen Glockenkurve (bell shape curve). Demnach

fördert eine mittlere PAI-1-Dosis zwischen geringster physiologischer Dosis und höchster pharmakologischer Dosis die Angiogenese am stärksten. Diese mittlere Dosis entspricht jedoch einer hohen Dosis im physiologischen Bereich. Der 4G/5G-Polymorphismus moduliert den PAI-1-Level aber eben im physiologischen Bereich. Daher würde man bei zunehmender Anzahl der 4G-Allele einen zunehmenden PAI-1-Level [188] und einen zunehmend aggressiven Phänotyp mit schlechterer Prognose erwarten, mit der schlechtesten Prognose für den 4G/4G-Genotyp und nicht für den heterozygoten 4G/5G-Genotyp. Dennoch könnte man vermuten, dass speziell beim Ovarialkarzinom eine mittlere PAI-1-Menge, möglicherweise aufgrund der komplexen Interaktionen mit Vitronektin und uPA, am meisten die Karzinogenese und Progression fördert. Dies wurde bisher jedoch noch nicht belegt. Ursprünglich wurde vermutet, dass geringe PAI-1-Dosen die Tumورprogression fördern würden, wie es auch einige Studien zeigten, z. B. für Prostatakarzinomzellen [296]. Die überwiegende Anzahl der Untersuchungen belegt jedoch, dass meist eine hohe physiologische Dosis von PAI-1 die Tumورprogression fördert [110]. Für eine mittlere physiologische PAI-1-Dosis, wie sie bisher mit dem 4G/5G-Genotyp assoziiert wurde, als tumorfördernde Dosis beim Ovarialkarzinom, gibt es bisher *in vivo* und *in vitro* keine Belege. Alternativ wäre es natürlich denkbar, dass die Gendosis des 4G/5G-Polymorphismus speziell im ovariellen Karzinomgewebe nicht linear mit der PAI-1-Expression assoziiert ist, sondern durch unbekannte Faktoren moduliert wird. Demnach könnte der 4G/5G-Genotyp im Tumorgewebe des Ovarialkarzinoms nicht, wie bisher angenommen, zu einer mittleren PAI-1-Expression führen, sondern zu einer höheren PAI-1-Expression, welche die Prognose, Inzidenz und Differenzierung negativ beeinflussen würde. In anderen Zusammenhängen konnten bereits nicht-lineare Zusammenhänge zwischen Gendosis und Effekt gezeigt werden, so z. B. in Hefezellen in Bezug auf Histongene [297] oder in transgenen Mäusen in Bezug auf Ovarialkarzinome und die Gendosis von COX-2 (Cyclooxygenase-2) [298]. Bei der letztgenannten Studie führte eine Halbierung der Gendosis von COX-2 zu weniger Ovarialkarzinomen. Eine Deletion des COX-2-Gens verursachte allerdings genauso viele Karzinome wie die normale COX-2-Gendosis durch eine kompensatorische COX-1-Expression. Allerdings wurden in beiden Studie nicht Polymorphismen untersucht, sondern die Gene wurden entweder überexprimiert oder reduziert exprimiert. Eine Untersuchung, die eine vermehrte Genexpression bei Vorliegen eines heterozygoten Genotyps eines SNP demonstriert, ist mir nicht bekannt. Für das Mammakarzinom wurde allerdings eine lineare Assoziation zwischen der Anzahl der 4G-Allele und der PAI-1-Expression im Tumorgewebe gezeigt [234], wenn auch nicht von allen Autoren [246, 247]. Bisher wurde der Zusammenhang zwischen der PAI-1-Expression im Tumorgewebe von Ovarialkarzinomen und dem 4G/5G-Polymorphismus noch nicht untersucht.

Die tendenziell positive Bedeutung des 4G-Allels

In den Subgruppen der Patientinnen mit Resttumor und mit Aszites ließ der Kurvenverlauf annehmen, dass Patientinnen mit dem 4G-Allel (4G/4G- und 4G/5G-Genotyp) tendenziell ein längeres rezidivfreies Überleben hatten als Patientinnen ohne das 4G-Allel (5G/5G-Genotyp). Auch in der Subgruppe der Patientinnen mit G3-Tumor war das 4G-Allel tendenziell mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert. Diese Subgruppen haben gemeinsam, dass sie auf einen aggressiven Tumorphänotyp schließen lassen. Die Tendenzen blieben teilweise deutlich subsignifikant, sodass eine größere Fallzahl zur Überprüfung nötig wäre. Ein Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem Gesamtüberleben in diesen Subgruppen ließ sich nicht erkennen. Für Mammakarzinome konnte gezeigt werden, dass Tumoren mit hoher PAI-1-Expression gut auf eine frühe neoadjuvante Chemotherapie ansprechen [299]. Außerdem sprechen hier auch Patientinnen mit G3-Tumoren besser auf eine (neoadjuvante) Chemotherapie an als Patientinnen mit einem gut differenzierten Tumor [300]. Man könnte daher annehmen, dass Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit dem 5G/5G-Genotyp einen niedrigen PAI-1-Level im Tumorgewebe haben und daher nicht so gut auf eine Chemotherapie ansprechen. Der negative Einfluss des schlechten Therapieansprechens könnte einen möglichen prognostischen Vorteil der geringen PAI-1-Expression überwiegen, sodass diese Patientinnen ein verkürztes rezidivfreies Überleben hätten. Insbesondere für Patientinnen mit einem G3-Tumor wäre das denkbar. Beim Ovarialkarzinom ist das Grading nur im FIGO-Stadium I ein etablierter negativer prognostischer Faktor. Möglicherweise hängt dies jedoch eben mit einer erhöhten Chemosensitivität gering differenzierter Ovarialkarzinome zusammen [76]. Da alle Patientinnen in fortgeschrittenem FIGO-Stadium eine Chemotherapie erhalten, kann man diesen Effekt aber nur schwer untersuchen.

Aufgrund der multiplen Funktionen von PAI-1 lassen sich viele Hypothesen aufstellen zur Ursache einer schlechteren Prognose bei Vorliegen des heterozygoten 4G/5G-Genotyps und ebenso des 5G/5G-Genotyps (kein 4G-Allel). Möglicherweise ist PAI-1, das der Tumor selbst oder das umgebende Stroma exprimieren, für das Ovarialkarzinom in verschiedenen Stadien, Differenzierungszuständen, Histologien und Gegebenheiten, die mit der Aszitesbildung zusammenhängen, mal mehr oder weniger relevant bzw. prognostisch wirksam. So wäre auch denkbar, dass in verschiedenen Zuständen verschiedene Genotypen des 4G/5G-Polymorphismus für das Ovarialkarzinom prognostisch bedeutend sein könnten. Allerdings waren die Einflüsse des heterozygoten 4G/5G-Genotyps und des 5G/5G-Genotyps nicht signifikant und sind daher möglicherweise zufällig.

Die negative Bedeutung des 4G-Allels

Bei Patientinnen mit einem G1- oder G2-Tumor war das 4G-Allel signifikant mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben und tendenziell auch mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert. Dies stützt die Annahme, dass das 4G-Allel mit einer vermehrten PAI-1-Expression im Ovarialkarzinom und darüber hinaus mit einem aggressiveren Tumorphänotyp und einer schlechteren Prognose verknüpft ist. Möglicherweise wird dieser potenzielle Effekt durch eine starke Dedifferenzierung überlagert und wird so nur in einer Gruppe mit besser differenzierten Tumoren deutlich. Der 4G/5G-Polymorphismus scheint eher mit der Progression des Ovarialkarzinoms assoziiert zu sein als mit seiner Entstehung, denn es konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der Inzidenz, aber mit der Prognose der Patientinnen mit G1- oder G2-Tumor festgestellt werden. Im Rahmen der Tumorprogression werden viele Mediatoren von den Tumorzellen selbst oder vom Stroma sezerniert. Versteht man den 4G/5G-Polymorphismus als einen „Reaktionspolymorphismus“ [208], so könnte die schlechtere Prognose bei Vorliegen des 4G-Allels möglicherweise u. a. durch den Mediator IL-1 mitbestimmt werden. Es wird sowohl durch Fibroblasten als auch durch Tumorzellen sezerniert und fördert die Tumorprogression [301] auch beim Ovarialkarzinom [302]. Denn IL-1 aktiviert die PAI-1-Transkription bei Vorliegen des 4G-Allels stärker als bei Vorliegen des 5G-Allels [187] und könnte so durch vermehrte PAI-1-Expression zur Tumorprogression beitragen. Denkbar wäre, dass der 4G/5G-Polymorphismus nur einen geringen Einfluss ausübt und andere Faktoren, die die Transkription regulieren, größeren Einfluss haben, wie es eine Studie für das Mammakarzinom darlegte [246].

5.7.2 Der 4G/5G-Polymorphismus und die Prognose verschiedener maligner Tumoren

Es ist bekannt, dass PAI-1 ein starker prognostischer Biomarker beim nodalnegativen Mammakarzinom ist [303]. Zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem PAI-1-Plasmalevel von Patientinnen mit Mammakarzinom besteht allerdings kein Zusammenhang [242]. Zwischen vermehrter PAI-1-Tumorexpression und der Anzahl der 4G-Allele konnte eine Untersuchung hingegen eine positive Assoziation belegen [234]. Andere Studien konnten keine Assoziation demonstrieren [246, 247]. Mammakarzinom-Patientinnen mit dem 4G/4G-Genotyp hatten in einer Studie die schlechteste Prognose [304], in einer anderen Studie Patientinnen mit dem 4G/5G-Genotyp [305] und in einer dritten Patientinnen mit dem 5G/5G-Genotyp [248]. In einer vierten Studie war die Prognose unabhängig vom 4G/5G-Polymorphismus [246]. Die Differenzen beruhen möglicherweise auf Unterschieden in den beobachteten Populationen. Beim Kolonkarzinom [253] und Hodenkarzinom [306] ist das 4G-Allel mit einer schlechteren Prognose verknüpft. Beim Prostatakarzinom hat der 4G/5G-Polymorphismus keinen Einfluss auf die Prognose [273]. Beim klarzelligen Nierenzellkarzinom zeigte sich eine Tendenz für eine Bedeutung des heterozygoten Genotyps des 4G/5G-Polymorphismus im Vergleich zu beiden

homozygoten Genotypen. Allerdings war dort die Prognose der Patienten mit dem heterozygoten 4G/5G-Genotyp tendenziell besser und nicht schlechter als die Prognose der Patienten mit dem 4G/4G- oder dem 5G/5G-Genotyp. Eine signifikante Assoziation zwischen der PAI-1-Expression im Tumorgewebe und dem 4G/5G-Polymorphismus konnten die Autoren nicht demonstrieren [274].

5.7.3 PAI-1 und die Prognose des Ovarialkarzinoms

Die Wirkung von PAI-1 auf die Tumorprogression und damit Prognose ist abhängig von der exprimierenden Zelle. Eine durch TGF- β -stimulierte physiologische Hochregulierung von PAI-1 in SKOV-3-Zellen reduzierte deren Migration und Invasion [307]. Wenn allerdings HRA-Ovarialkarzinomzellen über TGF- β -Sekretion die PAI-1-Expression in Mesothelzellen stimulierten, führte das zu vermehrter Zell-Zelladhäsion zwischen Ovarialkarzinomzellen und Mesothelzellen und zu verstärkter Invasion der HRA-Zellen durch die Mesothelschicht [308]. Mehrere Arbeitsgruppen beobachteten keine Korrelation der PAI-1-Expression im Tumorgewebe oder im Zystenfluid von Ovarialkarzinomen mit dem rezidivfreien oder dem Gesamtüberleben [142, 146, 149, 151, 152, 154], während andere durchaus demonstrieren konnten, dass eine hohe PAI-1-Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht [136, 138, 140, 143, 144, 265], wenn auch z.T. nur in Kombination mit uPA [276] oder IL-6 [309]. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind u. a. durch verschiedene Cut-Off-Werte, Extraktionsmethoden, Antikörper und Populationen verursacht. Wenn nur klarzellige Ovarialkarzinome untersucht wurden, hatten Patientinnen mit hoher PAI-1-Expression eine gute Prognose [310]. PAI-1 aus dem Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist interessanterweise mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert. Sezerniertes PAI-1 wirkt also möglicherweise anders als zellassoziiertes PAI-1 [311]. Der Plasmalevel von PAI-1 hat keinen Einfluss auf die Prognose des Ovarialkarzinoms oder das Ansprechen auf Chemotherapie [153, 243].

5.8 Schlussbetrachtung

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung eignet sich der 4G/5G-Polymorphismus nicht als Parameter zur Identifizierung einer Risikogruppe für das Ovarialkarzinom, da sich keine signifikante Erhöhung der Erkrankungschance für einen Genotyp oder ein Allel zeigte. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten von zwei früheren Studien anderer Autoren überein [235, 236]. Allerdings konnte im untersuchten Kollektiv in Bezug auf die Prognose für die Subgruppe der Patientinnen mit gut oder mäßig differenziertem Ovarialkarzinom ein Zusammenhang mit dem 4G/5G-Polymorphismus hergestellt werden. Bei Vorliegen des 4G-Allels war die Prognose signifikant schlechter. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine durch

das 4G-Allel erhöhte PAI-1-Expression bei G1- oder G2-Tumoren die Tumorprogression fördert. Ein solcher Zusammenhang zwischen dem 4G-Allel und der Prognose konnte allerdings nicht für Patientinnen mit G3-Tumoren nachgewiesen werden. Im Gegenteil, hier schien eher das 5G-Allel, wenn auch statistisch nicht signifikant, mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zur Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus für G1- und G2-Tumoren einerseits und G3-Tumoren andererseits könnten mit den multiplen Funktionen von PAI-1 erklärt werden, die je nach Umgebung unterschiedlich zur Ausprägung kommen können und in der Summe entweder PAI-1 zu einem tumorfördernden oder tumorsupprimierenden Faktor werden lassen. Die hier gefundene Assoziation zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Prognose bei den verschiedenen Grading-Gruppen des Ovarialkarzinoms sollte zunächst in größeren Kollektiven bestätigt werden. Ließe sich dieser Zusammenhang bestätigen, wäre der 4G/5G-Polymorphismus ein neuer Prognosemarker beim Ovarialkarzinom. Es wäre dann zu untersuchen, inwieweit der Zusammenhang durch einen anzunehmenden höheren PAI-1-Level bei Vorliegen des 4G-Allels verursacht wurde. Wenn auch dies zutrifft, wäre sogar eine spezifische Therapie, die PAI-1 hemmt, eine sinnvolle Ergänzung der bisherigen Behandlung des Ovarialkarzinoms. Antikörper und Peptide, die PAI-1 hemmen, wie XR5967, sind bereits in Entwicklung, ebenso Wirkstoffe, die uPA selbst oder dessen Bindung an uPAR hemmen [105, 312]. Allerdings haben PAI-1 und das PAS viele physiologische Funktionen, wie z. B. in der Wundheilung [313], sodass Nebenwirkungen zu vermuten sind. Da sich die Funktionen der Proteasen des PAS mit denen anderer Proteasen, wie den Matrixmetalloproteasen, teilweise überschneiden und so die Inhibition einer Protease durch eine andere kompensiert werden könnte, müssen möglicherweise mehrere Inhibitoren kombiniert werden, um effizient zu wirken [118]. Derzeit wird beim Ovarialkarzinom u. a. ein radioaktives Peptid, ^{213}Bi -P-P4D, das an den uPAR bindet, untersucht [314] und das Peptid Å6, das aus uPA entwickelt wurde, in einer Phase-II-Studie getestet. Es scheint das rezidivfreie Überleben nach Chemotherapie bei asymptomatischen Patientinnen mit CA 125-Anstieg zu verlängern [315].

6 Zusammenfassung

Der Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) hemmt die Plasminogenaktivierung durch uPA und tPA und damit die extrazelluläre Proteolyse. Außerdem reguliert er die Zelladhäsion durch Interaktion mit Vitronektin. Neben seiner Bedeutung für die Fibrinolyse und Blutgerinnung und damit für kardiovaskuläre Erkrankungen wird PAI-1 von vielen Malignomen exprimiert, darunter auch das Mamma- und das Ovarialkarzinom, und ist hier ein negativer prognostischer Faktor. PAI-1 fördert dosisabhängig die Tumorangiogenese, Zellmigration und Metastasierung. Im Promotorbereich von PAI-1 existiert ein Insertions-Deletions-Polymorphismus mit vier vs. fünf Guaninbasen, der 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus. Während an beide Allele ein Aktivator bindet, bindet nur an das 5G-Allel ein Repressor. Daher steigert das 4G-Allel die Transkription von PAI-1 im Vergleich zum 5G-Allel. Bei Vorliegen des 4G-Allels ist der PAI-1-Plasmalevel erhöht. Ob der 4G/5G-Polymorphismus die PAI-1-Expression beim Ovarialkarzinom beeinflusst, wurde bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich unterschiedliche Tendenzen für die verschiedenen Genotypen bzw. Allele des 4G/5G-Polymorphismus in Bezug auf die Erkrankungschance, das Alter, Assoziationen mit den klinisch-pathologischen Faktoren und dem rezidivfreien und dem Gesamtüberleben, die jedoch bis auf eine Untersuchung im subsignifikanten Bereich blieben. In der Subgruppe der Patientinnen mit gut oder mäßig differenziertem Ovarialkarzinom war das rezidivfreie Überleben der Patientinnen mit 4G-Allel (4G/4G- und 4G/5G-Genotyp) allerdings signifikant verkürzt im Vergleich zu Patientinnen ohne 4G-Allel (5G/5G-Genotyp). Man kann vermuten, dass die Ovarialkarzinome der Patientinnen mit 4G-Allel mehr PAI-1 exprimieren und dadurch einen aggressiveren Phänotyp und eine schlechtere Prognose aufweisen als die Tumoren von Patientinnen, die nur das 5G-Allel haben. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Tendenzen, die sich in dieser Arbeit ergeben haben, zurückzuführen auf die vielen Funktionen von PAI-1, die es zu einem tumorfördernden oder tumorsupprimierenden Faktor werden lassen könnten, je nachdem in welcher Umgebung der Tumor sich befindet. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Probandinnen bzw. Patientinnen sind nötig, um die Bedeutung des 4G/5G-Polymorphismus insbesondere für die Prognose des Ovarialkarzinoms weiter einzuordnen.

7 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg), Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Krebs in Deutschland 2007/2008. 2012, S. 76-79.
2. Prat J: Subclassification of ovarian cancer based on pathology and genetics. *Eur. J. Cancer* 2009, 45 Suppl 1:427–428.
3. Robert Koch-Institut (Hrsg), Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin: Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland 1990-2010. 2010, S. 93-97.
4. Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK: Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist* 2003, 8:541–552.
5. Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren. Stand: 01.05.2007, gültig bis 01.05.2012, derzeit in Überarbeitung, Abrufdatum: 14.03.2012
[<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/032-035.html>].
6. Baltzer J, Löning T, Riethdorf L, Sinn HP, Wagner G: *Klassifikation maligner Tumoren der weiblichen Genitalorgane*. 1., Aufl. Springer, Berlin; 2005, S. 224-230.
7. Mackay HJ, Brady MF, Oza AM, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Swart AM, Siddiqui N, Colombo N, Bookman MA, Pfisterer J, Du Bois A: Prognostic relevance of uncommon ovarian histology in women with stage III/IV epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2010, 20:945–952.
8. Kurman RJ, Shih I-M: The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol* 2010, 34:433–443.
9. Fathalla MF: Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *The Lancet* 1971, 298:163.
10. Cramer DW, Hutchison GB, Welch WR, Scully RE, Ryan KJ: Determinants of ovarian cancer risk. I. Reproductive experiences and family history. *J. Natl. Cancer Inst* 1983, 71:711–716.
11. Cramer DW, Welch WR: Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J. Natl. Cancer Inst* 1983, 71:717–721.
12. Parmley TH, Woodruff JD: The ovarian mesothelioma. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1974, 120:234–241.
13. Lauchlan SC: The secondary Müllerian system. *Obstet Gynecol Surv* 1972, 27:133–146.
14. Singer G, Kurman RJ, Chang H-W, Cho SKR, Shih I-M: Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am. J. Pathol* 2002, 160:1223–1228.
15. Mok SC, Kwong J, Welch WR, Samimi G, Ozbun L, Bonome T, Birrer MJ, Berkowitz RS, Wong K-K: Etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Dis. Markers* 2007, 23:367–376.
16. Singer G, Stöhr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao D, Wang T, Kurman R, Shih I-M: Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am. J. Pathol* 2005, 29:218–224.
17. Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, Evanoff A, Hughes C: Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1996, 88:554–559.
18. Coulam CB, Annegers JF, Kranz JS: Chronic anovulation syndrome and associated neoplasia. *Obstet Gynecol* 1983, 61:403–407.
19. Olsen CM, Green AC, Nagle CM, Jordan SJ, Whiteman DC, Bain CJ, Webb PM: Epithelial ovarian cancer: testing the “androgens hypothesis”. *Endocr. Relat. Cancer* 2008, 15:1061–1068.

20. Franceschi S, La Vecchia C, Booth M, Tzonou A, Negri E, Parazzini F, Trichopoulos D, Beral V: Pooled analysis of 3 European case-control studies of ovarian cancer: II. Age at menarche and at menopause. *Int. J. Cancer* 1991, 49:57–60.
21. Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE: A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1995, 76:284–290.
22. Chiaffarino F, Pelucchi C, Parazzini F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Conti E, Montella M, La Vecchia C: Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer. *Ann. Oncol* 2001, 12:337–341.
23. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J: Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am. J. Epidemiol* 1992, 136:1184–1203.
24. Garg PP, Kerlikowske K, Subak L, Grady D: Hormone replacement therapy and the risk of epithelial ovarian carcinoma: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998, 92:472–479.
25. Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ: Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *JAMA* 2001, 285:1460–1465.
26. Venn A, Watson L, Bruinsma F, Giles G, Healy D: Risk of cancer after use of fertility drugs with in-vitro fertilisation. *Lancet* 1999, 354:1586–1590.
27. Boyd J, Rubin SC: Hereditary ovarian cancer: molecular genetics and clinical implications. *Gynecol. Oncol* 1997, 64:196–206.
28. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, Jack E, Vesprini DJ, Kuperstein G, Abrahamson JL, Fan I, Wong B, Narod SA: Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am. J. Hum. Genet* 2001, 68:700–710.
29. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M: Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet* 1998, 62:676–689.
30. Marra G, Boland CR: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J. Natl. Cancer Inst* 1995, 87:1114–1125.
31. Green A, Purdie D, Bain C, Siskind V, Russell P, Quinn M, Ward B: Tubal sterilisation, hysterectomy and decreased risk of ovarian cancer. Survey of Women's Health Study Group. *Int. J. Cancer* 1997, 71:948–951.
32. Beard CM, Hartmann LC, Atkinson EJ, O'Brien PC, Malkasian GD, Keeney GL, Melton LJ: The epidemiology of ovarian cancer: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1935-1991. *Ann Epidemiol* 2000, 10:14–23.
33. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J: Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am. J. Epidemiol* 1992, 136:1212–1220.
34. Hartge P, Whittemore AS, Itnyre J, McGowan L, Cramer D: Rates and risks of ovarian cancer in subgroups of white women in the United States. The Collaborative Ovarian Cancer Group. *Obstet Gynecol* 1994, 84:760–764.
35. Franceschi S, Parazzini F, Negri E, Booth M, La Vecchia C, Beral V, Tzonou A, Trichopoulos D: Pooled analysis of 3 European case-control studies of epithelial ovarian cancer: III. Oral contraceptive use. *Int. J. Cancer* 1991, 49:61–65.

36. La Vecchia C, Franceschi S: Oral contraceptives and ovarian cancer. *Eur. J. Cancer Prev* 1999, 8:297–304.
37. Narod SA, Risch H, Moslehi R, Dørum A, Neuhausen S, Olsson H, Provencher D, Radice P, Evans G, Bishop S, Brunet JS, Ponder BA: Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. *N. Engl. J. Med* 1998, 339:424–428.
38. Chiaffarino F, Pelucchi C, Negri E, Parazzini F, Franceschi S, Talamini R, Montella M, Ramazzotti V, La Vecchia C: Breastfeeding and the risk of epithelial ovarian cancer in an Italian population. *Gynecol. Oncol* 2005, 98:304–308.
39. Jordan SJ, Siskind V, C Green A, Whiteman DC, Webb PM: Breastfeeding and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Causes Control* 2010, 21:109–116.
40. Schmalfeldt B, Du Bois A, Burges A, Emons G, Fink D, Gropp M, Hasenburg A, Jäger W, Kimmig R, Kiechle M, Kommoss F, Kreienberg R, Kuhn W, Lück H-J, Meier W, Münstedt K, Ortmann O, Pfisterer J, Richter B, Runnebaum I, Schröder W, Sehouli J, Tanner B, Wagner U, Weis J: [Diagnosis and treatment of malignant ovarian tumors 2005: recommendations of the Kommission Ovar of the AGO]. *Zentralbl Gynakol* 2006, 128:11–17.
41. Jalid Sehouli: Multimodales Management maligner Ovarialtumore. 2005.
42. Cramer DW, Welch WR, Scully RE, Wojciechowski CA: Ovarian cancer and talc: a case-control study. *Cancer* 1982, 50:372–376.
43. Harlow BL, Cramer DW, Bell DA, Welch WR: Perineal exposure to talc and ovarian cancer risk. *Obstet Gynecol* 1992, 80:19–26.
44. 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* 2000, 92:249–252.
45. Langseth H, Hankinson SE, Siemiatycki J, Weiderpass E: Perineal use of talc and risk of ovarian cancer. *J Epidemiol Community Health* 2008, 62:358–360.
46. La Vecchia C, Decarli A, Negri E, Parazzini F, Gentile A, Cecchetti G, Fasoli M, Franceschi S: Dietary factors and the risk of epithelial ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst* 1987, 79:663–669.
47. Risch HA, Jain M, Marrett LD, Howe GR: Dietary fat intake and risk of epithelial ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst* 1994, 86:1409–1415.
48. Jordan SJ, Whiteman DC, Purdie DM, Green AC, Webb PM: Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review. *Gynecol. Oncol* 2006, 103:1122–1129.
49. Tworoger SS, Gertig DM, Gates MA, Hecht JL, Hankinson SE: Caffeine, alcohol, smoking, and the risk of incident epithelial ovarian cancer. *Cancer* 2008, 112:1169–1177.
50. Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J: Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG* 2005, 112:857–865.
51. Chan A, Gilks B, Kwon J, Tinker AV: New insights into the pathogenesis of ovarian carcinoma: time to rethink ovarian cancer screening. *Obstet Gynecol* 2012, 120:935–940.
52. Thigpen JT: Limited-stage ovarian carcinoma. *Semin. Oncol* 1999, 26:29–33.
53. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S: Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J. Natl. Cancer Inst* 2003, 95:113–125.
54. Winter-Roach BA, Kitchener HC, Dickinson HO: Adjuvant (post-surgery) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD004706.

55. Du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall-Lundqvist E, Bookman M, Bowtell D, Brady M, Casado A, Cervantes A, Eisenhauer E, Friedlaender M, Fujiwara K, Grenman S, Guastalla JP, Harper P, Hogberg T, Kaye S, Kitchener H, Kristensen G, Mannel R, Meier W, Miller B, Neijt JP, Oza A, Ozols R, Parmar M, Pecorelli S, Pfisterer J, Poveda A, et al.: 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIIG OCCO 2004). *Ann. Oncol* 2005, 16 Suppl 8:viii7–viii12.
56. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, Boente M, Birrer MJ, Liang SX: Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2011, 365:2473–2483.
57. Stark D, Nankivell M, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Elit L, Stockler M, Hilpert F, Cervantes A, Brown J, Lanceley A, Velikova G, Sabate E, Pfisterer J, Carey MS, Beale P, Qian W, Swart AM, Oza A, Perren T: Standard chemotherapy with or without bevacizumab in advanced ovarian cancer: quality-of-life outcomes from the International Collaboration on Ovarian Neoplasms (ICON7) phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2013.
58. Tangjitgamol S, Manusirivithaya S, Laopaiboon M, Lumbiganon P: Interval debulking surgery for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD006014.
59. Du Bois A, Lück H-J, Meier W, Adams H-P, Möbus V, Costa S, Bauknecht T, Richter B, Warm M, Schröder W, Olbricht S, Nitz U, Jackisch C, Emons G, Wagner U, Kuhn W, Pfisterer J: A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst* 2003, 95:1320–1329.
60. Du Bois A, Lück HJ, Buser K, Meerpohl HG, Sessa C, Klaassen U, Meden H, Bochtler H, Diergarten K: Extended phase II study of paclitaxel as a 3-h infusion in patients with ovarian cancer previously treated with platinum. *Eur. J. Cancer* 1997, 33:379–384.
61. Ten Bokkel Huinink W, Gore M, Carmichael J, Gordon A, Malfetano J, Hudson I, Broom C, Scarabelli C, Davidson N, Spaczynski M, Bolis G, Malmström H, Coleman R, Fields SC, Heron JF: Topotecan versus paclitaxel for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol* 1997, 15:2183–2193.
62. Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, Parkin DE, Gore ME, Lacave AJ: Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J. Clin. Oncol* 2001, 19:3312–3322.
63. Bristow RE, Puri I, Chi DS: Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol. Oncol* 2009, 112:265–274.
64. Parmar MKB, Ledermann JA, Colombo N, Du Bois A, Delaloye J-F, Kristensen GB, Wheeler S, Swart AM, Qian W, Torri V, Floriani I, Jayson G, Lamont A, Tropé C: Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* 2003, 361:2099–2106.
65. Pfisterer J, Plante M, Vergote I, Du Bois A, Hirte H, Lacave AJ, Wagner U, Stähle A, Stuart G, Kimmig R, Olbricht S, Le T, Emerich J, Kuhn W, Bentley J, Jackisch C, Lück H-J, Rochon J, Zimmermann AH, Eisenhauer E: Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *J. Clin. Oncol* 2006, 24:4699–4707.
66. Wagner U, Marth C, Largillier R, Kaern J, Brown C, Heywood M, Bonaventura T, Vergote I, Piccirillo MC, Fossati R, GebSKI V, Lauraine EP: Final overall survival results of phase III GCIIG CALYPSO trial of pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin vs paclitaxel and carboplatin in platinum-sensitive ovarian cancer patients. *Br. J. Cancer* 2012, 107:588–591.
67. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J,

- Nycum LR: OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J. Clin. Oncol.* 2012, 30:2039–2045.
68. Pectasides D, Fountzilias G, Aravantinos G, Bamias A, Kalofonos HP, Skarlos D, Briasoulis E, Konstantara A, Economopoulos T, Dimopoulos MA: Epithelial ovarian carcinoma in younger vs older women: is age an independent prognostic factor? The Hellenic Oncology Cooperative Group experience. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2007, 17:1003–1010.
69. Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ: Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol. Oncol* 1998, 69:103–108.
70. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, Park RC: Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J. Clin. Oncol* 1991, 9:1138–1150.
71. Hoskins WJ, McGuire WP, Brady MF, Homesley HD, Creasman WT, Berman M, Ball H, Berek JS: The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1994, 170:974–979; discussion 979–980.
72. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ: Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J. Clin. Oncol* 2002, 20:1248–1259.
73. Colombo P-E, Mourregot A, Fabbro M, Gutowski M, Saint-Aubert B, Quenet F, Gourgou S, Rouanet P: Aggressive surgical strategies in advanced ovarian cancer: a monocentric study of 203 stage IIIC and IV patients. *Eur J Surg Oncol* 2009, 35:135–143.
74. Omura GA, Bundy BN, Berek JS, Curry S, Delgado G, Mortel R: Randomized trial of cyclophosphamide plus cisplatin with or without doxorubicin in ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol* 1989, 7:457–465.
75. Thigpen T, Brady MF, Omura GA, Creasman WT, McGuire WP, Hoskins WJ, Williams S: Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer* 1993, 71:606–614.
76. Kommoss S, Schmidt D, Kommoss F, Hedderich J, Harter P, Pfisterer J, Du Bois A: Histological grading in a large series of advanced stage ovarian carcinomas by three widely used grading systems: consistent lack of prognostic significance. A translational research subprotocol of a prospective randomized phase III study (AGO-OVAR 3 protocol). *Virchows Arch.* 2009, 454:249–256.
77. Mayr D, Diebold J: Grading of ovarian carcinomas. *Int. J. Gynecol. Pathol* 2000, 19:348–353.
78. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, Bertelsen K, Einhorn N, Sevelde P, Gore ME, Kaern J, Verrelst H, Sjövall K, Timmerman D, Vandewalle J, Van Gramberen M, Tropé CG: Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 2001, 357:176–182.
79. Brun JL, Feyler A, Chêne G, Saurel J, Brun G, Hocké C: Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol* 2000, 78:21–27.
80. Bamias A, Psaltopoulou T, Sotiropoulou M, Haidopoulos D, Lianos E, Bournakis E, Papadimitriou C, Rodolakis A, Vlahos G, Dimopoulos MA: Mucinous but not clear cell histology is associated with inferior survival in patients with advanced stage ovarian carcinoma treated with platinum-paclitaxel chemotherapy. *Cancer* 2010, 116:1462–1468.
81. Ikeda K, Sakai K, Yamamoto R, Hareyama H, Tsumura N, Watari H, Shimizu M, Minakami

- H, Sakuragi N: Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1, and p53 in stages II-IV ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2003, 13:776–784.
82. Chan JK, Teoh D, Hu JM, Shin JY, Osann K, Kapp DS: Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers. *Gynecol. Oncol* 2008, 109:370–376.
83. Hess V, A'Hern R, Gore M: Relative Platinum – Resistance of Mucinous Carcinoma of the Ovary. *39th ASCO Annual Meeting 2003* :Abstract 1796.
84. Enomoto T, Kuragaki C, Yamasaki M, Sugita N, Otsuki Y, Ikegami H, Matsuzaki N, Yamada T, Wakimoto A, Murata Y: Is clear cell carcinoma and mucinous carcinoma of the ovary sensitive to combination chemotherapy with paclitaxel und carboplatin? *39th ASCO Annual Meeting 2003*: Abstract 1797.
85. Hess V, A'Hern R, Nasiri N, King DM, Blake PR, Barton DPJ, Shepherd JH, Ind T, Bridges J, Harrington K, Kaye SB, Gore ME: Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *J. Clin. Oncol* 2004, 22:1040–1044.
86. Sehouli J, Mustea A, Könsgen D, Lichtenegger W: [Conventional and experimental prognostic factors in ovarian cancer]. *Zentralbl Gynakol* 2004, 126:315–322.
87. Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij CL, Van Zonneveld AJ, Van Mourik JA: Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J* 1986, 5:2539–2544.
88. Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW: Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol. Sci* 2002, 17:56–61.
89. Collen D, Lijnen HR: Tissue-type plasminogen activator. Mechanisms of action and thrombolytic properties. *Haemostasis* 1986, 16 Suppl 3:25–32.
90. Blasi F, Vassalli JD, Danø K: Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J. Cell Biol* 1987, 104:801–804.
91. Andreasen PA, Riccio A, Welinder KG, Douglas R, Sartorio R, Nielsen LS, Oppenheimer C, Blasi F, Danø K: Plasminogen activator inhibitor type-1: reactive center and amino-terminal heterogeneity determined by protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett* 1986, 209:213–218.
92. Hekman CM, Loskutoff DJ: Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *J. Biol. Chem* 1985, 260:11581–11587.
93. Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, Geoghegan KF, Gerard RD, Goldsmith EJ: Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* 1992, 355:270–273.
94. Declerck PJ, De Mol M, Vaughan DE, Collen D: Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem* 1992, 267:11693–11696.
95. Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B: Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *J. Clin. Pathol* 1991, 44:139–143.
96. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y: Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat. Med* 1996, 2:800–803.
97. Booth NA, Simpson AJ, Croll A, Bennett B, MacGregor IR: Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br. J. Haematol* 1988, 70:327–333.
98. Wiman B, Almquist A, Sigurdardottir O, Lindahl T: Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI) is bound to vitronectin in plasma. *FEBS Lett* 1988, 242:125–128.

99. Dupont DM, Madsen JB, Kristensen T, Bodker JS, Blouse GE, Wind T, Andreasen PA: Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1. *Front. Biosci* 2009, 14:1337–1361.
100. Mimuro J, Schleef RR, Loskutoff DJ: Extracellular matrix of cultured bovine aortic endothelial cells contains functionally active type 1 plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987, 70:721–728.
101. Preissner KT, Grulich-Henn J, Ehrlich HJ, Declerck P, Justus C, Collen D, Pannekoek H, Müller-Berghaus G: Structural requirements for the extracellular interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with endothelial cell matrix-associated vitronectin. *J. Biol. Chem* 1990, 265:18490–18498.
102. Dellas C, Loskutoff DJ: Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb. Haemost.* 2005, 93:631–640.
103. Myöhänen H, Vaheri A: Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, 61:2840–2858.
104. Carter JC, Church FC: Obesity and breast cancer: the roles of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and plasminogen activator inhibitor-1. *PPAR Res* 2009, 2009:345320.
105. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH: The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci* 2000, 57:25–40.
106. Ellis V: Plasminogen activation at the cell surface. *Curr. Top. Dev. Biol* 2003, 54:263–312.
107. Binder BR, Mihaly J, Prager GW: uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb. Haemost.* 2007, 97:336–342.
108. Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA: Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J. Biol. Chem* 1994, 269:32380–32388.
109. Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J, Blasi F: Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J* 1997, 16:2610–2620.
110. Binder BR, Mihaly J: The plasminogen activator inhibitor “paradox” in cancer. *Immunol. Lett* 2008, 118:116–124.
111. Smith HW, Marshall CJ: Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010, 11:23–36.
112. Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG: Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* 1998, 8:51–54.
113. Bretscher MS: Moving membrane up to the front of migrating cells. *Cell* 1996, 85:465–467.
114. Czekay R-P, Wilkins-Port CE, Higgins SP, Freytag J, Overstreet JM, Klein RM, Higgins CE, Samarakoon R, Higgins PJ: PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *Int J Cell Biol* 2011, 2011:562481.
115. Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ: The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 1997, 72:1–22.
116. Loskutoff DJ, Curriden SA, Hu G, Deng G: Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS* 1999, 107:54–61.
117. Durand MKV, Bødker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, Kjølgaard S, Mathiasen L, Pedersen KE, Skeldal S, Wind T, Andreasen PA: Plasminogen activator inhibitor-I and tumour growth, invasion, and metastasis. *Thromb. Haemost* 2004, 91:438–449.
118. Danø K, Behrendt N, Høyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, Rømer J: Plasminogen activation and cancer. *Thromb. Haemost* 2005, 93:676–681.

119. Sahai E: Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005, 15:87–96.
120. Stefansson S, Petitclerc E, Wong MK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA: Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* 2001, 276:8135–8141.
121. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noël A: The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J. Cell Biol* 2001, 152:777–784.
122. Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart J-M, Noel A: Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene* 2004, 23:6986–6990.
123. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R: Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat. Cell Biol.* 2006, 8:877–884.
124. Kortlever RM, Bernards R: Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection. *Cell Cycle* 2006, 5:2697–2703.
125. Webb DJ, Thomas KS, Gonias SL: Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth. *J. Cell Biol.* 2001, 152:741–752.
126. Lademann UA, Römer MU: Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). *Thromb. Haemost* 2008, 100:1041–1046.
127. Lijnen HR: Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J. Thromb. Haemost* 2005, 3:35–45.
128. Hofmann R, Lehmer A, Buresch M, Hartung R, Ulm K: Clinical relevance of urokinase plasminogen activator, its receptor, and its inhibitor in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 1996, 78:487–492.
129. Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder JD, Fink U, Siewert JR: Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 1994, 54:2900–2907.
130. Herszényi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F: The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma. *Cancer* 1999, 86:1135–1142.
131. Jänicke F, Schmitt M, Graeff H: Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin. Thromb. Hemost* 1991, 17:303–312.
132. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau. Stand: 02.07.2012, gültig bis 30.06.2017, Abrufdatum: 7.10.2012 [<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/032-045OL.html>]
133. Astedt B, Holmberg L: Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature* 1976, 261:595–597.
134. Casslén B, Gustavsson B, Astedt B: Cell membrane receptors for urokinase plasminogen activator are increased in malignant ovarian tumours. *Eur. J. Cancer* 1991, 27:1445–1448.
135. Huber K, Wojta J, Kirchheimer JC, Ermler D, Binder BR: Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor in malignant and non-malignant ascitic fluid. *Eur. J. Clin. Invest* 1988, 18:595–599.
136. Chambers SK, Ivins CM, Carcangiu ML: Plasminogen activator inhibitor-1 is an

independent poor prognostic factor for survival in advanced stage epithelial ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer* 1998, 79:449–454.

137. Dorn J, Harbeck N, Kates R, Magdolen V, Grass L, Soosaipillai A, Schmalfeldt B, Diamandis EP, Schmitt M: Disease processes may be reflected by correlations among tissue kallikrein proteases but not with proteolytic factors uPA and PAI-1 in primary ovarian carcinoma. *Biol. Chem* 2006, 387:1121–1128.

138. Cai Z, Li Y-F, Liu F-Y, Feng Y-L, Hou J-H, Zhao M-Q: Expression and clinical significance of uPA and PAI-1 in epithelial ovarian cancer. *Ai Zheng* 2007, 26:312–317.

139. Borgfeldt C, Hansson SR, Gustavsson B, Måsbäck A, Casslén B: Dedifferentiation of serous ovarian cancer from cystic to solid tumors is associated with increased expression of mRNA for urokinase plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR) and its inhibitor (PAI-1). *Int. J. Cancer* 2001, 92:497–502.

140. Kuhn W, Pache L, Schmalfeldt B, Dettmar P, Schmitt M, Jänicke F, Graeff H: Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy. *Gynecol. Oncol* 1994, 55:401–409.

141. Schmalfeldt B, Kuhn W, Reuning U, Pache L, Dettmar P, Schmitt M, Jänicke F, Höfler H, Graeff H: Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and 2. *Cancer Res* 1995, 55:3958–3963.

142. Hoffmann G, Pollow K, Weikel W, Strittmatter HJ, Bach J, Schaffrath M, Knapstein P, Melchert F, Pollow B: Urokinase and plasminogen activator-inhibitor (PAI-1) status in primary ovarian carcinomas and ovarian metastases compared to benign ovarian tumors as a function of histopathological parameters. *Clin. Chem. Lab. Med* 1999, 37:47–54.

143. Kuhn W, Schmalfeldt B, Reuning U, Pache L, Berger U, Ulm K, Harbeck N, Späthe K, Dettmar P, Höfler H, Jänicke F, Schmitt M, Graeff H: Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer* 1999, 79:1746–1751.

144. Konecny G, Untch M, Pihan A, Kimmig R, Gropp M, Stieber P, Hepp H, Slamon D, Pegram M: Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression and prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res* 2001, 7:1743–1749.

145. Schmalfeldt B, Prechtel D, Härting K, Späthe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, Lengyel E: Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7:2396–2404.

146. Van der Burg ME, Henzen-Logmans SC, Berns EM, Van Putten WL, Klijn JG, Foekens JA: Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in benign, borderline, malignant primary and metastatic ovarian tumors. *Int. J. Cancer* 1996, 69:475–479.

147. Ho CH, Yuan CC, Liu SM: Diagnostic and prognostic values of plasma levels of fibrinolytic markers in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol* 1999, 75:397–400.

148. Koensgen D, Mustea A, Denkert C, Sun PM, Lichtenegger W, Sehouli J: Overexpression of the plasminogen activator inhibitor type-1 in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2006, 26:1683–1689.

149. Borgfeldt C, Bendahl P-O, Gustavsson B, Långström E, Fernö M, Willén R, Grenman S, Casslén B: High tumor tissue concentration of urokinase plasminogen activator receptor is associated with good prognosis in patients with ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 2003, 107:658–665.

150. Casslén B, Bossmar T, Lecander I, Astedt B: Plasminogen activators and plasminogen

activator inhibitors in blood and tumour fluids of patients with ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* 1994, 30A:1302–1309.

151. Boss EA, Massuger LFAG, Thomas CMG, Geurts-Moespot A, Van Schaik JHM, Boonstra H, Sweep CGJ: Clinical value of components of the plasminogen activation system in ovarian cyst fluid. *Anticancer Res.* 2002, 22:275–282.

152. Dorn J, Harbeck N, Kates R, Gkazepis A, Scorilas A, Soosaipillai A, Diamandis E, Kiechle M, Schmalfeldt B, Schmitt M: Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer. *Ann. Oncol* 2011, 22:877–883.

153. Abendstein B, Daxenbichler G, Windbichler G, Zeimet AG, Geurts A, Sweep F, Marth C: Predictive value of uPA, PAI-1, HER-2 and VEGF in the serum of ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 2000, 20:569–572.

154. Hornung R, Urs E, Serenella E, Edward W, Ursula S, Urs H, Daniel F: Analysis of potential prognostic factors in 111 patients with ovarian cancer. *Cancer Lett* 2004, 206:97–106.

155. Wang L, Madigan MC, Chen H, Liu F, Patterson KI, Beretov J, O'Brien PM, Li Y: Expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in advanced epithelial ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol.* 2009, 114:265–272.

156. Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreasen PA, Sartorio R, Nielsen LS, Stuart N, Stanislovitis P, Watkins P, Douglas R: Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1987, 84:8548–8552.

157. Loskutoff DJ, Linders M, Keijer J, Veerman H, Van Heerikhuizen H, Pannekoek H: Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns. *Biochemistry* 1987, 26:3763–3768.

158. Bosma PJ, Van den Berg EA, Kooistra T, Siemieniak DR, Slightom JL: Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. *J. Biol. Chem* 1988, 263:9129–9141.

159. Dennler S, Itoh S, Vivien D, Ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM: Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 1998, 17:3091–3100.

160. Buselmaier W, Tariverdian G: *Humangenetik*. 4. Aufl. Springer, Heidelberg; 2007, S. 22-23.

161. Emeis JJ, Kooistra T: Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1986, 163:1260–1266.

162. Zhang WJ, Wojta J, Binder BR: Notoginsenoside R1 counteracts endotoxin-induced activation of endothelial cells in vitro and endotoxin-induced lethality in mice in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17:465–474.

163. Kishida M, Urakaze M, Takata M, Nobata Y, Yamamoto N, Temaru R, Sato A, Yamazaki K, Nakamura N, Kobayashi M: PGE1 inhibits the expression of PAI-1 mRNA induced by TNF-alpha in human mesangial cells. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2005, 113:365–371.

164. Swiatkowska M, Szemraj J, Cierniewski CS: Induction of PAI-1 expression by tumor necrosis factor alpha in endothelial cells is mediated by its responsive element located in the 4G/5G site. *FEBS J* 2005, 272:5821–5831.

165. Medcalf RL, Van den Berg E, Schleuning WD: Glucocorticoid-modulated gene expression of tissue- and urinary-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 and 2. *J. Cell Biol* 1988, 106:971–978.

166. Bator JM, Cohen RL, Chambers DA: Hydrocortisone regulates the dynamics of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression in cultured murine keratinocytes. *Exp. Cell Res* 1998, 242:110–119.
167. Halleux CM, Declerck PJ, Tran SL, Detry R, Brichard SM: Hormonal control of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and production in human adipose tissue: stimulation by glucocorticoids and inhibition by catecholamines. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1999, 84:4097–4105.
168. Brown NJ, Nakamura S, Ma L, Nakamura I, Donnert E, Freeman M, Vaughan DE, Fogo AB: Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int* 2000, 58:1219–1227.
169. Nakamura S, Nakamura I, Ma L, Vaughan DE, Fogo AB: Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo. *Kidney Int* 2000, 58:251–259.
170. Chen H-C, Feener EP: MEK1,2 response element mediates angiotensin II-stimulated plasminogen activator inhibitor-1 promoter activation. *Blood* 2004, 103:2636–2644.
171. Gottschling-Zeller H, Aprath I, Skurk T, Hauner H: Beta-Adrenoceptor agonists and other cAMP elevating agents suppress PAI-1 production of human adipocytes in primary culture. *Horm. Metab. Res* 2000, 32:509–514.
172. Schiller M, Verrecchia F, Mauviel A: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-elevating agents inhibit transforming growth factor-beta-induced SMAD3/4-dependent transcription via a protein kinase A-dependent mechanism. *Oncogene* 2003, 22:8881–8890.
173. Meyer-Kirchrath J, Debey S, Glandorff C, Kirchrath L, Schrör K: Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol* 2004, 67:757–765.
174. Atsuta H, Uchiyama T, Kanai H, Iso T, Tanaka T, Suga T, Maeno T, Arai M, Nagai R, Kurabayashi M: Effects of a stable prostacyclin analogue beraprost sodium on VEGF and PAI-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Int. J. Cardiol* 2009, 132:411–418.
175. Ma Z, Kwong KYC, Tovar JP, Paek D: Cyclic adenosine monophosphate induces plasminogen activator inhibitor-1 expression in human mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2010, 400:569–574.
176. Kaneko T, Fujii S, Matsumoto A, Goto D, Ishimori N, Watano K, Furumoto T, Sugawara T, Sobel BE, Kitabatake A: Induction of plasminogen activator inhibitor-1 in endothelial cells by basic fibroblast growth factor and its modulation by fibrin acid. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2002, 22:855–860.
177. Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyama K, Kamiya A, Ando J: Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2006, 291:G26–34.
178. Schoenhard JA, Smith LH, Painter CA, Eren M, Johnson CH, Vaughan DE: Regulation of the PAI-1 promoter by circadian clock components: differential activation by BMAL1 and BMAL2. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2003, 35:473–481.
179. Shen GX: Impact and mechanism for oxidized and glycated lipoproteins on generation of fibrinolytic regulators from vascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem* 2003, 246:69–74.
180. Chen Y, Billadello JJ, Schneider DJ: Identification and localization of a fatty acid response region in the human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20:2696–2701.
181. Byon CH, Hardy RW, Ren C, Ponnazhagan S, Welch DR, McDonald JM, Chen Y: Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4. *Lab. Invest.* 2009, 89:1221–1228.

182. Nagamine Y: Transcriptional regulation of the plasminogen activator inhibitor type 1--with an emphasis on negative regulation. *Thromb. Haemost* 2008, 100:1007–1013.
183. Riccio A, Lund LR, Sartorio R, Lania A, Andreasen PA, Danø K, Blasi F: The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene. *Nucleic Acids Res* 1988, 16:2805–2824.
184. Uchiyama T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Utsugi T, Akuzawa N, Sato M, Tomono S, Kawazu S, Nagai R: Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2000, 20:1155–1161.
185. Wyrzykowska P, Stalińska K, Wawro M, Kochan J, Kasza A: Epidermal growth factor regulates PAI-1 expression via activation of the transcription factor Elk-1. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1799:616–621.
186. Kunz C, Pebler S, Otte J, Von der Ahe D: Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Res* 1995, 23:3710–3717.
187. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM: The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J. Biol. Chem* 1993, 268:10739–10745.
188. Eriksson P, Kallin B, Van't Hooft FM, Båvenholm P, Hamsten A: Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995, 92:1851–1855.
189. Zhan M, Zhou Y, Han ZC: No association of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G polymorphism with inhibitor level during basal transcription in vitro. *Int. J. Hematol* 2004, 79:400–404.
190. Ma Z, Jhun B, Jung SY, Oh CK: Binding of upstream stimulatory factor 1 to the E-box regulates the 4G/5G polymorphism-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression in mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol* 2008, 121:1006–1012.e2.
191. Zietz B, Drobnik W, Herfarth H, Buechler C, Schölmerich J, Schäffler A: Plasminogen activator inhibitor-1 promoter activity in adipocytes is not influenced by the 4 G/5 G promoter polymorphism and is regulated by a USF-1/2 binding site immediately preceding the polymorphic region. *J. Mol. Endocrinol* 2004, 32:155–163.
192. Ding Z, Pan J-Q: Distribution of PAI-1 promoter 4G/5G polymorphism in healthy Chinese and functional characterization using a luciferase reporter vector. *Ann. Hematol* 2005, 84:183–187.
193. Roncal C, Orbe J, Rodriguez JA, Belzunce M, Beloqui O, Diez J, Páramo JA: Influence of the 4G/5G PAI-1 genotype on angiotensin II-stimulated human endothelial cells and in patients with hypertension. *Cardiovasc. Res.* 2004, 63:176–185.
194. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A: Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18:20–26.
195. Chong NW, Codd V, Chan D, Samani NJ: Circadian clock genes cause activation of the human PAI-1 gene promoter with 4G/5G allelic preference. *FEBS Lett.* 2006, 580:4469–4472.
196. Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ: Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17:33–37.

197. Juhan-Vague I, Morange PE, Frere C, Aillaud MF, Alessi MC, Hawe E, Boquist S, Tornvall P, Yudkin JS, Tremoli E, Margaglione M, Di Minno G, Hamsten A, Humphries SE: The plasminogen activator inhibitor-1 -675 4G/5G genotype influences the risk of myocardial infarction associated with elevated plasma proinsulin and insulin concentrations in men from Europe: the HIFMECH study. *J. Thromb. Haemost.* 2003, 1:2322–2329.
198. Burzotta F, Di Castelnuovo A, Amore C, D’Orazio A, Di Bitondo R, Donati MB, Iacoviello L: 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatic PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb. Haemost.* 1998, 79:354–358.
199. Margaglione M, Cappucci G, d’Addeda M, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Mascolo G, Grandone E, Di Minno G: PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis: relation to environmental and genetic determinants. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18:562–567.
200. Ding J, Nicklas BJ, Fallin MD, De Rekeneire N, Kritchevsky SB, Pahor M, Rodondi N, Li R, Zmuda JM, Harris TB: Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphisms and haplotypes are associated with plasma plasminogen activator inhibitor type 1 levels but not with myocardial infarction or stroke. *Am. Heart J* 2006, 152:1109–1115.
201. Martínez-Calatrava MJ, Martínez-Larrad MT, Zabena C, González-Sánchez JL, Fernández-Pérez C, Serrano-Ríos M: The 4G/4G PAI-1 genotype is associated with elevated plasma PAI-1 levels regardless of variables of the metabolic syndrome and smoking status. A population-based study in Spanish population. *Diabetes Obes Metab* 2007, 9:134–135.
202. Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arveiler D, Ferrières J, Evans A, Amouyel P, Poirier O, Cambien F, Juhan-Vague I: Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene: lack of association between genotypes, PAI activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17:851–858.
203. Cesari M, Sartori MT, Patrassi GM, Vettore S, Rossi GP: Determinants of plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 : A study of normotensive twins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19:316–320.
204. Ma Z, Paek D, Oh CK: Plasminogen activator inhibitor-1 and asthma: role in the pathogenesis and molecular regulation. *Clin. Exp. Allergy* 2009, 39:1136–1144.
205. Bucková D, Izakovicová Hollá L, Vácha J: Polymorphism 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with IgE-mediated allergic diseases and asthma in the Czech population. *Allergy* 2002, 57:446–448.
206. Hermans PWM, Hazelzet JA: Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphism and sepsis. *Clin. Infect. Dis* 2005, 41 Suppl 7:S453–458.
207. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G: The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thrombosis Research* 2008, 122:736–742.
208. Hoekstra T, Geleijnse JM, Schouten EG, Kluft C: Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk. *Thromb. Haemost.* 2004, 91:861–872.
209. Collet JP, Montalescot G, Vicaud E, Ankri A, Walylo F, Lesty C, Choussat R, Beygui F, Borentain M, Vignolles N, Thomas D: Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality. *Circulation* 2003, 108:391–394.
210. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP: Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997, 95:59–62.
211. Ye Z, Liu EHC, Higgins JPT, Keavney BD, Lowe GDO, Collins R, Danesh J: Seven

- haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006, 367:651–658.
212. Sibbing D, Von Beckerath O, Von Beckerath N, Koch W, Mehilli J, Schwaiger M, Schömig A, Kastrati A: Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and efficacy of reperfusion therapy in acute myocardial infarction. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2005, 16:511–515.
213. Böttiger C, Koch W, Lahn C, Mehilli J, Von Beckerath N, Schömig A, Kastrati A: 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and risk of restenosis after coronary artery stenting. *Am. Heart J.* 2003, 146:855–861.
214. Corsetti JP, Ryan D, Moss AJ, Rainwater DL, Zareba W, Sparks CE: Plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism (4G/5G) predicts recurrence in nonhyperlipidemic postinfarction patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008, 28:548–554.
215. Juhan-Vague I, Alessi MC, Joly P, Thirion X, Vague P, Declerck PJ, Serradimigni A, Collen D: Plasma plasminogen activator inhibitor-1 in angina pectoris. Influence of plasma insulin and acute-phase response. *Arteriosclerosis* 1989, 9:362–367.
216. Henry M, Tregouët DA, Alessi MC, Aillaud MF, Visvikis S, Siest G, Tired L, Juhan-Vague I: Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations: a family study with part of the Stanislas Cohort. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18:84–91.
217. Al-Hamodi ZH, Saif-Ali R, Ismail IS, Ahmed KA, Muniandy S: Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with metabolic syndrome parameters in Malaysian subjects. *J Clin Biochem Nutr* 2012, 50:184–189.
218. Lopes C, Dina C, Durand E, Froguel P: PAI-1 polymorphisms modulate phenotypes associated with the metabolic syndrome in obese and diabetic Caucasian population. *Diabetologia* 2003, 46:1284–1290.
219. Viitanen L, Pihlajamäki J, Halonen P, Lehtonen M, Kareinen A, Lehto S, Laakso M: Association of angiotensin converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 promoter gene polymorphisms with features of the insulin resistance syndrome in patients with premature coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2001, 157:57–64.
220. Wiklund P-G, Nilsson L, Ardnor SN, Eriksson P, Johansson L, Stegmayr B, Hamsten A, Holmberg D, Asplund K: Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke: replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts. *Stroke* 2005, 36:1661–1665.
221. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluft C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG: 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke* 2003, 34:2822–2828.
222. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Tsiara CG, Kapsimali V, Travlou A, Vaiopoulos G: Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2007, 18:497–504.
223. Yeh P-S, Lin H-J, Li Y-H, Lin K-C, Cheng T-J, Chang C-Y, Ke D-S: Prognosis of young ischemic stroke in Taiwan: impact of prothrombotic genetic polymorphisms. *Thromb. Haemost.* 2004, 92:583–589.
224. Pruisen DMO, Rosendaal FR, Frijns CJM, Kappelle LJ, Vos HL, Algra A: Prothrombotic gene variation and new vascular events after cerebral ischemia of arterial origin. *J. Thromb. Haemost.* 2008, 6:1639–1644.
225. Nilsson IM, Ljungné H, Tengborn L: Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator or increased concentration of plasminogen activator inhibitor. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985, 290:1453–1456.
226. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir-Pajnic B, Stare J, Binder BR: The 4G/5G

- sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb. Haemost* 1998, 79:975–979.
227. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolami A, Patrassi GM: 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. *Thromb. Haemost*. 1998, 80:956–960.
228. Gohil R, Peck G, Sharma P: The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb. Haemost*. 2009, 102:360–370.
229. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Rapti E, Mantzios G, Kapsimali V, Travlou A: Association between the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and venous thrombosis. A meta-analysis. *Thromb. Haemost* 2007, 97:907–913.
230. Mansilha A, Araújo F, Severo M, Sampaio SM, Toledo T, Albuquerque R: Genetic polymorphisms and risk of recurrent deep venous thrombosis in young people: prospective cohort study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005, 30:545–549.
231. Bern MM, McCarthy N: Failure to lyse venous thrombi because of elevated plasminogen activator Inhibitor 1 (PAI-1) and 4G polymorphism of its promoter genome (The PAI-1/4G Syndrome). *Clin. Appl. Thromb. Hemost*. 2010, 16:574–578.
232. D'Amico M, Pasta L, Sammarco P: MTHFR C677TT, PAI1 4G-4G, V Leiden Q506, and prothrombin G20210A in hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *J. Thromb. Thrombolysis* 2009, 28:70–73.
233. Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Braza-Boils A, Gilabert J, Chirivella M, España F, Estellés A: Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4 G/5 G polymorphism and endometrial cancer. Influence of PAI-1 polymorphism on tissue PAI-1 antigen and mRNA expression and tumor severity. *Thromb. Res*. 2011.
234. Castelló R, España F, Vázquez C, Fuster C, Almenar SM, Aznar J, Estellés A: Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity. *Thromb. Res* 2006, 117:487–492.
235. Türkmen B, Schmitt M, Schmalfeldt B, Trommler P, Hell W, Creutzburg S, Graeff H, Magdolen V: Mutational analysis of the genes encoding urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in advanced ovarian cancer. *Electrophoresis* 1997, 18:686–689.
236. Bentov Y, Brown TJ, Akbari MR, Royer R, Risch H, Rosen B, McLaughlin J, Sun P, Zhang S, Narod SA, Casper RF: Polymorphic variation of genes in the fibrinolytic system and the risk of ovarian cancer. *PLoS ONE* 2009, 4:e5918.
237. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol* 1987, 155:335–350.
238. Margaglione M, Grandone E, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, d'Addeda M, Di Minno G: An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing. *Thromb. Haemost* 1997, 77:605–606.
239. Alvarez-Millán JJ, Bocos C, Ferrín V, Lucas AR, Ruibal A, Schneider J: PAI-1 promoter polymorphism modulates uPA-PAI complex accumulation by breast cancer cells. *Oncology* 2002, 62:286–290.
240. Smolarz B, Blasiak J, Kulig A, Romanowicz-Makowska H, Dziki A, Ulanska J, Pander B, Szewczyk T: Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) levels and gene promoter polymorphisms in subjects with colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2001, 20:247–252.
241. Palmirotta R, Guadagni F, Savonarola A, Ludovici G, Nesi G, Palli D, Falchetti M, Ottini L: PAI-1 4G/5G repeat is a target in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Dig Liver Dis* 2011, 43:454–458.

242. Palmirotta R, Ferroni P, Savonarola A, Martini F, Ciatti F, Laudisi A, Sini V, Del Monte G, Guadagni F, Roselli M: Prognostic value of pre-surgical plasma PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) levels in breast cancer. *Thromb. Res* 2009, 124:403–408.
243. Koh SCL, Razvi K, Chan YH, Narasimhan K, Ilancheran A, Low JJ, Choolani M: The association with age, human tissue kallikreins 6 and 10 and hemostatic markers for survival outcome from epithelial ovarian cancer. *Arch. Gynecol. Obstet* 2010.
244. Havrilesky LJ, Whitehead CM, Rubatt JM, Cheek RL, Groelke J, He Q, Malinowski DP, Fischer TJ, Berchuck A: Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecol. Oncol.* 2008, 110:374–382.
245. Błasiak J, Smolarz B: Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer. *Acta Biochim. Pol* 2000, 47:191–199.
246. Sternlicht MD, Dunning AM, Moore DH, Pharoah PDP, Ginzinger DG, Chin K, Gray JW, Waldman FM, Ponder BAJ, Werb Z: Prognostic value of PAI1 in invasive breast cancer: evidence that tumor-specific factors are more important than genetic variation in regulating PAI1 expression. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2006, 15:2107–2114.
247. Minisini AM, Fabbro D, Di Loreto C, Pestrin M, Russo S, Cardellino GG, Andretta C, Damante G, Puglisi F: Markers of the uPA system and common prognostic factors in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007, 128:112–117.
248. Lei H, Hemminki K, Johansson R, Altieri A, Enquist K, Henriksson R, Lenner P, Försti A: PAI-1 -675 4G/5G polymorphism as a prognostic biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* 2008, 109:165–175.
249. Castelló R, Landete JM, España F, Vázquez C, Fuster C, Almenar SM, Ramón LA, Radtke K-P, Estellés A: Expression of plasminogen activator inhibitors type 1 and type 3 and urokinase plasminogen activator protein and mRNA in breast cancer. *Thromb. Res.* 2007, 120:753–762.
250. Eroglu A, Ulu A, Cam R, Akar N: Plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism in patients with breast cancer. *J BUON* 2006, 11:481–484.
251. Sciacca FL, Ciusani E, Silvani A, Corsini E, Frigerio S, Pogliani S, Parati E, Croci D, Boiardi A, Salmaggi A: Genetic and plasma markers of venous thromboembolism in patients with high grade glioma. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10:1312–1317.
252. Ju H, Lim B, Kim M, Noh S-M, Kim WH, Ihm C, Choi BY, Kim YS, Kang C: SERPINE1 intron polymorphisms affecting gene expression are associated with diffuse-type gastric cancer susceptibility. *Cancer* 2010, 116:4248–4255.
253. Försti A, Lei H, Tavelin B, Enquist K, Palmqvist R, Altieri A, Hallmans G, Hemminki K, Lenner P: Polymorphisms in the genes of the urokinase plasminogen activation system in relation to colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2007, 18:1990–1994.
254. Loktionov A, Watson MA, Stebbings WSL, Speakman CTM, Bingham SA: Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism and colorectal cancer risk and prognosis. *Cancer Lett.* 2003, 189:189–196.
255. Vossen CY, Hoffmeister M, Chang-Claude JC, Rosendaal FR, Brenner H: Clotting factor gene polymorphisms and colorectal cancer risk. *J. Clin. Oncol.* 2011, 29:1722–1727.
256. Su C-K, Yeh K-T, Yeh C-B, Wang P-H, Ho ES-C, Chou M-C, Liu K-C, Yang S-F, Yi Y-C: Genetic polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 is associated with an increased risk of endometrial cancer. *J Surg Oncol* 2011, 104:755–759.
257. Divella R, Mazzocca A, Gadaleta C, Simone G, Paradiso A, Quaranta M, Daniele A: Influence of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (SERPINE1) 4G/5G Polymorphism on Circulating SERPINE-1 Antigen Expression in HCC Associated with Viral Infection. *Cancer Genomics Proteomics* 2012, 9:193–198.

258. Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Vylliotis A, Ries J, Nkenke E, Wiltfang J, Derka S, Vassiliou S, Springer I, Kessler P, Neukam FW: Plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism is associated with increased risk for oral cancer. *Oral Oncol.* 2006, 42:888–892.
259. Vairaktaris E, Serefoglou Z, Avgoustidis D, Yapijakis C, Critselis E, Vylliotis A, Spyridonidou S, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, Patsouris E: Gene polymorphisms related to angiogenesis, inflammation and thrombosis that influence risk for oral cancer. *Oral Oncol.* 2009, 45:247–253.
260. Weng C-J, Lin C-W, Chung T-T, Tsai C-M, Chen M-K, Yang S-F: Impact of uPA system gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors to carcinogenesis and the development of clinicopathology of oral cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2011, 18:805–812.
261. Li CF, Wei RY, Baliko F, Bapat B, Alman BA: An association between the 4G polymorphism in the PAI-1 promoter and the development of aggressive fibromatosis (desmoid tumor) in familial adenomatous polyposis patients. *Fam. Cancer* 2007, 6:89–95.
262. Jorgenson E, Deitcher SR, Cicek M, Liu X, Plummer S, Casey G, Witte JS: Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) polymorphism 4G/5G is associated with prostate cancer among men with a positive family history. *Prostate* 2007, 67:172–177.
263. Kurman RJ, Shih I-M: Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum. Pathol.* 2011, 42:918–931.
264. Speiser P, Mayerhofer K, Kucera E, Roch G, Mittelböck M, Gitsch G, Zeillinger R: pS2 and PAI-1 in ovarian cancer: correlation to pathohistological parameters. *Anticancer Res* 1997, 17:679–683.
265. Tecimer C, Doering DL, Goldsmith LJ, Meyer JS, Abdulhay G, Wittliff JL: Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor type 1 in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2000, 10:372–381.
266. Sałuda-Gorgul A, Pytel J, Olborski B, Greger J: Antigen levels of urokinase type plasminogen activator and its inhibitors in primary breast cancer. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 2002, 57:366–371.
267. Schneider J, Pollán M, Tejerina A, Sánchez J, Lucas AR: Accumulation of uPA-PAI-1 complexes inside the tumour cells is associated with axillary nodal invasion in progesterone-receptor-positive early breast cancer. *Br. J. Cancer* 2003, 88:96–101.
268. Leissner P, Verjat T, Bachelot T, Paye M, Krause A, Puisieux A, Mougin B: Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer* 2006, 6:216.
269. De Cremoux P, Grandin L, Diéras V, Savignoni A, Degeorges A, Salmon R, Bollet MA, Reyat F, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A, Sastre-Garau X, Magdelénat H, Mignot L, Fourquet A: Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor type 1 predict metastases in good prognosis breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2009, 29:1475–1482.
270. Runnebaum IB, Stickeler E: Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 2001, 127:73–79.
271. Luqmani YA, Temmim L, Parkar AH, Mathew M: Clinical implications of urokinase and tissue type plasminogen activators and their inhibitor (PAI-1) in breast cancer tissue. *Oncol. Rep.* 2002, 9:645–651.
272. Andres SA, Edwards AB, Wittliff JL: Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and inhibitor (PAI-1) in human breast carcinomas and their clinical relevance. *J. Clin. Lab. Anal.* 2012, 26:93–103.
273. Li H, Shinohara ET, Cai Q, Chen H, Courtney R, Cao C, Wang Z, Teng M, Zheng W, Lu

- B: Plasminogen activator inhibitor-1 promoter polymorphism is not associated with the aggressiveness of disease in prostate cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2006, 18:333–337.
274. Choi J-W, Lee J-H, Park HS, Kim Y-S: PAI-1 expression and its regulation by promoter 4G/5G polymorphism in clear cell renal cell carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 2011, 64:893–897.
275. Chi DS, Liao JB, Leon LF, Venkatraman ES, Hensley ML, Bhaskaran D, Hoskins WJ: Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2001, 82:532–537.
276. Dorn J, Schmitt M, Kates R, Schmalfeldt B, Kiechle M, Scorilas A, Diamandis EP, Harbeck N: Primary tumor levels of human tissue kallikreins affect surgical success and survival in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13:1742–1748.
277. Feldman GB, Knapp RC, Order SE, Hellman S: The role of lymphatic obstruction in the formation of ascites in a murine ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 1972, 32:1663–1666.
278. Stanojevic Z, Rancic G, Radic S, Potic-Zececic N, Djordjevic B, Markovic M, Todorovska I: Pathogenesis of malignant ascites in ovarian cancer patients. *Archive of oncology* 2004, 12:115–118.
279. Nishioka N, Matsuoka T, Yashiro M, Hirakawa K, Olden K, Roberts JD: Plasminogen activator inhibitor 1 RNAi suppresses gastric cancer metastasis in vivo. *Cancer Sci.* 2012, 103:228–232.
280. Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, Yancopoulos GD, Jaffe RB: Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9:5721–5728.
281. Scott-Coombes DM, Whawell SA, Vipond MN, Crnojevic L, Thompson JN: Fibrinolytic activity of ascites caused by alcoholic cirrhosis and peritoneal malignancy. *Gut* 1993, 34:1120–1122.
282. Makar AP, Baekelandt M, Tropé CG, Kristensen GB: The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 1995, 56:175–180.
283. Fox SB, Taylor M, Grøndahl-Hansen J, Kakolyris S, Gatter KC, Harris AL: Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer. *J. Pathol.* 2001, 195:236–243.
284. Wolff C, Malinowsky K, Berg D, Schragner K, Schuster T, Walch A, Bronger H, Höfler H, Becker K-F: Signalling networks associated with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissues: new insights from protein microarray analysis. *J. Pathol* 2011, 223:54–63.
285. Li H, Ye X, Mahanivong C, Bian D, Chun J, Huang S: Signaling mechanisms responsible for lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator expression in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2005, 280:10564–10571.
286. Eppenberger-Castori S, Moore DH Jr, Thor AD, Edgerton SM, Kueng W, Eppenberger U, Benz CC: Age-associated biomarker profiles of human breast cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002, 34:1318–1330.
287. Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H: Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc. Res.* 2005, 66:276–285.
288. Bonfigli AR, Sirolla C, Cenerelli S, Marra M, Boemi M, Franceschi C, Testa I, Mari D, Sacchi E, Testa R: Plasminogen activator inhibitor-1 plasma level increases with age in subjects with the 4G allele at position -675 in the promoter region. *Thromb. Haemost.* 2004, 92:1164–1165.

289. Jeyapalan JC, Sedivy JM: Cellular senescence and organismal aging. *Mech. Ageing Dev.* 2008, 129:467–474.
290. Martens JWM, Sieuwerts AM, Bolt-deVries J, Bosma PT, Swiggers SJJ, Klijn JGM, Foekens JA: Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression. *Thromb. Haemost.* 2003, 89:393–404.
291. Bladbjerg EM, Andersen-Ranberg K, De Maat MP, Kristensen SR, Jeune B, Gram J, Jespersen J: Longevity is independent of common variations in genes associated with cardiovascular risk. *Thromb. Haemost.* 1999, 82:1100–1105.
292. Lottermoser K, Düsing R, Ervens P, Koch B, Brüning T, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y: The plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism is not associated with longevity: a study in octogenarians. *J. Mol. Med.* 2001, 79:289–293.
293. Mannucci PM, Mari D, Merati G, Peyvandi F, Tagliabue L, Sacchi E, Taioli E, Sansoni P, Bertolini S, Franceschi C: Gene polymorphisms predicting high plasma levels of coagulation and fibrinolysis proteins. A study in centenarians. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17:755–759.
294. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noël A, Foidart J-M: The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J.* 2002, 16:147–154.
295. Lambert V, Munaut C, Carmeliet P, Gerard RD, Declerck PJ, Gils A, Claes C, Foidart J-M, Noël A, Rakic J-M: Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003, 44:2791–2797.
296. Soff GA, Sanderowitz J, Gately S, Verrusio E, Weiss I, Brem S, Kwaan HC: Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J. Clin. Invest.* 1995, 96:2593–2600.
297. Clark-Adams C, Norris D, Osley M, Fassler J, Winston F: Changes in histone gene dosage alter transcription in yeast. *Genes Dev.* 1988, 2:150–159.
298. Yang W, Cai K, Smedberg J, Smith E, Klein-Szanto A, Hamilton T, XU X: A reduction of cyclooxygenase 2 gene dosage counters the ovarian morphological aging and tumor phenotype in Wv mice. *Am. J. Pathol* 2007, 170:1325–1336.
299. Nishikawa A, Iwasaki M, Akutagawa N, Manase K, Yamashita S, Endo T, Kudo R: Expression of various matrix proteases and Ets family transcriptional factors in ovarian cancer cell lines: correlation to invasive potential. *Gynecol. Oncol.* 2000, 79:256–263.
300. Huober J, Von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, Belau A, Khandan F, Hauschild M, Thomssen C, Högel B, Darb-Esfahani S, Mehta K, Loibl S: Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010, 124:133–140.
301. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E: The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25:387–408.
302. Woolery KT, Kruk PA: Ovarian epithelial-stromal interactions: role of interleukins 1 and 6. *Obstet Gynecol Int* 2011, 2011:358493.
303. Duffy MJ: Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin. Chem.* 2002, 48:1194–1197.
304. Zhang X, Shu X-O, Cai Q, Ruan Z, Gao Y-T, Zheng W: Functional plasminogen activator inhibitor-1 gene variants and breast cancer survival. *Clin. Cancer Res* 2006, 12:6037–6042.

305. Yagmurdu MC, Atac FB, Tutar NU, Verdi H, Isiklar I, Ozdemir BH, Ozbek N, Karakayali H, Haberal M: Prognostic value of the PAI-1 4G/5G polymorphism in invasive ductal carcinoma of the breast. *Int Surg* 2008, 93:163–168.
306. De Haas EC, Zwart N, Meijer C, Suurmeijer AJH, Meijer K, Guchelaar H-J, Hoekstra HJ, Van Leeuwen FE, Sleijfer DT, Boezen HM, Gietema JA: Association of PAI-1 gene polymorphism with survival and chemotherapy-related vascular toxicity in testicular cancer. *Cancer* 2010, 116:5628–5636.
307. Whitley BR, Palmieri D, Twerdi CD, Church FC: Expression of active plasminogen activator inhibitor-1 reduces cell migration and invasion in breast and gynecological cancer cells. *Exp. Cell Res.* 2004, 296:151–162.
308. Hirashima Y, Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T: Transforming growth factor-beta1 produced by ovarian cancer cell line HRA stimulates attachment and invasion through an up-regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human peritoneal mesothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:26793–26802.
309. Alberti C, Pinciroli P, Valeri B, Ferri R, Ditto A, Umezawa K, Sensi M, Canevari S, Tomassetti A: Ligand-dependent EGFR activation induces the co-expression of IL-6 and PAI-1 via the NFkB pathway in advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 2011.
310. Komiyama S, Aoki D, Saitoh E, Komiyama M, Udagawa Y: Biological significance of plasminogen activator inhibitor-1 expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2011, 32:611–614.
311. Chambers SK, Gertz RE Jr, Ivins CM, Kacinski BM: The significance of urokinase- type plasminogen activator, its inhibitors, and its receptor in ascites of patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer* 1995, 75:1627–1633.
312. Brooks TD, Wang SW, Brünner N, Charlton PA: XR5967, a novel modulator of plasminogen activator inhibitor-1 activity, suppresses tumor cell invasion and angiogenesis in vitro. *Anticancer Drugs* 2004, 15:37–44.
313. Providence K, Higgins S, Mullen A, Battista A, Samarakoon R, Higgins C, Wilkins-Port C, Higgins P: SERPINE1 (PAI-1) is deposited into keratinocyte migration “trails” and required for optimal monolayer wound repair. *Arch Dermatol Res.* 2008, 300:303–310.
314. Knör S, Sato S, Huber T, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Schmitt M, Kessler H, Senekowitsch-Schmidtke R, Magdolen V, Seidl C: Development and evaluation of peptidic ligands targeting tumour-associated urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) for use in alpha-emitter therapy for disseminated ovarian cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2008, 35:53–64.
315. Ghamande SA, Silverman MH, Huh W, Behbakht K, Ball G, Cuasay L, Würtz SO, Brunner N, Gold MA: A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of clinical activity and safety of subcutaneous A6 in women with asymptomatic CA125 progression after first-line chemotherapy of epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008, 111:89–94.

8 Thesen

1. Der Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) hat durch Inhibition der Matrixdegradation durch Plasmin über Hemmung von uPA, durch Interaktion mit Vitronektin und durch Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden mittels Bindung an den uPA-uPAR-Komplex eine komplexe Funktion in der Zelladhäsion, Zellmigration, Metastasierung und Tumorangiogenese. PAI-1 reguliert zudem u. a. die Apoptose und die zelluläre Seneszenz.
2. Viele Studien zeigen PAI-1 als negativen prognostischen Faktor beim Ovarialkarzinom.
3. Der 4G/5G-Polymorphismus im PAI-1-Promotor beeinflusst die Transkription von PAI-1 und damit den PAI-1-Plasmalevel. Dabei zeigt das 4G-Allel eine höhere Transkriptionsaktivität als das 5G-Allel, entsprechend steigt der PAI-1-Plasmalevel mit der Zahl der 4G-Allele an ($5G/5G < 4G/5G < 4G/4G$).
4. Es ist unbekannt, ob der 4G/5G-Polymorphismus die PAI-1-Expression im Tumorgewebe von Ovarialkarzinomen beeinflusst.
5. Die vorliegende Untersuchung konnte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und der Chance, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, demonstrieren ($N_{\text{Patientinnen}} = 104$, $N_{\text{Kontrollen}} = 157$). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten von zwei anderen Untersuchungen. Tendenziell hatten jedoch Frauen mit dem heterozygoten 4G/5G-Genotyp eine leicht höhere Chance, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, als Frauen mit einem der beiden homozygoten Genotypen. Möglicherweise fördert also eine mittlere PAI-1-Dosis, wie sie vermutlich beim 4G/5G-Genotyp auftritt, die Entstehung eines Ovarialkarzinoms.
6. Es bestand keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem 4G/5G-Polymorphismus und dem histologischen Typ, dem FIGO-Stadium, dem Grading, dem Vorliegen von Aszites oder dem Alter bei Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms. Es zeigten sich unterschiedliche Tendenzen, die jedoch im subsignifikanten Bereich blieben.
7. Möglicherweise beeinflusst der 4G/5G-Polymorphismus durch die multiplen Funktionen von PAI-1 die Prognose des Ovarialkarzinoms je nach Stadium, Histologie, Grading oder Vorliegen von Aszites verschieden, bzw. begünstigt Faktoren wie Aszites-Entstehung oder Progression verschieden.

8. Im Gesamtkollektiv mit validen Follow-up-Daten und applizierter platinhaltiger Chemotherapie (N = 56) war der 4G/5G-Polymorphismus nicht statistisch signifikant mit der Prognose der Patientinnen assoziiert. Patientinnen mit dem 4G/5G-Genotyp hatten tendenziell das kürzeste rezidivfreie Überleben. Daher könnte man vermuten, dass speziell beim Ovarialkarzinom eine mittlere PAI-1-Menge am meisten die Tumorprogression fördert und sich negativ auf die Prognose auswirkt.
9. Für Patientinnen mit postoperativem Resttumor, mit Aszites oder mit G3-Tumor wirkte sich das 4G-Allel positiv auf die Prognose aus. Möglicherweise haben Patientinnen mit 4G-Allel einen höheren PAI-1-Level im Tumorgewebe und sprechen besser auf die Chemotherapie an. Dies könnte einen möglichen prognostischen Nachteil der hohen PAI-1-Expression überwiegen.
10. Patientinnen mit einem G1- oder G2-Tumor und mit 4G-Allel hatten ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben als Patientinnen mit einem G1- oder G2-Tumor ohne 4G-Allel. Möglicherweise hängt das 4G-Allel durch vermehrte PAI-1-Transkription mit einem aggressiveren Phänotyp des Ovarialkarzinoms bei G1- oder G2-Tumoren zusammen und beeinflusst so die Prognose negativ.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lena Marie Mohr
Geburtsdatum	14.05.1983
Geburtsort	Berlin
Adresse	Badener Ring 40b, 12101 Berlin
Telefon	0163/2191555
E-Mail	lena.mohr@gmx.net

Schulbildung

1989 – 1995	Riemeister-Grundschule, Berlin
1995 – 2002	Annette von Droste-Hülshoff-Gymnasium, Berlin Abitur 06/02, Note 2,0

Studium

2002 – 2003	Studium der Psychologie an der Technischen Universität Berlin
2003 – 2009	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Staatsexamen 11/09, Note 1,66
2006 – 2007	Auslandsstudium an der Universidad de Salamanca, Spanien

Praktisches Jahr

08/08 – 12/08	Neurologie, Universitätsklinikum Halle
12/08 – 03/09	Chirurgie, Universitätsklinikum Dresden
03/09 – 06/09	Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Dresden-Neustadt

Ärztliche Tätigkeit

07/10-12/11	Assistenzärztin für Neurologie, Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin (01/12-06/12 Sonderurlaub)
seit 02/13	Assistenzärztin für Psychiatrie, Vivantes Wenckebach-Klinikum, Berlin

Berlin, den 12.07.2013

Lena Marie Mohr

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit „Die Bedeutung des 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus beim Ovarialkarzinom“ selbständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Berlin, den 12.07.2013

Lena Marie Mohr

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit „Die Bedeutung des 4G/5G-PAI-1-Promotorpolymorphismus beim Ovarialkarzinom“ zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstmalig von mir eingereicht wird. Es liegen keine anderen Promotionsarbeiten zur Begutachtung an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder an einer anderen Universität vor.

Berlin, den 12.07.2013

Lena Marie Mohr

Danksagung

Ich danke vor allem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer, der mir diese Arbeit anvertraut hat. Seine äußerst kompetente, freundliche und stets geduldige Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die Atmosphäre in seinem Forschungslabor ist sehr angenehm und motivierend.

Auch möchte ich Frau Dr. rer. nat. Martina Vetter sehr danken, die mir viel bei Fragen zur Methode und bei der Durchführung der Versuche half.

Vielen herzlichen Dank an Herrn Oberarzt Dr. med. Hans-Georg Strauß für seine anhaltende Hilfsbereitschaft bei klinischen Fragestellungen und bei Fragen zur Krankengeschichte der Patientinnen.

Vielen Dank an Frau Dr. Unverzagt für die statistische Beratung.

Ich danke dem Institut für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg sehr für die Ovarzellinien.

Frau Angela Dittmer half mir ebenfalls sehr bei allen möglichen Gelegenheiten und hatte stets ein offenes Ohr – vielen Dank dafür. Auch bei den anderen medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors möchte ich mich herzlich für ihre Hilfe bedanken.

Frau Ute Benesch danke ich vielmals für ihre bereitwillige, freundliche und geduldige Unterstützung, ebenso den anderen Doktoranden im Labor für das bestärkende Miteinander.

Vielen Dank an meine Mutter, die stets voller Vertrauen in meine Fähigkeiten war und mich moralisch und finanziell unterstützt hat.

Ich danke meinem Vater, mit dem ich viele hilfreiche und klärende Gespräche über meine Arbeit hatte.

Ich danke meinem Freund Tobias sehr, der mir half Statistik zu verstehen und mich immer ermutigte, wieder an die Arbeit zu gehen.

Vielen Dank an meine Freundin Marrit. Unsere vielen Gespräche hielten mich aufrecht.

Außerdem danke ich auch allen nicht namentlich aufgeführten Personen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.