

Aus der Frauen- und Poliklinik mit Hebammenlehranstalt

Direktor: Prof. Dr. Drs. h.c. W. Schmidt

Universitätskliniken des Saarlandes

D – 66421 Homburg / Saar

**Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression
von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin in Endometrium-
und Ovarialkarzinom**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von:

Iris Fromberg

geboren am: 23.05.1978 in Neunkirchen/Saar

	<u>Seite</u>
1. Zusammenfassung	5
1.1. Deutsche Zusammenfassung	5
1.2. Summary	7
2. Einleitung	7
2.1. Endometrium-Karzinom	9
2.1.1. Epidemiologie	9
2.1.2. Alter	9
2.1.3. Risikofaktoren	9
2.1.4. Symptome	10
2.1.5. Diagnose	10
2.1.6. Metastasierung	10
2.1.7. Therapie	10
2.1.8. Prognose	11
2.1.9. Histopathologische Klassifikation	11
2.2. Ovarial-Karzinom	11
2.2.1. Epidemiologie	11
2.2.2. Alter	11
2.2.3. Risikofaktoren	12
2.2.4. Symptome	12
2.2.5. Diagnose	12
2.2.6. Metastasierung	13
2.2.7. Therapie	13
2.2.8. Prognosefaktoren	13
2.2.9. Histopathologische Klassifikation	14
2.2.9.1. Tumoren niedrig maligner Potenz	14
2.2.9.2. Karzinome mit eindeutiger Stromainvasion	14
2.3. Calpaine und Calpastatin	15
2.3.1. Historischer Überblick	15

2.3.1.1. Entdeckung	15
2.3.1.2. Nomenklatur	16
2.3.1.3. Klonierung	16
2.3.1.4. Aktivierung	16
2.3.2. Allgemeines	16
2.3.3. Molekülaufbau	17
2.3.4. Aktivierung	17
2.3.5. Vorkommen	19
2.3.6. Substrate	20
2.3.7. Krankheitsbilder / sonstiges Mitwirken	20
2.3.8. Rolle in der Onkologie	21
2.3.9. Zusammenspiel zwischen Calpain und Calpastatin	22
2.3.10. Weitere Calpain-Inhibitoren	23
2.4. Fragestellung	23

3. Material und Methoden 25

3.1. Untersuchungsgut	25
3.2. Enzyme und Primär-Antikörper	25
3.3. Sekundär-Antikörper	26
3.4. Lösungen	26
3.5. Streptavidin-Biotin-Methode	28
3.6. Objektträger-Beschichtung	28
3.7. Schnitthanfertigung	29
3.8. Immunhistochemische Färbung	29
3.9. HE-Färbung	31
3.10. Gewebe-Kontrollen	32
3.11. Immunreaktiver Score	32
3.12. Fotografieren	33
3.13. Statistik	33

4. Ergebnisse	34
4.1. Expression und Auswertung	34
4.1.1. Häufigkeitstabellen	34
4.2. Zusammenhang zwischen histopathologischen Daten der Tumoren und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	42
4.2.1. Endometrium-Karzinom	43
4.2.1.1. Zusammenhang zwischen Tumorstadium (pT) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	43
4.2.1.2. Zusammenhang zwischen Lymphknotenstatus (pN) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	43
4.2.1.3. Zusammenhang zwischen Grading (G) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	43
4.2.2. Ovarial-Karzinom	44
4.2.2.1. Zusammenhang zwischen Tumorstadium (pT) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	44
4.2.2.2. Zusammenhang zwischen Lymphknotenstatus (pN) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	44
4.2.2.3. Zusammenhang zwischen Grading (G) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	45
4.3. Vergleich der Enzym-Expression von normalem Gewebe mit Karzinom-Gewebe	47
4.3.1. Calpain 1	47
4.3.2. Calpain 2	47
4.3.3. Calpastatin	48
4.4. Zusammenhang zwischen den Expressionen von Calpain 1, 2 und Calpastatin	50
4.4.1. Zusammenhang zwischen der Expression von Calpain 1 und Calpain 2	50
4.4.2. Zusammenhang zwischen der Expression von Calpain 2 und Calpastatin	52
4.4.3. Zusammenhang zwischen der Expression von Calpain 1 und Calpastatin	53
4.5. Histologische Abbildungen	56
4.5.1 Endometrium-Karzinom und benignes Endometrium	56

4.5.2. Ovarial-Karzinom und benignes Ovar	58
5. Diskussion	60
5.1. Diskussion der Methodik	61
5.2. Diskussion der Ergebnisse	62
5.2.1. Zusammenhang zwischen histopathologischen Daten der Tumoren und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	62
5.2.1.1. Tumorstadium (pT)	62
5.2.1.2. Lymphknotenstatus (pN)	62
5.2.1.3. Grading (Malignitätsgrad)	63
5.2.2. Vergleich der Enzym-Expression von normalem Gewebe mit Karzinom-Gewebe	64
5.2.3. Zusammenhang zwischen den Expressionen von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin	66
6. Literaturverzeichnis	70
7. Abkürzungsverzeichnis	80
8. Danksagung	84
9. Lebenslauf	85

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Zusammenfassung

Calpaine, auch Calcium-aktivierte neutrale Proteasen (CAPN) genannt, kommen ubiquitär vor. Sie sind intrazelluläre nicht lysosomale zytoplasmatische Cystein-Endopeptidasen. Zu ihrer Aktivierung wird Calcium benötigt. Die zwei Haupt-Isoenzyme m-Calpain (auch Calpain 1 oder CAPN 1 genannt) und μ -Calpain (auch Calpain 2 oder CAPN 2 genannt) sind die am besten beschriebenen Enzyme unter ihnen. Ihr endogener spezifischer Inhibitor ist Calpastatin, welcher ebenfalls ubiquitär vorliegt und neben Calpain in der Zelle koexistiert. In Anwesenheit von Calcium kommt es zu einer Assoziation von Calpastatin und Calpain und die Protease wird gehemmt.

Das Calpain-System spielt bei einer Reihe von Vorgängen/Prozessen eine wichtige Rolle. Unter anderem wirkt es mit bei Apoptose, Nekrose, Ischämie-Bildung und Exozytose. Bei verschiedenen Erkrankungen wie z.B. M. Alzheimer, Diabetes mellitus oder Apoplex soll es ebenfalls mitwirken. In der Onkologie spielt es auch eine wichtige Rolle. So sind Calpain Substrate wie Protein-Kinase C, Tumorsuppressorproteine (p 53, ARHI) oder Integrin in die Pathogenese verschiedener Tumoren verwickelt. Es liegen bislang schon viele Untersuchungen über Calpaine in diversen Tumoren (Hauttumoren, Brustkrebs, Nierenkarzinom oder Prostatakarzinom) vor. Immer konnte eine Rolle der Calpaine bei Pathogenese oder einer weiteren Progression des Tumors beschrieben werden. Leider konnte noch keine genaue Funktion nachgewiesen werden.

Zu Endometrium- und Ovarialkarzinom liegen nach unserer Kenntnis bislang noch keine Studien hinsichtlich Calpaine vor.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Expression der Enzyme Calpain 1, Calpain 2 und dessen Inhibitor Calpastatin an normalem Endometriumgewebe, normalem Ovarialgewebe und malignem Endometrium- bzw. Ovarialgewebe. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten angefertigt und die Färbeintensität (SI), die Anzahl positiver Zellen (PP) und der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele et al. bestimmt. Es wurde nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der Expression dieser Enzyme in Karzinomen und histologischen Tumordaten gesucht und auch die Zusammenhänge der Expressionen zwischen malignem und benignem Gewebe evaluiert.

Ferner ist auf eine Korrelation der Enzyme untereinander in den verschiedenen Geweben hin untersucht worden.

Es wurden im malignen Ovar-Gewebe eine verminderte Expression sowie erniedrigte Färbeintensität und Immunreaktiver Score von Calpastatin gefunden. Mit höherem Malignitätsgrad des Ovarial-Karzinoms sank die Färbeintensität und der Immunreaktive Score von Calpain 1. Das Endometrium-Karzinom wies eine höhere Expression von Calpastatin als das benigne Gewebe auf. Die Färbeintensität von Calpain 2 sank mit einem höheren Lymphknotenstatus im Ovarial-Karzinom. Somit lassen sich definitive Unterschiede in den Expressionen unserer Enzyme in malignen und benignen Geweben nachweisen.

Eine genaue Funktion der Calpaine konnte in dieser Arbeit allerdings nicht definiert werden.

Da in der Literatur bisher noch so wenig beschrieben worden ist für Untersuchungen an Endometrium- und Ovarial-Karzinom hinsichtlich der Calpaine, sollten weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv unternommen werden.

1.2. Summary

Calpains, also called calcium activated neutral proteases (CAPN) are expressed ubiquitously. They are intracellular, non-lysosomal cytoplasmic cysteine endopeptidases. Calcium is required for their activation. The two major isoenzymes m-calpain (also called calpain 1 or CAPN 1) and μ -calpain (also called calpain 2 or CAPN 2) are the best described enzymes.

Their endogenous specific inhibitor is calpastatin, which is expressed ubiquitously and coexists within cells besides calpain. When calcium is present, calpastatin and calpain attach to each other inhibiting the protease.

The calpain system plays an important role in many processes including apoptosis, necrosis, ischemia formation and exocytosis.

There is also a wide range of calpain-associated diseases like diabetes mellitus, Alzheimer's disease or apoplex. It also plays a major role in oncology as well. Thus, calpain substrates like protein-kinase C, tumoursuppressorproteins (p53, ARHI) or integrin are involved in the pathogenesis of different tumours.

So far, there exist many reports on studies about the influence of calpains in different tumours (skin, breast, renal cell or prostate cancers).

The role of calpains in pathogenesis or further tumour progression has always been proven in related studies. However, their exact function could not be demonstrated.

So far, no studies on calpains being involved in the pathogenesis of endometrium and ovarian cancer have been published.

In our study we focused on the expression of the enzymes calpain 1, calpain 2 and its inhibitor calpastatin in normal endometrium tissue, normal ovarian tissue and malign endometrium and ovarian tissue, respectively. Therefore, we performed immunohistochemical stainings of paraffin slices and evaluated staining intensity (SI), percentage of positive cells (PP) and immunoreactive score (IRS) according to Remmele et al. We tried to find a possible correlation between the expression of these enzymes in carcinomas and the histological tumour data. In addition, we evaluated the correlation between enzyme expression in malign and benign ovarian and endometrial tissues. Furthermore, we tried to establish a potential correlation between the enzymes in the different tissues.

In malignant ovarian tissue, we found a decreased expression, staining intensity and immunoreactive score of calpastatin. With higher grading of the ovarian carcinoma, staining intensity and immunoreactive score of calpain 1 decreased. The endometrial carcinoma showed a higher expression of calpastatin than endometrial benign tissue. Staining intensity of

calpain 2 in ovarial carcinoma was decreased with increasing lymph node status. We clearly demonstrated differences between enzyme expressions in malign and benign tissue.

This study could not find any specific function of calpains. Only few studies in the literature have been found to deal with calpain evaluation of endometrium and ovarial cancer. Additional studies including more patients are required to further elucidate the functional role and impact of calpain in tumours.

2. Einleitung

2.1 Endometrium-Karzinom

(Syn.: Corpus-Karzinom, Carcinoma corporis uteri)

2.1.1 Epidemiologie

Das Endometrium-Karzinom des Uterus stellt die häufigste maligne Erkrankung des Genitaltraktes und die fünfthäufigste Krebserkrankung der Frau dar. Die Inzidenz liegt bei 24,7 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. [³⁵]

2.1.2. Alter

Das Endometrium-Karzinom des Uterus hat seinen Altersgipfel zwischen 65 und 70 Jahren. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren, das mediane Sterbealter bei 73 Jahren. [²⁶]

2.1.3. Risikofaktoren

Die kokarzinogene Wirkung von Östrogen gilt heute als gesichert. Somit ist ein langfristiger Östrogen-Einfluss (wie z.B. bei einer alleinigen Östrogen-Ersatztherapie oder einem östrogen-sezernierendem Tumor) ohne entsprechende Gestagen-Wirkung bei der Entstehung des Karzinoms bedeutsam. Bei Nullipara ist das Endometrium-Karzinom gehäuft anzutreffen (ganz im Gegensatz zu den Zervix-Karzinomen). Ebenfalls findet man ein gehäuftes Auftreten in Kombination mit einer reduzierten Glucose-Toleranz bis hin zum Diabetes mellitus, Adipositas, Hypertonie sowie im Zusammenhang mit hyperplastischen Veränderungen des Endometrium. Weitere endogene Risikofaktoren stellen frühe Menarche, späte Menopause und das polyzystische Ovarial-Syndrom (PCO) dar. Zigarettenrauchen hingegen vermindert das Endometrium-Karzinom-Risiko (mikrosomale Enzym-Induktion ⇒ Östrogen-Spiegel-Senkung) [⁸⁰].

2.1.4. Symptome

Im Frühstadium sind meist keine Symptome vorhanden. Später kommt es zu postmenopausalen Blutungen. Ebenso verdächtig sind Variationen der Intensität und Frequenz der Blutungen perimenopausaler Frauen. Ferner kann das Endometrium einen Fluor verursachen. Erst spät treten Schmerzen auf. [80]

2.1.5. Diagnose

Zur diagnostischen Abklärung gehören die gynäkologische Untersuchung, eine transvaginale Sonographie sowie eine fraktionierte Kürettage mit histologischer Untersuchung. Im Einzelfall ist eine Hysteroskopie nötig. Zur Feststellung der Tumorausdehnung im kleinen Becken und einer eventuellen Metastasierung kann eine Kernspintomographie, eine Computertomographie des Abdomen, eine Sonographie der Niere und der Leber, eine Zystographie, Rektoskopie, Röntgen-Thorax-Aufnahme und ein i.v.-Pyelogramm in Betracht gezogen werden.

So genannte Screening-Verfahren wie Zytologie oder transvaginale Sonographie sind lediglich für Hochrisikopatienten sinnvoll. [26]

2.1.6. Metastasierung

Die Metastasierung erfolgt relativ spät, wesentlich später als beim Zervix-Karzinom. Sie kann auf dem lymphogenen Weg stattfinden. Vor allem werden die paraaortalen und die Becken-Lymphknoten befallen. In 10 % ist auch das Ovar betroffen. Wenn die Metastasierung auf dem hämatogenen Weg erfolgt, so geschieht dies über den Cava-Typ (d.h. über Vena cava inferior) in die Organe Lunge, Leber, Skelettsystem und Gehirn. Ein kontinuierlicher Übergriff auf benachbarte Organe wie Zervix, Harnblase oder Mastdarm ist ebenfalls möglich.

2.1.7. Therapie

Als Therapie kommt eine stadienabhängige Operation in Frage (Hysterektomie und Ovarektomie, Lymphadenektomie, gegebenenfalls Entfernung eines Teils der Vagina). Eine

Strahlentherapie kann primär bei Inoperabilität oder postoperativ erfolgen. Die Ergebnisse einer adjuvanten systemischen Hormontherapie sind enttäuschend. [26]

2.1.8. Prognose

Die wichtigsten Prognosefaktoren sind vor allem die Invasionstiefe in das Myometrium und der Lymphknotenstatus. Morphologische Faktoren sind das Tumor-Stadium, der histologische Typ und der Differenzierungsgrad (Grading). Die 5-Jahres-Überlebensrate nach operativer Therapie liegt bei fast 75 %. Bei sekretorischen Sonderformen ist sie besser, bei klarzelligen, papillären Formen und den so genannten adenosquamösen Karzinomen eher schlechter. [26]

2.1.9. Histopathologische Klassifikation

In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um Adeno-Karzinome vom endometrialen Typ (> 80 %). Seltener hingegen sind das muzinöse Adeno-Karzinom, das klarzellige Adeno-Karzinom oder das seröse (serös-papilläre) Adeno-Karzinom. Ganz selten kommen die reinen Plattenepithel-Karzinome vor. [97,116]

2.2 Ovarial-Karzinom

2.2.1. Epidemiologie

Das Ovarial-Karzinom stellt die häufigste Todesursache durch ein Malignom bei Frauen dar. 5,4 % aller Malignom-Neuerkrankungen sind Ovarial-Karzinome. In den letzten Jahrzehnten konnte man eine konstante Zunahme feststellen.

2.2.2. Alter

Das mittlere Alter beträgt bei Diagnosestellung 58 Jahre. Die höchste Inzidenz liegt bei 65 – 85-jährigen Frauen. [35]

2.2.3. Risikofaktoren

‘ständige Ovulation’
Familiäre Belastung
Chemische Karzinogene (Spermizide, kosmetischer Talg)
Umwelt-, ernährungsbedingt (Fleisch, Fett)
Positive Korrelation zu Corpus-, Mamma-, Colon- und Rectum-Karzinom

Einen relativen Schutz stellen multiple Graviditäten, orale Kontrazeptiva, späte Menarche und eine frühe Menopause dar. [^{35,80}]

2.2.4. Symptome

Ovarial-Karzinome haben keine charakteristischen Frühsymptome. Relativ spät erst zeigen sich die ersten Symptome wie Zyklusanomalien, Dysmenorrhoe bzw. Blutungen in der Postmenopause. Im fortgeschrittenen Stadium ist mit abdominellen Schmerzen, Zunahme des Leibesumfangs, gastrointestinalen Beschwerden wie ein Wechsel zwischen Obstipation und Diarrhoe, Gewichtsabnahme und eine Beschleunigung der BSG zu rechnen. Allgemeinsymptome wie Appetitverlust und Müdigkeit kommen ebenfalls vor. [¹²⁹]

2.2.5. Diagnose

Wichtigste Vorsorgeuntersuchung stellt die sorgfältige gynäkologische Untersuchung zusammen mit einer exakten Anamnese dar. Unter den bildgebenden Verfahren hat die transvaginale Sonographie gegenüber der abdominellen Sonographie, der Kernspin- und der Computertomographie den höchsten Stellenwert. Mittels einer Farb-Dopplersonographie soll man zwischen benignem und malignem Tumor aufgrund der Durchflussgeschwindigkeit unterscheiden können. Das MRT macht eine Aussage über die Ausdehnung im kleinen Becken und eventuell über die Tumor-Differenzierung. Die Computertomographie gibt Aufschluss über eventuell befallene retroperitoneale Lymphknoten. Colo-, Zytoskopie, IVP und Irrigoskopie dienen der Beurteilung der Ausbreitung des Tumors. Weiterhin kommen die Laparoskopie oder auch Probelaparatomie zur Anwendung. Die Dignität kann letztendlich aber nur mit Hilfe histologischer Methoden bestimmt werden.

Zur Früherkennung kommt das Ultraschall-Screening (transvaginaler Ultraschall) zur Anwendung und ist vor allem bei postmenopausalen Frauen in Verbindung mit einer Bestimmung des Tumormarkers CA-125 sinnvoll. [^{35,80}]

2.2.6. Metastasierung

In erster Linie erfolgt sie intraabdominell und lymphogen in die regionären Lymphknoten. Die paraaortalen Lymphknoten sind etwas häufiger betroffen als die pelvinen Lymphknoten. An Organen werden der Darm, das Zwerchfell, die Milz und die Leber befallen. Fernmetastasierungen finden sich vor allem in Lunge und Leber. [⁸⁰]

2.2.7. Therapie

Therapeutisch kommen eine Operation mit zusätzlich histologischer Begutachtung und unter Umständen eine Zweit-OP mit Entfernung beider Adnexen und Hysterektomie in Frage. Gegebenenfalls ist eine adjuvante Therapie mit Zytostatika (wie z.B. Platin oder Paclitaxel) zu empfehlen. Eine Indikation zur Strahlen-Therapie besteht heute hinsichtlich der guten Erfolge bei der Chemo-Therapie nicht mehr. Patientinnen, die weitere Chemo-Therapien ablehnen, oder denen sie nicht mehr zumutbar ist, sollten einer endokrinen Therapie zugeführt werden (Gestagene, Tamoxifen, Androgene, Anti-Androgene, GnRH-Analoga). [⁸⁰]

2.2.8. Prognose-Faktoren

Tumorstadium (FIGO/TNM)
Differenzierungs-Grad
Größe des post-operativer Tumorrestes
Maligne Potenz des Tumors
Sensitivität auf Zytostatika und Resistenzentwicklung
Alter
Klinischer Allgemeinzustand

[⁸⁰]

2.2.9. Histopathologische Klassifikation

2.2.9.1. Tumore niedrig maligner Potenz (Borderline-Tumore, atypisch proliferierende Tumore)

Dies sind Karzinome mit niedrigem Malignitätspotential, welche noch nicht invasiv wachsen. In dieser Gruppe sind Gewebe- und Zelltypen nachweisbar. Es kommen eine gesteigerte Zellproliferation, vermehrter Mitosegehalt und eine gestörte Architektur vor. Histologisch charakteristisch ist ein mehrschichtiges Epithel mit geringen Kernatypien und vereinzelt Mitosen. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei 70-90 %. Extraovarielle peritoneale Absiedlungen können in 30-40 % der Fälle gefunden werden.

2.2.9.2. Karzinome mit eindeutiger Stromainvasion

Seröses Zystadeno-Karzinom (35-70 %)

Diese sind mit die häufigsten histologischen Typen der Ovarial-Karzinome. Sie können solide oder zystisch gebaut sein und kommen oft bilateral vor. Diese Karzinome bestehen meist aus einer oder mehreren Zysten mit serösem Inhalt, in welchen sich oft papilläre Wucherungen (papilläres Zystadeno-Karzinom) zeigen. Ebenso kommen diese Strukturen auch auf der Oberfläche vor (papilläres Oberflächen-Karzinom). Typisch ist das Vorkommen von Psammkörperchen in dem Tumor. Der Altersgipfel liegt in der 5. bis 6. Lebensdekade. Eine Metastasierung erfolgt vor allem kavitär ins Peritoneum. Weiterhin setzt der Tumor lymphogene, in seltenen Fällen auch hämatogene Metastasen.

Muzinöses Zystadeno-Karzinom (5-20 %)

In nur der Hälfte der Fälle werden beide Ovarien befallen. Histologisch werden die zystischen Formationen von einem atypischen, schleimbildenden Epithel ausgekleidet. Diese Karzinome wachsen vor allem in die umgebenden Gewebe ein und können eine beträchtliche Größe erreichen. Die Tendenz lymphogen zu metastasieren ist weit geringer als bei den serösen Ovarialkarzinomen.

Endometrioides Karzinom (5-30 %)

Sie entsprechen histologisch einem Endometriumkarzinom. Ihnen werden auch die Adeno-Sarkome, die mesodermalen (Müller)-Mischtumoren und die Stroma-Sarkome zugeordnet. Die Prognose ist weitaus besser als die der anderen Typen.

Klarzelliges Karzinom (5-10 %)

Betroffen sind vor allem Frauen in der 5. Lebensdekade. Häufig assoziiert sind diese Karzinome mit einer Endometriose (25-50 %) und entsprechenden Tumoren des Endometrium. Sie sind in nur 1 % doppelseitig. Charakteristisch sind trabekuläre, zystische oder papilläre Drüsenformationen, die aus hellen Epithelien aufgebaut sind. Typischerweise finden sich auch sog. 'Kragenknopfzellen'. [¹¹⁷]

2.3. Calpaine und Calpastatin

2.3.1. Historischer Überblick

2.3.1.1. Entdeckung:

1964 Guroff [³³]: Er entdeckt im Hirn von Ratten die Existenz einer cytosolischen, Calcium-Ionen abhängigen Protease mit einem Wirkoptimum bei neutralem pH-Wert. Es liegt ein essentieller Bedarf an Calcium-Ionen und SH-reduzierenden Agenzien vor.

1964 Meyer et al [⁶⁶].: Sie beschreiben einen „phosphorylase b kinase activating factor Ca-dependent“ (KAF).

1968 Huston, Krebs [³⁸]: Sie deklarieren die von Meyer et al. beschriebene KAF als eine Calcium-abhängige Protease und Z-Linien hydrolysierendes Enzym.

1972 Busch et al. [¹⁶]: Sie finden einen calciumaktivierbaren sarcoplasmatischen Faktor (CASF).

1977 Inoue et al. [⁴¹]: Sie entdecken einen Proteinkinase C-aktivierenden Faktor.

1978 Ishiura et al. [⁴²]: Ihnen ist es möglich, die CANP (Calcium-aktivierte neutrale Protease) bis zur Homogenität chromatographisch zu reinigen.

1978 Waxman et al., Nishiura et al. [^{74,128}]: Sie identifizieren als erste den endogenen Inhibitor der Calcium-abhängigen Protease.

2.3.1.2. Nomenklatur:

1981 Murachi [72]: Er benennt die Calcium-abhängige Protease Calpain (=Calcium-Ionen-abhängige, Papain-ähnliche Cystein-Protease) und deren endogener Inhibitor Calpastatin.

2.3.1.3. Klonierung:

1984 Ohno et al. [77]: Ihnen gelingt es, die cDNA der großen Untereinheit von Calpain zu klonieren.

1987 Emori et al. [27]: Sie klonieren erstmals das Protein Calpastatin.

2.3.1.4. Aktivierung:

1980 Mellgren [62]: Er kann zwei Enzyme mit einem unterschiedlichen Calcium-Bedarf isolieren: m-Calpain und μ -Calpain.

2.3.2. Allgemeines

Calpain 1 und Calpain 2 gehören zur Familie der Calpaine. Insgesamt sind bisher 15 verschiedene Calpaine beschrieben worden. Calpain steht für Calcium-abhängige Papain-ähnliche cytosolische Protease [72]. Sie gehören also zur Familie der Proteasen. Dies sind eiweißspaltende Enzyme. Ein Synonym für Calpain ist CAPN, welches für Abkürzung für calcium-activated neutral protease steht.

Die zwei Haupt-Isoenzyme m-Calpain (Synonym: Calpain 1 oder CAPN 1) und μ -Calpain (Synonym: Calpain 2 oder CAPN 2) sind wohl die am besten beschriebenen Enzyme unter den Calpainen. Sie kommen unter den Säugetieren ubiquitär (das heißt im gesamten Organismus) vor. Man konnte man sie in allen bisher untersuchten Geweben nachweisen. Sie liegen diffus im Zytoplasma der Zelle vor. In der aktivierten Form liegen sie aggregiert an der Plasmamembran vor [120].

Das pH-Optimum für die proteolytische Aktivität liegt bei 7,5 für μ -Calpain und 7,6 für m-Calpain [25]. Um aktiv zu werden, benötigen sie Calcium. Die beiden Calpaine unterscheiden sich in ihrer Calcium-Abhängigkeit. Der Calcium-Bedarf für die halbmaximale Aktivität des m-Calpain liegt im millimolar-Bereich, der des μ -Calpain im mikromolar-Bereich [62]. 1998 wird dies für m-Calpain auf 200-1000 μ M und für μ -Calpain auf 5-50 μ M festgelegt [109].

Calpastatin ist ein endogener spezifischer Inhibitor der Calpaine. Es ist ebenso wie Calpain ubiquitär verbreitet und kommt im Zytoplasma vor. Im inaktiven Zustand befindet es sich gebunden an Granula, im aktivierten Zustand diffus im Zytoplasma gelöst [120].

2.3.3. Molekülaufbau

Nur einige der Calpaine sind Heterodimere; die Mehrheit der Calpaine besteht allein aus einer großen Untereinheit. Calpain 1 und 2 sind Heterodimere mit einer Molekülmasse von 110 kD. In der SDS-Elektrophorese kann man zeigen, dass sie aus einer großen Untereinheit (CL = chain large) von 80 kD (so genannte katalytische Untereinheit) und einer kleinen Untereinheit (CS = chain small) von 30 kD (so genannte regulatorische Untereinheit) bestehen [62]. Im Vergleich zwischen m- und μ - Calpain sind die kleinen Untereinheiten identisch, wohingegen die großen Untereinheiten sich unterscheiden. Der unterschiedliche Aufbau der großen Untereinheiten wird für die verschiedene Enzym-Spezifität von Calpain 1 und 2 verantwortlich gemacht.

Die große Untereinheit besteht aus vier Domänen (I, II, III, IV), die kleine aus zwei (IV': C-terminal, V: N-terminal). Die Funktion der Domäne I ist noch nicht genau geklärt. Sie soll zusammen mit Domäne V an der Autolyse beteiligt sein. Die Domäne II (papain-ähnlich) entspricht einer Cystein-Protease. Sie enthält 4 calcium-bindende Regionen, so genannte 'EF-hand' Strukturen. Die Domäne III stellt das Bindeglied zwischen der katalytischen und der Domäne IV dar. Die Domänen IV und IV' (ähnelt der Domäne IV), welche die Calpain-Aktivität regulieren sollen, enthalten jeweils EF-hand-Strukturen: EF2 bis EF5 [13,52]. Weiterhin wurden zwei andere EF-hand-Strukturen [4,114] gefunden. EF1 liegt N-terminal zu EF2. EF6 [4] befindet sich an der Grenze zwischen Domäne II und III. Die Domäne V besteht aus einer Gruppe von Glycinen. Sie ist hydrophob und soll mit Membranen und Membranverbundenen Proteinen hydrophobe Wechselwirkungen eingehen.

Die beiden Untereinheiten sind durch die Calcium-bindenden Domänen (IV und IV') miteinander verbunden, zumindest in Abwesenheit von Calcium.

2.3.4. Aktivierung

M- und μ -Calpain liegen in ruhenden Zellen normal als inaktive Proenzyme (80 kDa-29 kDa) vor [81]. Die Aktivierung von Calpain ist assoziiert mit einer autoproteolytischen Umänderung der N-Termini der 80 kDa katalytischen und 30 kDa regulatorischen Untereinheit [19]. Eine Autolyse der kleinen Untereinheit (18 kDa) Calpains hat keinen Einfluss auf den Calcium-Bedarf. Dahingegen bewirkt die Autolyse der großen Untereinheit eine Herabsetzung des Bedarfs [89]. Die dissoziierte große Untereinheit (78 kDa) behält ihre volle enzymatische Aktivität [2,133,134]. Zur Aktivierung der Calpaine werden Calcium-Ionen benötigt. Es existiert

allerdings eine Diskrepanz zwischen der *in vitro* und *in vivo* gemessenen Konzentration an Calcium-Ionen, die für die halb-maximale Aktivität der Calpaine benötigt werden. So wird *in vitro* eine höhere Konzentration an Calcium-Ionen benötigt als sie *in vivo* zytosolisch auch wirklich verfügbar ist. Daraus hat man geschlossen, dass der Calcium-Bedarf der Calpain herabgesetzt bzw. ihre Calcium-Sensitivität erhöht werden kann.

Ein Modell zur Calpain-Aktivierung zeigt eine Calcium-abhängige Enzym-Translokation vom Zytosol zur Membran hin in die Nähe einiger Substrate (Membran-Phospholipide) [90]. Durch Interaktion mit Phospholipiden [6] kommt es zu einer Herabsetzung der Calcium-Konzentration, die für die Autolyse benötigt wird.

Ein Modell der Calpain-Kaskade geht davon aus, dass μ -Calpain die limitierte Proteolyse von m-Calpain in einer intermolekularen Reaktion katalysiert. Dieser Schritt soll begleitet sein von einer Aktivierung des m-Calpains [115]. Weiterhin sind spezifische Aktivatoren für μ - [64] und m-Calpain [68] beschrieben.

Die *in-situ*-Aktivität ist reguliert durch den Level und die zelluläre Verteilung der Enzyme und ihrem spezifischen Inhibitor Calpastatin [51].

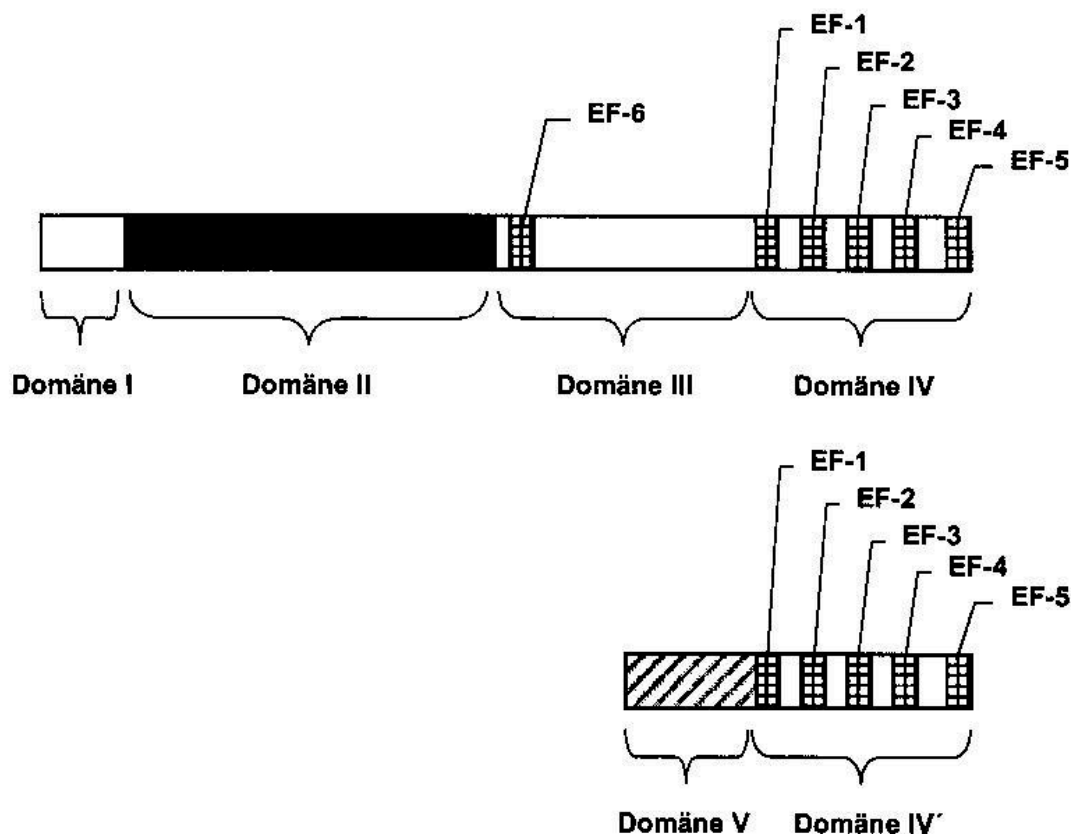


Abbildung 1: Struktur der Calpain-Untereinheiten nach Sorimachi et al. [104]

Oben: große Untereinheit

Unten: kleine Untereinheit

Calpastatin hat eine Molekularmasse von 110-130 kD, liegt im Zytosol vor und ist ebenso wie Calpain 1 und 2 ubiquitär [63] verbreitet. Die primäre Struktur besteht aus 4 inhibitorischen C-terminalen Domänen und einer N-terminalen Domäne (Domäne L), der die inhibitorische Funktion fehlt [34,125]. Die Funktion der Domäne L ist noch nicht ganz klar. Es wird angenommen, dass sie in der Regulation des Calcium-Ionen-Kanals eine Rolle spielt [34]. Innerhalb jeder Domäne gibt es drei Subdomänen: A, B und C. Sie sollen α -Helices formen.

2.3.5. Vorkommen

Ubiquitäre Calpaine:

Calpain 1
Calpain 2
Calpain 4
Calpain 7
Calpain 14
Calpain 15

Weiterhin kommen nicht-ubiquitäre, so genannte organspezifische Calpaine vor wie [104]:

Calpain 3	Skelett-Muskel [102]
Calpain 5	Testes, Gehirn
Calpain 6 (Calpamodulin)	Plazenta
Calpain 8	Magen [103]
Calpain 9	Verdauungstrakt
Calpain 10	Augenlinse [55-57]
Calpain 11	Testes
Calpain 12	Follikel
Calpain 13	Testes, Lunge

Calpaine kommen in allen Mammalia (=Säugetiere) und Avia (=Vögel) vor. 'Atypische' Homologe enthalten neben einer Papain-ähnlichen katalytischen Domäne noch andere Domänen. Dafür fehlen ihnen wiederum andere Calpain-Domänen einschließlich der

Calcium-bindenden Domäne. Sie kommen in niedrigeren Organismen vor wie in Insekten (z.B. Dm-Calpain bzw. Calpain A in *Drosophila*), Nematoden (z.B.: Tra-3 in *Caenorhabditis elegans*), Pilzen (z.B. Pa1B in *Aspergillus nidulans*) und Hefen. In Pflanzen und Procaryoten (=Bakterien, Viren, Blaualgen, Rickettsien) sind sie nicht aufzufinden [104].

2.3.6. Substrate

Calpaine sind intrazelluläre, zytosolische Zystein-Proteasen. Die Calpain-katalysierte Proteolyse führt eher zu einer Änderung als zu einer Destruktion der Struktur und Funktion des Substrat-Proteins [89,109]. Die Substrate werden in limitierte Fragmente gespalten [126]. Calpaine sind an vielen wichtigen zellulären Funktionen beteiligt. So zum Beispiel katalysieren sie die Proteolyse von Proteinen, welche in Signalübermittlung, Zell-Zyklus-Regulation, Apoptose, Nekrose, embryonale Entwicklung und der Zytoskelet-Umbildung beteiligt sind [17,79,123]. M- und μ -Calpain haben die gleiche Substrat-Spezifität; bislang konnte noch kein Unterschied gefunden werden. Als Standard-Testsubstrat verwendet man Casein [33]. Bei der Umsetzung von Profilaggrin zu Filaggrin ist Calpain 1 beteiligt [86,130]. Weitere Substrate der Calpaine sind Proteinkinase C [47,48,54], Cadherin [96], Keratin [3], Aktin [132], Vimentin [132], Calponin [20,24] pro-Caspase 3 und PARP [61], Neuropeptide, Dystrophin [24], α -Fodrin [73], Rhodopsin [78], Histon [92], Tumorsupressor-Protein p53 [32] Tau [53] und Zytoskelettproteine [110] wie Troponin und Tropomyosin (und viele mehr).

2.3.7. Krankheitsbilder / sonstiges Mitwirken

Calpaine spielen bei vielen Krankheitsbildern eine Rolle, wie zum Beispiel bei:

Alzheimer [75,76,91]

M. Parkinson [71,121]

Rheumatoide Arthritis [65,111]

Epilepsie [12,101]

Glieder-Gürtel-Dystrophie Typ 2a [87,105]

Duchenne'sche Muskeldystrophie [106]

Multiple Sklerose [23]

Cataract [22,83]

Myocardinfarkt [14]

Ichtyosis [1,67]

Ischämischer Apoplex [^{10,37,98}]

Diabetes mellitus Typ 2 [^{36,37}]

Essentielle Hypertonie [⁹³]

Wie schon aus der Art der Substrate erkennbar, wirken sie bei folgenden Vorgängen mit:

Apoptose [^{95,107,108}]

Nekrose

Exozytose [⁹⁶]

Integrin-vermittelte Signal-Vermittlung [^{29,40,96}]

Keratinocyten-Differenzierung [^{30,96}]

Gedächtnis-Bildung [^{96,118}]

Ischämie [⁹⁹]

2.3.8. Rolle in der Onkologie

Viele Substrate von Calpain wie Protein-Kinase C, Integrin, das Tumorsuppressorprotein p53, Talin, Filamin und Cadherin sind in die Pathogenese verschiedener Tumoren verwickelt. Das Tumorsuppressorprotein NF2 zum Beispiel, ein Substrat von Calpain, liegt in den meisten Schwannomen und Meningeomen mutiert vor [⁴⁵]. Somit wird angenommen, dass Calpain eine wichtige regulatorische Rolle in malignen Prozessen spielt.

In Zusammenhang mit dem Prostata-Karzinom sollen Calpain-Inhibitoren eine Apoptose in den Prostata-Adeno-Karzinom-Zellen induzieren [¹³⁵]. Beim Leberzell-Karzinom kann es zu einer Resistenz der Karzinom-Zellen gegen Anoxie kommen, wenn die Phospholipase-gesteuerte Calpain-Aktivität verhindert wird [^{5,135}]. In Nierenzell-Karzinomen mit peripherer Lymphknoten-Metastasierung liegt die Calpain 1-Expression signifikant höher als in solchen, die noch nicht metastasiert sind. Des weiteren wurde eine Korrelation von erniedrigter Calpain 1-Expression mit zunehmender Malignität nachgewiesen. Dies spricht also für einen Zusammenhang mit dem Wachstum und der Malignität des Tumors [^{5,15,135}]. Eine andere Studie konnte zeigen, dass in Ovarial- und in Mamma-Karzinomen eine Reexpression von ARHI, einem mutmaßlichem Tumor-Supressor-Gen, auf einem Calpain-abhängigen Weg geschehen kann. Dies führt zur Apoptose sowie einem verminderten Wachstum und Invasivität der Tumorzellen. Oft findet man eine verminderte Expression von ARHI in oben genannten Tumoren [⁹]. In malignen Melanomen sind Calpain 1 und 2 ebenfalls an der Apoptose beteiligt, hier auf einem Vitamin-D-induzierten Weg [⁸⁴]. Ebenfalls Vitamin-D-

induziert ist der apoptose-ähnliche Zelltod in Mammakarzinomen, welcher über Calpaine vermittelt wird [60]. Eine weitere Rolle spielen Calpaine bei Hirntumoren (Meningeome/Schwannome [45,46], Glioblastoma multiforme [46,82], Neuroblastomen [11]), Hauttumoren (Basalzellkarzinomen, Squamous cell carcinoma (SCC) [85]) und bei Leukämie [107].

Calpain-Inhibitor I wirkt stabilisierend auf das Tumorsuppressor-Gen p53 [32,50] und kann somit Apoptose in Tumorzelllinien induzieren [7]. Die Calpain-Inhibitoren I und II steigern den Level von endogenem p53 in MCF-7 (Brustkrebs) und RKO (Colon-Karzinom) Zellen [45].

Ein möglicher Weg zur Behandlung von pathologischer Zell-Migration wie Tumor-Metastasierung soll der Einsatz von Calpain-Inhibitoren darstellen. Man hofft, mittels der Beeinflussung des Calpain-Systems die Progression sowie die Metastasierung von Tumoren beeinflussen zu können [39]. Calpain-Inhibitoren werden im allgemeinen als apoptose-hemmend eingestuft [88,127]. Calpaine selbst sind wie oben bereits gezeigt an der Apoptose hinreichend beteiligt. Apoptose kann zur Entstehung von Karzinomen oder anderen Erkrankungen führen.

2.3.9. Zusammenspiel zwischen Calpain und Calpastatin

Calpastatin koexistiert neben Calpain in den Zellen. Dies bedeutet, dass in Zellen, in denen Calpain enthalten ist, auch immer Calpastatin vorhanden ist [21]. Calpastatin ist ein Protein, das spezifisch an Calpain (und sonst an keine anderen Zystein-Proteasen) bindet und dessen Proteinase-Aktivität hemmt. Es stellt somit den endogenen Inhibitor von Calpain dar. Calpastatin inaktiviert Calpain vollständig bei einem molaren Verhältnis von Calpastatin : Calpain $\approx 1 : 4$. Ältere Studien gingen dabei von einer nicht-kompetitiven Hemmung aus [18,100]. Jüngere Studien zeigten allerdings eine kompetitive Hemmung [43,59]. Dabei bindet die Subdomäne A von Calpastatin an die Domäne IV der katalytischen Untereinheit von Calpain und die Subdomäne C bindet an die Domäne IV der regulatorischen Einheit von Calpain [58,112,131]. Obwohl weder Subdomäne A noch C direkt die Calpain-Aktivität hemmen, führen sie dennoch zu einer Potenzierung der inhibitorischen Fähigkeit von Calpastatin, indem sie die feste Bindung zu Calpain unterstützen [58,69,112,131].

Calpastatin kann nicht nur die proteolytische Aktivität von Calpain, sondern auch eine Bindung an die Zellmembran hemmen [44]. Die Interaktion zwischen den beiden Enzymen wird durch Calcium-Ionen reguliert und ist vollkommen reversibel.

Die in-situ-Aktivität ist reguliert durch den Level und die zelluläre Verteilung der Enzyme und ihrem spezifischen Inhibitor Calpastatin [51]. Die Expression von Calpastatin wird über dessen Vorliegen im Zytosol reguliert. Liegt zu wenig vor, kommt es zu einer gesteigerten Expression. Umgekehrt wird es auch vermehrt exprimiert, wenn ein höherer Verbrauch vorliegt [8]. So kommt es beispielsweise bei einer stärker und länger anhaltenden Erhöhung des Calciums zu einer Calpain-Aktivierung, welches eine Degradation von Calpastatin vermittelt [120].

2.3.10. Weitere Calpain-Inhibitoren

Neben Calpastatin existieren noch andere Inhibitoren für Calpain wie z.B. Calpain-Inhibitor I (N-acetyl-Leu-Leu-norleucin) und II (N-acetyl-Leu-Leu-methionin) [122]. Diese beiden Inhibitoren hemmen allerdings ebenso Proteasomen und andere Cystein-Proteinasen [28,119]. PD150606 hat eine sehr hohe Spezifität für Calpaine hinsichtlich anderer Proteinasen. Es bindet an die Calcium-bindende Domäne von Calpain und hemmt so die Calpastatin-Bindung [124] ebenso wie die Zystatin-Domäne von Kininogen [94] und viele mehr [122]. Alle anderen beschriebenen Inhibitoren binden an die aktive Seite. E-64 [113] und Leupeptin, ein Gärungsprodukt aus *Actinomyces* [49] sind ebenfalls Inhibitoren von m- und μ -Calpain. Beide hemmen auch andere Zystein-Proteasen, Leupeptin sowie Proteasomen.

2.4. Fragestellung

Inhalt der Arbeit ist es, die Expression der Enzyme Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin anhand immunhistochemischer Färbungen in den Geweben Ovarial-Karzinom, Endometrium-Karzinom und den zugehörigen benignen Geweben zu untersuchen. Wir versuchten herauszufinden, ob es überhaupt möglich ist, die Enzyme in den Gewebeschnitten darzustellen.

Auf eine mögliche Korrelation der histologischen Tumordaten wie Tumorstadium (pT), Metastasierungsgrad (pN) und Malignitätsgrad (G) von Endometrium- und Ovarialkarzinome mit der Expression unserer Enzyme hin wurde untersucht. Des Weiteren wurde die Enzym-Expression untereinander in den verschiedenen Gewebearten verglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsgut

Die untersuchten Gewebeproben bestehen aus 29 Endometrium- und 21 Ovarialkarzinomen. Von dem normalen (das heißt nicht karzinomatösen) Gewebe wurden 18 Endometrium- und 15 Ovarialproben ausgewählt. Das Gewebe ist in Paraffin zu Blöcken eingebettet.

Gewonnen wurde es intraoperativ in der Universitätsfrauenklinik Homburg. Die Paraffinblöcke sind in dem Institut für Pathologie (alle Blöcke ab dem Jahr 1990) und der Frauen- und Poliklinik der Universitätskliniken des Saarlandes (Blöcke bis zum Jahr 1990) aufbewahrt. Ebenfalls dort befinden sich auch die zugehörigen HE-Schnitte.

Durch Nachschlagen in den Histologie-Berichten wurden die gewünschten Präparate ausgesucht. Dank der Hilfe von Frau PD Dr. Dohmen (Pathologie) wurde eine weitere Auswahl durch mikroskopisches Beurteilen der HE-Schnitte getroffen. Ausschlusskriterien waren z.B. zu große Gewebestücke, zu viel Einblutungen sowie nekrotisches Material.

3.2. Enzyme und Primär-Antikörper

Calpain 1 (μ -Calpain) large subunit

⇒Maus-Anti-Calpain 1 (μ -Calpain)

Monoclonaler Antikörper

Verdünnung: 1 : 100

Calpain 2 (m-Calpain) large subunit

⇒Kaninchen-Anti-Calpain 2 (m-Calpain) large subunit

Polyclonaler Antikörper

Verdünnung: 1 : 200

Calpastatin

⇒Maus-Anti-Calpastatin

Monoclonaler Antikörper

Verdünnung: 1 : 200

Zur Darstellung von Calpain 1 und Calpastatin werden monoklonale Antikörper verwendet. Diese werden aus Aszitesflüssigkeit von Mäusen gewonnen.

Im Gegensatz dazu wird Calpain 2 mit polyklonalen Antikörpern dargestellt, welches aus Antiserum von Kaninchen gewonnen wird.

∅ Die Antikörper werden in einer Solution aus Tris-Triton-Puffer und FG in dem jeweils angegebenen Verhältnis verdünnt.

Alle Antikörper wurden von der Firma Chemicon International, Temecula CA 92590, USA bezogen.

3.3. Sekundär-Antikörper

- biotinylierter Sekundär-Antikörper Kaninchen anti Maus von Dako., Nr. E0413
- biotinylierter Sekundär-Antikörper Ziege anti Kaninchen von Dako., Nr. E0432

Wenn der Primär-Antikörper vom Kaninchen stammt (wie der verwendete Antikörper Anti-Calpain 2), muss ein Sekundär-Antikörper von einem anderen Tier verwendet werden (wie hier z.B. von der Ziege), der gegen das erste Tier gerichtet ist. Ansonsten kommt es zu unspezifischen Hintergrundreaktionen.

Anti-Calpastatin und Anti-Calpain 1 stammen beide von der Maus. Deswegen wird ein Kaninchen-Sekundär-Antikörper genommen.

∅ Die Antikörper werden in einer Solution aus Tris-Triton-Puffer und FG in dem jeweils angegebenen Verhältnis verdünnt.

3.4. Lösungen

Tris-Puffer:

4,5 l Aqua dest. + 8 Tabletten NaCl zu je 9 g

sobald die Tabletten aufgelöst sind, gibt man 500 ml der Pufferstammlösung hinzu (pH=7,35)

3. Material und Methoden

Puffer-Stamm-Lösung:

230 g TRIZMA-HCl
+ 23,4 g TRIZMA-Base
+ 2 l Aqua dest.

Tris / FG (Fischgelatine) :

Verdünnung 1 : 10
⇒ 2 ml FG + 18 ml Tris-Puffer

Tris / Triton:

45 ml Tris-Puffer + 1 Spitze Triton

DAB- Konzentrat (3,3 Diaminobenzidin):

- Grundlösung

{	9 ml Aqua dest. + 1 ml DAB-Buffer-Konzentrat ES010 + 200 µl H ₂ O ₂ (1%)
---	--

(Glasröhrchen benutzen, da DAB Kunststoff auflöst)

- Grundlösung wird 1 : 50 verdünnt mit ES005
(z.B. wird von 5 ml der Grundlösung 100 µl entnommen und verworfen; diese werden dann durch 100 µl von DAB ES005 ersetzt)
- Filtrieren der Lösung
(☠ Achtung kanzerogen ⇒ Handschuhe anziehen)

Stammlösung A:

0,1 molare Zitronensäure: 21,01g C₆H₈O₇ x H₂O in 1000 ml Aqua dest., Merck # 244

Stammlösung B:

0,1 molares Natriumcitrat: 29,41g C₆H₅Na₃O₇ x 2H₂O in 1000 ml Aqua dest., Merck # 6448

Citratpuffer:

Stammlösung A und B werden im Verhältnis 1 : 5 gemischt und mit Aqua dest. aufgefüllt, so dass ein Mischungsverhältnis von 1 (A+B) : 10 entsteht, pH soll 6 sein

d.h. 5 ml A + 20 ml B = 25 ml A + B

25 ml (A + B) + 225 ml Aqua dest.

Mayer's Hämalun:

Hämatoxylin 1 : 4 mit Aqua dest. verdünnt

dient der Kerngegenfärbung

3.5. Streptavidin-Biotin-Methode

Diese Methode beruht auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Streptavidin, das Vitamin Biotin stark an sich zu binden. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin.

Benötigt werden für diese Methode verschiedene Reagenzien:

1. Primär-Antikörper: Er ist spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet.
2. Biotinylierter Sekundär-Antikörper: Das Biotin ist kovalent an den Sekundär-Antikörper gebunden. Der Sekundär-Antikörper wiederum bindet an der Primär-Antikörper.
3. Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Streptavidin: Es bindet an das Biotin des Sekundär-Antikörpers.
4. DAB: Das Chromogen ist geeignet, um das Enzym Peroxidase und somit das gesuchte Antigen sichtbar zu machen.

Die überaus starke Affinität von Streptavidin gegenüber Biotin verschafft der Streptavidin-Biotin-Methode eine sehr hohe Sensitivität.

3.6. Objektträger-Beschichtung

Die Objektträger werden doppelt beschichtet um ein Abschwimmen des Gewebes zu verhindern.

Beschichtungsgemisch:

Das Reagenz von Merck (Fläschchen zu 100 ml): 3-(Triethoxisilyl)-Propylamin wird 10 %ig in Aceton verdünnt. Das heißt, ein Fläschchen wird mit 900 ml Aceton zu 1 l aufgefüllt. In eine Küvette passen etwas 200 ml. Somit reicht das Gemisch für 5 Küvetten aus. Die Objektträger werden in Ständer einsortiert und für fünf Minuten in das Beschichtungsgemisch gestellt. Pro 200 ml Ansatz können etwa 60 Objektträger beschichtet werden, dann ist die Lösung aufgebraucht.

Danach werden die Objektträger 2 x in Aceton gespült und 2 x in Aqua dest. gespült.

Nun müssen sie 2 Tage im Wärmeschrank bei 37 ° C trocknen.

Da die Schnitte später in der Mikrowelle vorbehandelt werden, empfiehlt sich eine Doppelbeschichtung. Hierzu werden die Objektträger mit einem Ansatz aus Hühnereiweiß (250 mg (kristalline Form) gelöst in 50 ml Aqua dest.) bestrichen.

Die Objektträger werden nun nochmals 2 Tage im Wärmeschrank getrocknet (bei 100 °).

3.7. Schnitthanfertigung

Die Paraffinblöcke werden mit Hilfe eines Paraffin-Mikrotoms (Leitz 1516, sog. Rotationsmikrotom) zu je 10 Semidünnschnitten à 4 µm geschnitten. In einem auf 35° C temperierten Wasserbad werden die Schnitte nun eine Zeit lang schwimmen gelassen, damit sie sich etwas ausdehnen können. Anschließend werden sie auf die beschichteten Objektträger gezogen. Bevor die Schnitte weiter gefärbt werden können, müssen sie noch mindestens 1 Tag bei ca. 60 Grad Celsius im Wärmeschrank trocknen.

3.8. Immunhistochemische Färbung

1. Entparaffinieren:

4 x in Xylol je 8 Minuten spülen, dann zum Hydratisieren in absteigender Alkoholreihe spülen (2 x Alkohol absolut, 90%, 80%)

2. Spülen in Aqua dest.

3. Peroxidase-Hemmung:

200 ml Leitungswasser + 2 ml H₂O₂ (30%ig), 10 Minuten

4. Gut spülen in Aqua dest.

5. Demaskierung:

- 10 Minuten in der Mikrowelle bei 500 Watt in Citratpuffer kochen lassen
6. Abkühlen lassen bei Raumtemperatur etwas 20 Minuten
 7. Spülen in Tris-Puffer 2 x
 8. Blockiert wird 20 Minuten mit Kaninchennormalserum, verdünnt 1 : 50
 9. Die Blockierung wird abgekippt, der Schnitt vorsichtig rundherum abgewischt
 10. Der Primär-Antikörper wird in der jeweiligen Verdünnung über Nacht inkubiert
 11. 3 x Spülen in Tris-Puffer
 12. Der biontierte Sekundär-Antikörper wird 1 : 200 verdünnt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert
 13. 3 x Spülen in Tris-Puffer
 14. Peroxidase-konjugiertes Streptavidin HRP (horse radish peroxidase) wird 1 : 300 verdünnt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert
 15. Entwickelt wird die Peroxidase mit DAB.
Bei Raumtemperatur, nach gewünschtem Färbeergebnis, 1- 10 Minuten.
 16. 2 x Spülen in Aqua dest.
 17. Gegenfärbung mit Mayer's Hämalan: Hämatoxylin 1 : 4 (vorher filtrieren), ca. 10 – 30 Sekunden; fließend wässern mit Leitungswasser
 18. in aufsteigender Alkoholreihe spülen, in Xylol spülen; eindecken mit Entellan

zu 3.: Peroxidase-Hemmung:

Hierdurch wird die Peroxidase-Aktivität, die schon vor Beginn der Färbung vorhanden ist, verhindert. Endogene Peroxidase-Aktivität findet sich vor allem in roten und weißen Blutkörperchen.

zu 5.: Demaskierung:

Hier wird die Antigen-Stelle demaskiert, da sie durch übermäßige Aldehyd-Vernetzungen (durch die Formalin-Fixation) maskiert ist

zu 8.: Normalserum:

- NS Kaninchen: Code No. X0902 von Dako.
- NS Ziege: Code No. X0907 von Dako.

Durch die Zugabe einer neutralen Proteinlösung (Normalserum) werden unspezifische Hintergrundreaktionen verhindert. Dies sind positive Anfärbungen eines Präparats, die nicht das Ergebnis einer Antigen-Antikörper-Bindung darstellen.

Das Protein lagert sich an elektrisch geladene Stellen und verhindert somit eine Adsorption des Primär-Antikörpers. Auf diese Weise wird eine positive Anfärbung,

bedingt durch die Bindung des Sekundär-Antikörpers an Komponenten der Proteinlösung, verhindert.

zu 14.: Streptavidin bindet an das Biotin des Sekundär-Antikörpers. Das Enzym Meerrettich-Peroxidase kann durch ein geeignetes Chromogen sichtbar gemacht werden.

zu 15.: DAB:

Chromogene (hier: DAB) sind Elektronendonoren, die sich durch Oxidation in unlösliche und gefärbte Verbindungen umwandeln. DAB bildet ein braunes Reaktionsprodukt, das in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist.

☠ Achtung kanzerogen & Handschuhe anziehen!

! Lichtempfindlich ⇒ DAB erst kurz vor Gebrauch ansetzen

zu 17.: Mit der Gegenfärbung werden die Zellen und Zellkomponenten dargestellt, die kein Antigen enthalten. Somit erhält man einen besseren Kontrast.

☞ Allgemein muss darauf geachtet werden, dass die Schnitte während dem Färbeprozess nicht austrocknen!

3.9. HE-Färbung:

1. Entparaffinieren:

4 x in Xylol je 8 Minuten spülen, dann zum Hydrieren in absteigender Alkoholreihe spülen (2 x Alkohol absolut, 90%, 80%)

2. 6 – 10 Minuten in Hämatoxylin (konz.)

3. in Aqua dest. spülen

4. in HCl-Alkohol 1%ig 2 x eintauchen (ca. 20 Sekunden)

5. fließend wässern (6 Minuten)

6. in Eosin wenige Sekunden eintauchen (ca. 20 Sekunden)

7. in Aqua dest. spülen

8. in aufsteigender Alkoholreihe spülen

9. in Xylol spülen

10. Objektträger eindecken mit Entellan

3.10. Gewebekontrollen:

Es wurden positive und negative Kontrollen angefertigt.

Negativ-Kontrollen:

Hier erfolgte die immunhistochemische Färbung ohne den Primär-Antikörper

Positiv-Kontrollen:

Es wird versucht, durch die Färbung das gesuchte Antigen an sicher positiv zu erwartendem Gewebe anzufärben

3.11. Immunreaktiver Score:

Um die immunhistochemischen Färbungen mit den Enzymen Calpain 1, 2 und Calpastatin zu bewerten, wurde der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1986) verwendet.

Es wird in einem repräsentativen Teil des Präparates die Anzahl der gefärbten Zellen ausgezählt. Mindestens 200 Zellen werden in einem Raster bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Der Prozentsatz positiver Zellen (PP) wird in einen PP-Score umgerechnet, welcher zwischen 0 und 4 liegen kann.

Die Färbeintensität SI (staining intensity) der als positiv gewerteten Zellen wird geschätzt und ebenfalls in einem Score angegeben. Er kann Werte zwischen 0 und 3 annehmen. Der IRS-Score wird nun errechnet indem man den PP-Score mit dem SI-Score multipliziert. Somit erhält man einen Gesamtscore zwischen 0 und 12.

Tabelle 1: PP-Einteilung (PP-Score)

0	keine positiven Zellen
1	1-10% positive Zellen
2	11-50% positive Zellen
3	51-80% positive Zellen
4	81-100% positive Zellen

Tabelle 2: SI-Einteilung (SI-Score)

0	Negativ
1	Schwach
2	Mäßig
3	Stark

$$IRS = SI \times PP$$

3.12. Fotografieren

Die Präparate wurden unter dem Mikroskop Axioskop 40 der Firma Zeiss bei verschiedenen Vergrößerungen (10-, 20- und 40-fache Vergrößerung) angeschaut und fotografiert. Die Bilder wurden hierbei über die Digitalkamera Axio Cam MR C5 aufgenommen. Mit der dazugehörigen Software Axio Vision AC wurden die erhaltenen Bilder bearbeitet.

3.13. Statistik

Zur Auswertung der Arbeit kamen parametrische und nichtparametrische biomathematische Testverfahren zur Anwendung.

Es wurden Häufigkeitsanalysen für die Expression von Calpain 1, Calpain 2, Calpastatin und das Alter der Patienten durchgeführt. Der Chi-Quadrat-Test wurde gewählt zum Gruppenvergleich kategorialer Merkmale. Es wird somit die Hypothese überprüft, ob zwei Merkmale voneinander unabhängig sind. Der Sinn der einfachen linearen Regression ist es, die Abhängigkeit einer Variablen von einer zweiten zu untersuchen. Es wird also untersucht, ob eine Voraussagung möglich ist. In diesem Fall wurde im Ovarial-Carcinom der Zusammenhang zwischen Tumorstadium und der Expression der Enzyme Calpain 1, 2 und Calpastatin. Als nichtparametrische Tests wurden der Mann-Whitney-Test und der Spearman'sche-Rangkorrelationskoeffizient eingesetzt. Letzterer überprüft den Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen. Die Korrelation erfolgt nach folgender Einteilung:

$ r < 0,4$	Schwache Korrelation
$0,4 < r < 0,7$	Mäßige Korrelation
$ r > 0,7$	Starke Korrelation

4. Ergebnisse

4.1. Expression und Auswertung

Nachdem die Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin an den insgesamt 50 Endometrium- und Ovarialkarzinomen (29 Endometrium-, 21 Ovarial-Karzinome) und den zusammen 29 benignen Endometrium- und Ovarialgeweben (18 Endometrium-, 11 Ovarial-Gewebe) immunhistologisch durchgeführt wurde, erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung (vgl. Abschnitt 3.11.). Für jedes Präparat wurde die Färbintensität (SI), die Anzahl der positiven Zellen (PP) und der Immunreaktive Score (IRS) bestimmt.

4.1.1. Häufigkeitstabellen

Die so gewonnenen Daten wurden dank der Hilfe von Dipl.-Math. Dr. T. Georg aus dem statistischen Institut mittels der Statistiksoftware SPSS 10.0 ausgewertet.

Zur Darstellung der absoluten bzw. relativen Häufigkeiten der beobachteten Werte eines Merkmals wurden Häufigkeitsanalysen durchgeführt. Dabei wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Minima und Maxima ermittelt.

Tabelle 3: Mittelwerte, Standardabweichung, Minima, Maxima

Häufigkeitstabellen für Endometrium-Karzinom

	Mittelwerte	SD	Minimum	Maximum
C1-SI n=29	1,86	0,83	0	3
C1-PP n=29	77,06	26,52	0	97
C1-IRS n=29	6,89	3,7	0	12
C2-SI n=29	2,1	0,55	1	3
C2-PP n=29	88,65	8,65	51	96
C2-IRS n=29	8,51	2,39	3	12
C2-SI n=29	2,17	0,71	1	3
CA-PP n=29	83,17	15,66	21	97
CA-IRS n=29	8,44	2,88	4	12

Tabelle 4: Mittelwerte, Standardabweichung, Minima, Maxima

Häufigkeitstabellen für Ovarial-Karzinom

	Mittelwerte	SD	Minimum	Maximum
C1-SI n=20	2,2	0,61	1	3
C1-PP n=20	91,3	6,22	68	97
C1-IRS n=20	8,75	2,57	3	12
C2-SI n=20	1,9	0,64	1	3
C2-PP n=20	91,45	3,5	82	95
C2-IRS n=20	7,6	2,56	4	12
CA-SI n=20	2,3	0,57	1	3
CA-PP n=20	90,15	4,86	75	96
CA-IRS n=20	9,2	2,28	4	12

Tabelle 5: Mittelwerte, Standardabweichung, Minima, Maxima

Häufigkeitstabellen für benignes Endometrium-Gewebe

	Mittelwerte	SD	Minimum	Maximum
C1-SI n=16	1,75	0,77	1	3
C1-PP n=17	74,23	29,55	0	96
C1-IRS n=18	5,88	3,92	0	12
C2-SI n=18	2	0,76	0	3
C2-PP n=18	83,16	22,04	0	96
C2-IRS n=18	7,83	3,18	0	12
CA-SI n=18	2	0,76	0	3
CA-PP n=18	71,27	26,69	0	95
CA-IRS n=18	6,94	3,22	0	12

Tabelle 6: Mittelwerte, Standardabweichung, Minima, Maxima

Häufigkeitstabellen für benignes Ovarial-Gewebe

	Mittelwerte	SD	Minimum	Maximum
C1-SI n=10	1,6	1,07	0	3
C1-PP n=10	72,7	38,43	0	95
C1-IRS n=10	6,4	4,29	0	12
C2-SI n=11	1,72	1	0	3
C2-PP n=11	74,9	37,16	0	96
C2-IRS n=11	6,9	4,03	0	12
CA-SI n=10	2,9	0,31	2	3
CA-PP n=10	94,5	1,77	92	97
CA-IRS n=10	11,6	1,26	8	12

C1	Calpain 1
C2	Calpain 2
CA	Calpastatin
SI	staining intensity (Färbeintensität)
PP	percent positive cells (Anzahl positiver Zellen)
IRS	international ratio score (Immunreaktiver Score)
SD	Standardabweichung
n	Anzahl

Hinsichtlich des Alters der Patienten ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 7: Durchschnitt, Minimum, Maximum des Patientenalters

Gewebe	Durchschnitt	Min.	Max.
Endometrium-Karzinom	64 Jahre	39 Jahre	84 Jahre
Endometrium	50 Jahre	33 Jahre	73 Jahre
Ovarial-Karzinom	60 Jahre	35 Jahre	91 Jahre
Ovar	50 Jahre	29 Jahre	88 Jahre

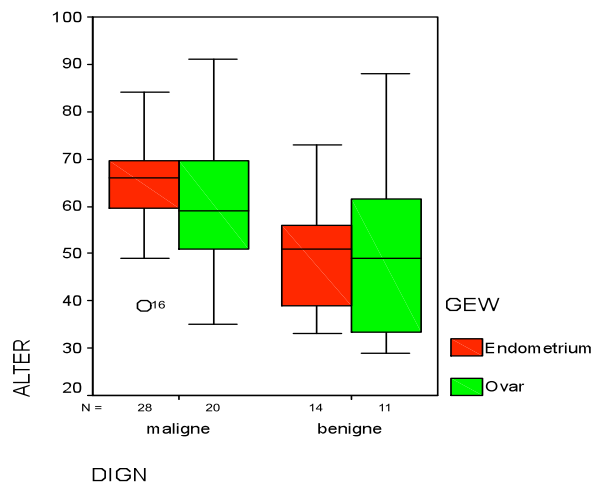


Abbildung 2: Verteilung des Patientenalters in Abhängigkeit von der Dignität des Gewebes

Die Anzahl der Präparate, zu denen über pM (Fernmetastasierung) im histo-pathologischen Bericht erstattet wurde, war zu niedrig. Daher konnte keine statistische Auswertung erfolgen. Für Endometrium- und Ovarial-Karzinome wurden Häufigkeitstabellen über ihr Tumorstadium (pT), den Malignitätsgrad (G) und die Metastasierung in Lymphknoten (pN) aufgestellt.

**Tabelle 8: Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum
histopathologischer Daten**

Endometrium-Karzinom

	Mittelwert	SD	Min.	Max.
PT	1,27	0,7	1	3
PN	0	0	0	0
G	2,14	2	1	3

Tabelle 9: Häufigkeitstabelle für pT des Endometrium-Karzinoms

PT^a

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig 1,00	25	86,2	86,2	86,2
3,00	4	13,8	13,8	100,0
Gesamt	29	100,0	100,0	

a. GEW = Endometrium, DIGN = maligne

Tabelle 10: Häufigkeitstabelle für pN des Endometrium-Karzinoms

PN^a

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig ,00	12	41,4	100,0	100,0
Fehlend System	17	58,6		
Gesamt	29	100,0		

a. GEW = Endometrium, DIGN = maligne

Tabelle 11: Häufigkeitstabelle für G des Endometrium-Karzinoms

G^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1,00	3	10,3	10,7	10,7
	2,00	18	62,1	64,3	75,0
	3,00	7	24,1	25,0	100,0
	Gesamt	28	96,6	100,0	
Fehlend	System	1	3,4		
Gesamt		29	100,0		

a. GEW = Endometrium, DIGN = maligne

**Tabelle 12: Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum
histopathologischer Daten**

Ovarial-Karzinom

	Mittelwert	SD	Min.	Max.
PT	1,9	0,91	1	3
PN	0,25	0,46	0	1
G	2,5	3	1	3

Tabelle 13: Häufigkeitstabelle für pT des Ovarial-Karzinoms

PT^a

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1,00	9	45,0	45,0	45,0
	2,00	4	20,0	20,0	65,0
	3,00	7	35,0	35,0	100,0
Gesamt		20	100,0	100,0	

a. GEW = Ovar, DIGN = maligne

Tabelle 14: Häufigkeitstabelle für pN des Ovarial-Karzinoms

PN^a

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	,00	6	30,0	75,0
	1,00	2	10,0	25,0
	Gesamt	8	40,0	100,0
Fehlend	System	12	60,0	
Gesamt		20	100,0	

a. GEW = Ovar, DIGN = maligne

Tabelle 15: Häufigkeitstabelle für G des Ovarial-Karzinoms

G^a

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1,00	2	10,0	10,0
	2,00	6	30,0	40,0
	3,00	12	60,0	100,0
	Gesamt	20	100,0	

a. GEW = Ovar, DIGN = maligne

4.2. Zusammenhang zwischen histopathologischen Daten der Tumoren und Expression von Calpain 1 , Calpain 2 und Calpastatin

Verglichen wurden die Tumormerkmale Tumorstadium (pT), Lymphknotenstatus (pN) und Malignitätsgrad (G) von Endometrium- und Ovarialkarzinom mit den immunhistochemischen Merkmalen wie Färbeindex (SI), Anzahl der positiven Zellen (PPGZ/PPZZ) und Immunreaktiver Score (IRS) von jeweils Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin.

Hierzu dienten zum einen der Chi-Quadrat-Test, zum anderen der Mann-Whitney-Test, welcher für das Tumorstadium (pT) und den Malignitätsgrad (G) durchgeführt wurden. Die lineare Regression wurde nur in Bezug auf das Ovarial-Karzinom durchgeführt.

4.2.1. Endometrium-Karzinom

4.2.1.1. Zusammenhang zwischen Tumorstadium (pT) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Der Chi-Quadrat-Test ergab keine statistische Signifikanzen. Der Mann-Whitney-Test brachte ebenfalls keine statistischen Signifikanzen zutage.

4.2.1.2. Zusammenhang zwischen Lymphknotenstatus (pN) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Von insgesamt 12 Endometrium-Karzinomen wurde der Lymphknotenstatus bestimmt. Da alle Gewebeproben dem Lymphknotenstatus N0 zugeordnet worden sind, war es nicht möglich, eine Aussage über eine Korrelation mit der Expression zu machen.

4.2.1.3. Zusammenhang zwischen Grading (G) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Der Chi-Quadrat-Test konnte keine statistische Signifikanz feststellen zwischen dem Grading und einer Enzym-Expression.

**Tabelle 16: Chi-Quadrat-Test
Endometrium-Karzinom**

	PT	PN	G
SI (C1)	0,099	-	0,823
PPZZ (C1)	0,231	-	0,423
SI (C2)	0,689	-	0,806
PPZZ (C2)	0,689	-	0,806
SI (CA)	0,601	-	0,440
PPZZ (CA)	0,260	-	0,911

**Tabelle 17: Mann-Whitney-Test
Endometrium-Karzinom**

	PPGZ (C1)	IRS (C1)	PPGZ (C2)	IRS (C2)	PPGZ (CA)	IRS (CA)
PT	0,326	0,065	0,119	0,679	0,12	0,0793
G2	0,339	0,956	0,098	0,491	1.0	0,409

4.2.2. Ovarial-Karzinom

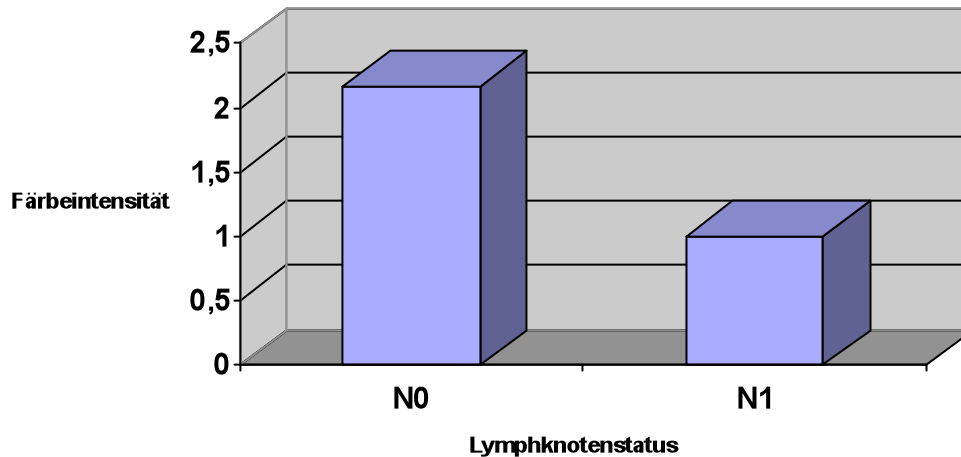
4.2.2.1. Zusammenhang zwischen Tumorstadium (pT) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Der Chi-Quadrat-Test konnte keine statistische Signifikanz aufzeigen zwischen Tumorstadium und Enzym-Expression. Die lineare Regression zeigte ebenso wie der Mann-Whitney-Test keinen statistisch signifikanten Zusammenhang.

4.2.2.2. Zusammenhang zwischen Lymphknotenstatus (pN) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Zu acht Ovarial-Karzinomen lag eine Angabe über ihren Lymphknotenstatus vor. Sechs Karzinome waren negativ, also N0, die anderen zwei wurden N1 zugeordnet.

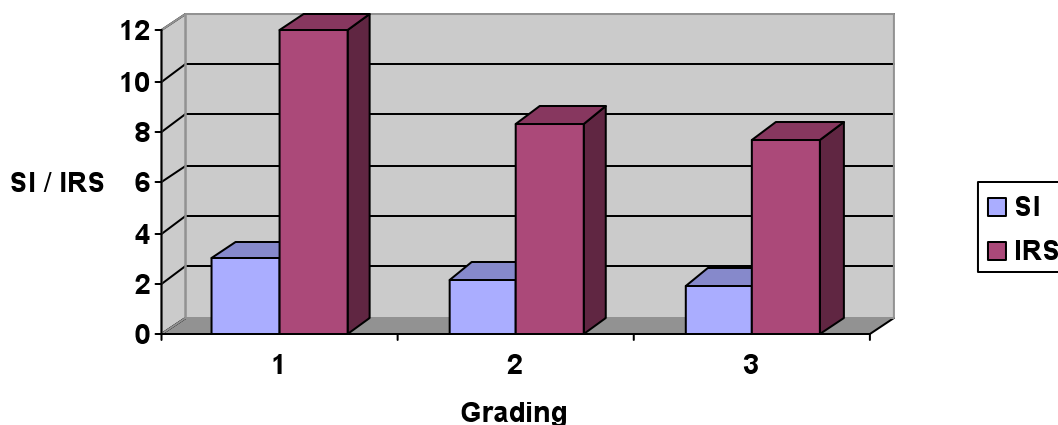
Statistische Signifikanz ergab der Chi-Quadrat-Test für den Zusammenhang zwischen Lymphknotenstatus und der Färbeintensität von Calpain 2 ($p=0,026$). Es korrelierten höhere Werte der Färbeintensität mit einem niedrigeren Lymphknotenstatus.



**Abbildung 3: SI (Cal 2) x N
Ovarial-Karzinom**

4.2.2.3. Zusammenhang zwischen Grading (G) und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Der Chi-Quadrat-Test konnte eine statistische Signifikanz zwischen dem Grading und der Färbeintensität von Calpain 1 ($p=0,007$) aufzeigen. Mit steigendem Grading war eine verminderte Färbeintensität erkennbar. Der Mann-Whitney-Test konnte eine statistische Signifikanz von $p=0,010$ (exakte Signifikanz= $0,025$) in Bezug auf den Immunreaktiven Score von Calpain 1 nachweisen. Hier wurden folglich auch höhere IRS-Werte mit niedrigeren Malignitätsgraden beobachtet.



**Abbildung 4: SI (Cal 1) x G
IRS (Cal 1) x G
Ovarial-Karzinom**

**Tabelle 18: Chi-Quadrat-Test
Ovarial-Karzinom**

	PT	PN	G
SI (C1)	0,806	0,750	0,007
PPZZ (C1)	0,216	*	0,456
SI (C2)	0,638	0,026	0,4298
PPZZ (C2)	*	*	*
SI (CA)	0,481	0,378	1,0
PPZZ (CA)	0,311	0,564	0,456

* Es werden keine Statistiken berechnet, da hier Konstanten vorliegen.

**Tabelle 19: Lineare Regression
Ovarial-Karzinom**

	PPGZ (C1)	IRS (C1)	PPGZ (C2)	IRS (C2)	PPGZ (CA)	IRS (CA)
PT	0,380	0,742	0,885	0,650	0,988	0,496

**Tabelle 20: Mann-Whitney-Test
Ovarial-Karzinom**

	PPGZ (C1)	IRS (C1)	PPGZ (C2)	IRS (C2)	PPGZ (CA)	IRS (CA)
G2	0,877	0,010	1,0	0,172	0,552	0,654

4.3. Vergleich der Enzym-Expression von benignem Gewebe mit Karzinom-Gewebe

4.3.1. Calpain 1

Jeweils zwei der Endometrium-Präparate (benigne und maligne) zeigten keine Immunreaktivität für Calpain 1. Auch zwei benigne Ovarial-Gewebe fielen negativ aus. Der Chi-Quadrat-Test ergab keine statistische Signifikanz. Ebenso verlief es im Mann-Whitney-Test, bei dem sich keinerlei Signifikanzen nachweisen ließen. Im Durchschnitt lagen die Immunreaktivitäten der malignen und benignen Endometriumgewebe etwa gleich hoch.

(Mittelwert für SI des Endometrium-Karzinoms: 1,86

Mittelwert für SI des benignen Endometriums: 1,75

Mittelwert für PP des Endometrium-Karzinoms: 77,06

Mittelwert für PP des benignen Endometriums: 74,23

Mittelwert für IRS des Endometrium-Karzinoms: 6,89

Mittelwert für IRS des benignen Endometriums: 5,88)

Im Ovarialkarzinom hingegen fand man durchschnittlich etwas höhere Immunreaktivitäten vor.

(Mittelwert für SI des Ovarial-Karzinoms: 2,1

Mittelwert für SI des benignen Ovarial-Gewebes: 1,6

Mittelwert für PP des Ovarial-Karzinoms: 91,3

Mittelwert für PP des benignen Ovarial-Gewebes: 72,7

Mittelwert für IRS des Ovarial-Karzinoms: 8,75

Mittelwert für IRS des benignen Ovarial-Gewebes: 7,83)

4.3.2. Calpain 2

Ein benignes Endometrium-Gewebe sowohl zwei benigne Ovarial-Gewebe waren negativ bezüglich Calpain 2.

Der Chi-Quadrat-Test konnte ebenso wie der Mann-Whitney-Test keine statistische Signifikanzen aufdecken. Sowohl Endometrium- als auch Ovarialkarzinome zeigen gegenüber der benignen Gewebe etwas höhere Immunreaktivitäten.

(Mittelwert für SI des Endometrium-Karzinoms: 2,1

Mittelwert für SI des benignen Endometriums: 2

Mittelwert für PP des Endometrium-Karzinoms: 88,65

Mittelwert für PP des benignen Endometriums: 83,16

Mittelwert für IRS des Endometrium-Karzinoms: 8,51

Mittelwert für IRS des benignen Endometrium-Gewebes: 8,51

Mittelwert für SI des Ovarial-Karzinoms: 1,9

Mittelwert für SI des benignen Ovarials: 1,72

Mittelwert für PP des Ovarial-Karzinoms: 91,45

Mittelwert für PP des benignen Ovarial-Gewebes: 74,9

Mittelwert für IRS des Ovarial-Karzinoms: 7,6

Mittelwert für IRS des benignen Ovarial-Gewebes: 6,9)

4.3.3. Calpastatin

Bis auf lediglich ein benignes Endometriumgewebe zeigten alle anderen Präparate eine Immunreaktivität für Calpastatin.

Statistische Signifikanz ergab der Chi-Quadrat-Test zwischen der Dignität des Ovarial-Gewebes und der Färbeintensität ($p=0,007$). Der mittlere Wert der Färbeintensität der benignen Gewebe lag etwas über denen der. Ebenfalls ließ sich der Zusammenhang zwischen der Anzahl der als positiv gezählten Zellen mit der Dignität im Endometrium-Gewebe mit einer Signifikanz von $p=0,037$ nachweisen.

Der Mann-Whitney-Test ergab für das Ovarial-Gewebe eine statistische Signifikanz in Bezug auf den Immunreaktiven Score ($p=0,013$; mittlerer Rang Ovarial-Ca.: 12,73; mittlerer Rang benignes Ovarial-Gewebe: 21,05) und PPGZ ($p=0,001$; mittlerer Rang Ovarial-Karzinom: 11,77; mittlerer Rang benignes Ovarial-Gewebe: 22,95).

Beim Endometriumkarzinom lagen die Immunreaktivitätswerte im Durchschnitt etwas höher als die der benignen Gewebe.

(Mittelwert von SI des Endometrium-Karzinoms: 2,17

Mittelwert von SI des benignen Endometriums: 2

Mittelwert von PP des Endometrium-Karzinoms: 83,17

Mittelwert von PP des benignen Endometriums: 71,27

Mittelwert von IRS des Endometrium-Karzinoms: 8,44

Mittelwert von IRS des benignen Endometriums: 6,94)

4. Ergebnisse

Die Immunreaktivitätswerte der Ovarialkarzinome lagen im Durchschnitt etwas niedriger als die der benignen Gewebe.

(Mittelwert von SI der Ovarial-Karzinome: 2,3

Mittelwert von SI der benignen Ovarialgewebe: 2,9

Mittelwert von PP der Ovarial-Karzinome: 90,15

Mittelwert von PP der benignen Ovarial-Gewebe: 94,5

Mittelwert von IRS der Ovarial-Karzinome: 9,2

Mittelwert von IRS der benignen Ovarial-Gewebe: 11,6)

Tabelle 21: Chi-Quadrat-Test

	Dignität Endometrium	Dignität Ovar
SI (C1)	0,655	0,062
PPZZ (C1)	0,653	0,058
SI (C2)	0,591	0,555
PPZZ (C2)	0,111	0,052
SI (CA)	0,431	0,007
PPZZ (CA)	0,037	0,480

Tabelle 22: Mann-Whitney-Test

	PPGZ (C1)	IRS (C1)	PPGZ (C2)	IRS (C2)	PPGZ (CA)	IRS (CA)
Dignität Endo.	0,516	0,433	0,496	0,472	0,145	0,098
Dignität Ovar	0,109	0,183	0,381	0,855	0,001	0,005

4.4. Zusammenhang zwischen den Expressionen von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Als Statistische Tests wurden der Chi-Quadrat-Test verwendet und der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient ermittelt.

Der Chi-Quadrat-Test untersucht auf mögliche Zusammenhänge zwischen der Färbeintensität (SI) und der Anzahl der positiv reagierenden Zellen (PPZZ) hinsichtlich der Färbungen mit unseren drei Enzymen.

Der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r) wurde berechnet um Zusammenhänge in dem prozentualen Anteil positiver reagierender Zellen (PPGZ) und dem IRS von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin aufzudecken. Es liegt eine starke Korrelation bei Werten von r größer als 0,7 vor. Eine mäßige Korrelation ist bei Werten zwischen 0,4 und 0,7; eine schwache Korrelation bei Werten kleiner als 0,4 vorhanden.

Die Ermittlung des Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten ist eine gute Methode bei einem kleinen Stichprobenumfang und schwächt zudem die Wirkung von Ausreißern ab.

4.4.1 Zusammenhang zwischen der Expression von Calpain 1 und Calpain 2

Im Chi-Quadrat-Test ergaben sich statistische Signifikanzen für den Zusammenhang der Färbeintensitäten ($p=0,031$) im benignen Ovarial-Gewebe. Es korrelierten jeweils höhere SI-Werte von Calpain 1 mit höheren SI-Werten von Calpain 2 (s. Abbildung 4).

Der Zusammenhang des Anteils positiver Zellen wurde mit einem p -Wert von 0,002 im Endometrium-Karzinom (s. Abbildung 5) und 0,015 im normalen Gewebe (s. Abbildung 6) belegt.

Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient mit einem Wert von 0,488 ergibt eine mäßige Korrelation der IRS-Werte von Calpain 1 und 2 des Endometrium-Gewebes (s. Abbildung 7). Der p -Wert lag bei 0,040. Ebenfalls statistisch signifikant war der p -Wert für den Zusammenhang der Anzahl positiver Zellen von Calpain 1 und dem Immunreaktiven Score von Calpain 2 ($p=0,024$), auch hier lag mit $r=0,543$ eine mäßige Korrelation vor (s. Abbildung 8).

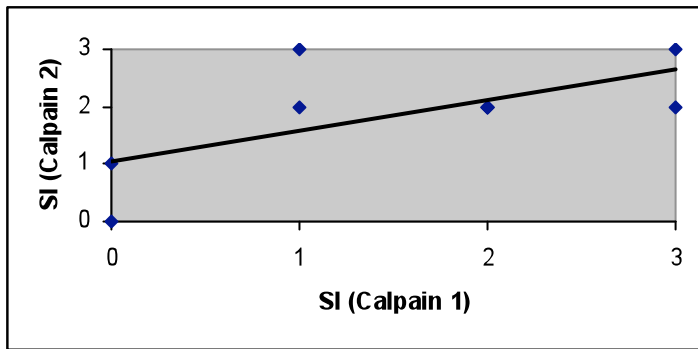


Abbildung 5: Ovarial-Gewebe (n=10)

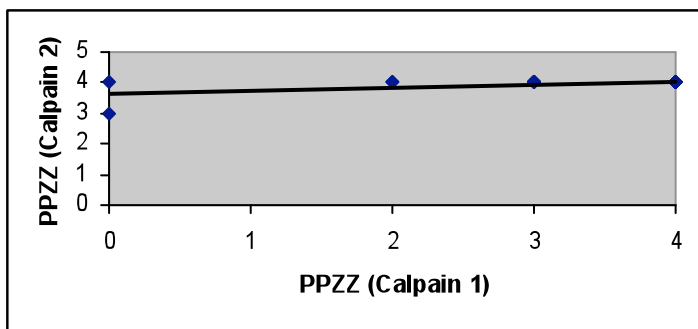


Abbildung 6: Endometrium-Karzinom (n=29)

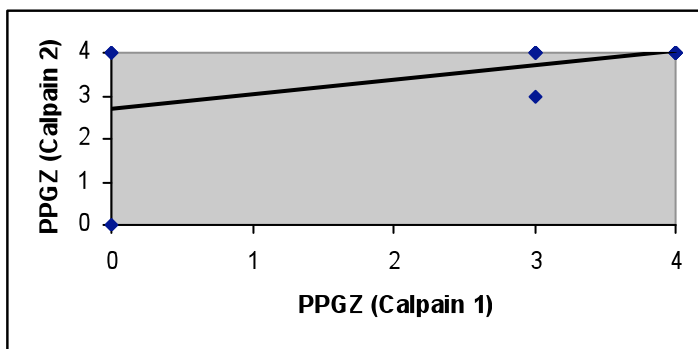


Abbildung 7: Endometrium-Gewebe (n=18)

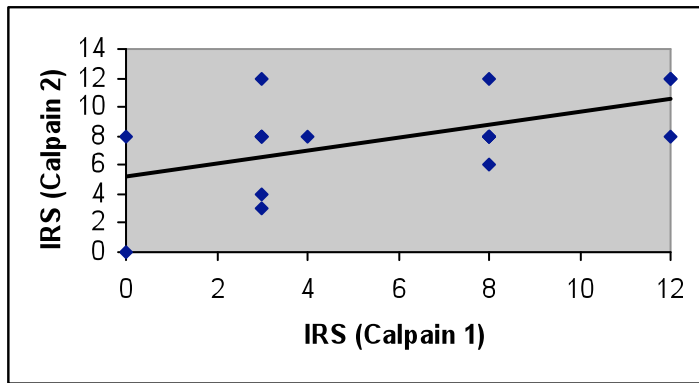


Abbildung 8: Endometrium-Gewebe (n=18)

4.4.2. Zusammenhang zwischen der Expression von Calpain 2 und Calpastatin

Der Chi-Quadrat-Test ergab mit einem p-Wert von 0,039 hinsichtlich der Färbeintensität von Endometrium-Gewebe eine statistische Signifikanz.

Aus dem Spearman Rang-Korrelations-Koeffizient konnten keine signifikanten Korrelationen ersichtlich werden.

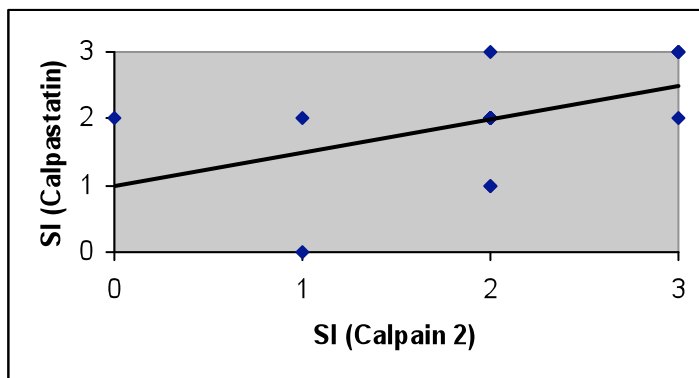


Abbildung 9: Endometrium-Gewebe (n=18)

4.4.3. Zusammenhang zwischen der Expression von Calpain 1 und Calpastatin

Für das Endometrium-Karzinom zeigte sich im Chi-Quadrat-Test ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Anzahl der positiven Zellen ($p=0,025$).

Die Spearman'sche Rangkorrelation ergab eine mäßige Korrelation der IRS-Werte der Endometrium-Karzinome von Calpain 1 im Vergleich mit dem Anteil positiver Zellen von Calpastatin ($p=0,016$; $r=0,442$). Ebenso mäßig korrelierten die Anteile positiver Zellen von Calpain 1 mit der Anzahl positiver Zellen von Calpastatin ($p=0,001$; $r=0,579$). Für das gutartige Endometrium-Gewebe ergab sich ein p-Wert von 0,032, aber auch nur eine mäßige Korrelation ($r=0,508$) im Vergleich der IRS-Werte von Calpain 1 und Calpastatin miteinander. Im Ovarial-Karzinom korrelierten die IRS-Werte von Calpastatin schwach ($r=-0,494$) mit der Anzahl positiver Zellen von Calpain 1 ($p=0,027$).

**Tabelle 23: Chi-Quadrat-Test
Endometrium-Karzinom**

	C1 x C2	C1 x CA	C2 x CA
SI	0,565	0,590	0,805
PPZZ	0,002	0,025	0,805

**Tabelle 24: Chi-Quadrat-Test
Endometrium**

	C1 x C2	C1 x CA	C2 x CA
SI	0,060	0,589	0,039
PPZZ	0,015	0,573	0,387

**Tabelle 25: Chi-Quadrat-Test
Ovarial-Karzinom**

	C1 x C2	C1 x CA	C2 x CA
SI	0,163	0,434	0,707
PPZZ	*	0,819	*

* Es werden keine Statistiken berechnet, da hier Konstanten vorliegen.

Tabelle 26: Chi-Quadrat-Test

Ovar

	C1 x C2	C1 x CA	C2 x CA
SI	0,031	0,808	0,904
PPZZ	*	*	*

* Es werden keine Statistiken berechnet, da hier Konstanten vorliegen.

Tabelle 27: p-Werte mit dessen Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient

Endometrium-Karzinom

	C1PPGZ	C1IRS	C2PPGZ	C2IRS	CAPPGZ	CAIRS
C1PPGZ			p=0,172 r=0,260	p=0,223 r=0,233	p=0,001 r=0,579	p=0,159 r=0,269
C1IRS			p=0,628 r=0,094	p=0,357 r=0,178	p=0,016 r=0,442	p=0,077 r=0,334
C2PPGZ	p=0,062 r=0,462	p=0,265 r=0,278			p=0,822 r=0,044	p=0,188 r=0,251
C2IRS	p=0,024 r=0,543	p=0,040 r=0,488			p=0,390 r=0,166	p=0,220 r=0,235
CAPPGZ	p=0,180 r=0,341	p=0,089 r=0,413	p=0,598 r=0,133	p=0,655 r=0,113		
CAIRS	p=0,076 r=0,442	p=0,032 r=0,508	p=0,202 r=0,315	p=0,176 r=0,334		

Endometrium

Tabelle 28: p-Werte mit dessen Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient

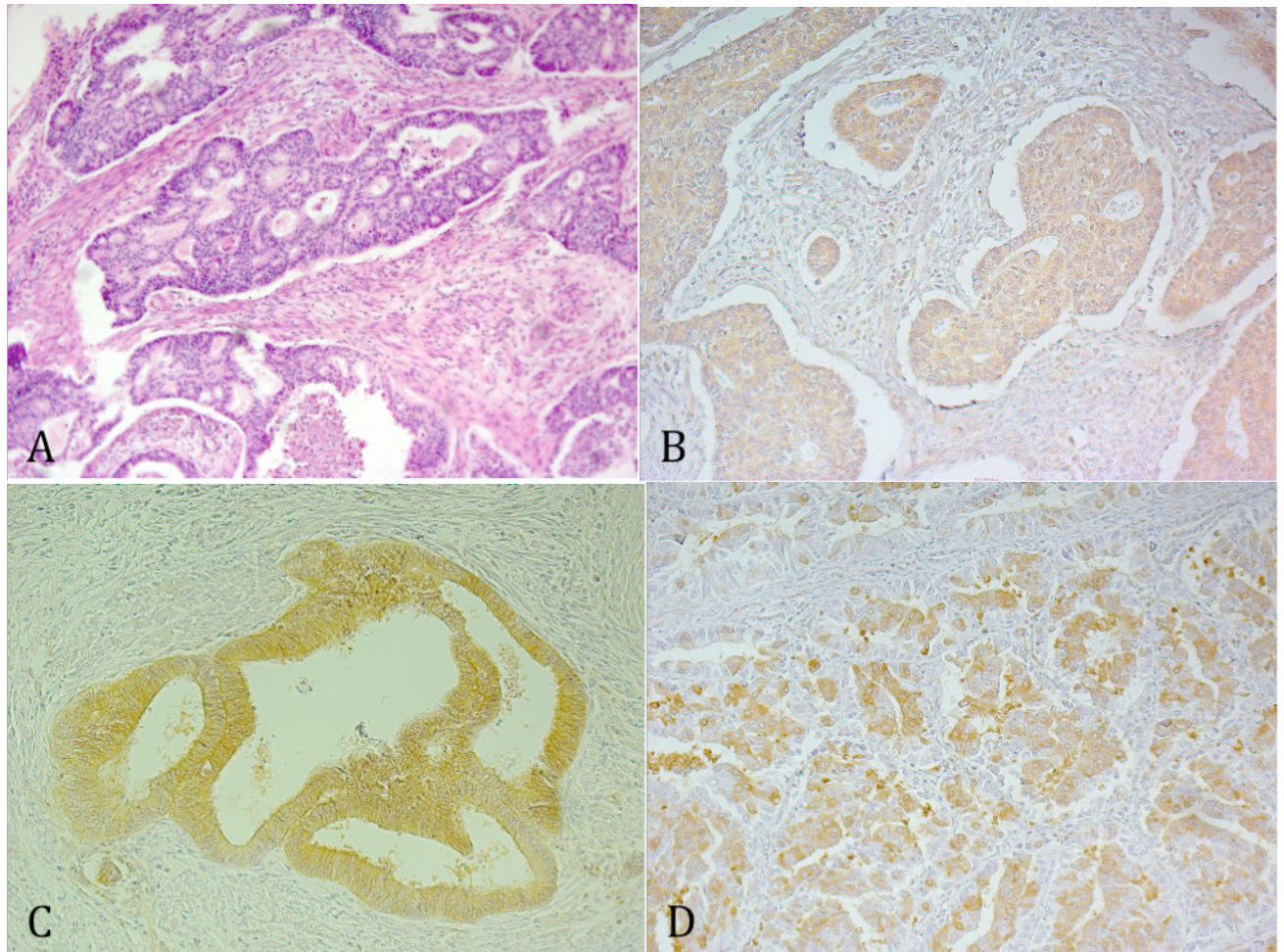
Ovarial-Karzinom

	C1PPGZ	C1IRS	C2PPGZ	C2IRS	CAPPGZ	CAIRS
C1PPGZ			p=0,605 r=-0,123	p=0,050 r=-0,444	p=0,449 r=0,180	p=0,027 r=-0,494
C1IRS			p=0,343 r=0,224	p=0,136 r=0,345	p=0,504 r=0,159	p=0,370 r=-0,212
C2PPGZ	p=0,147 r=0,494	p=0,053 r=0,626			p=0,088 r=-0,391	p=0,166 r=-0,322
C2IRS	p=0,392 r=0,305	p=0,083 r=0,574			p=0,166 r=-0,322	p=0,835 r=0,050
CAPPGZ	p=0,904 r=-0,047	p=0,677 r=0,162	p=0,056 r=0,620	p=0,459 r=0,265		
CAIRS	p=0,724 r=-0,138	p=0,85 r=-0,072	p=0,172 r=-0,468	p=1,000 r=0,000		

Ovar

4.5. Histologische Abbildungen

4.5.1. Endometrium-Karzinome und benigne Endometriumgewebe

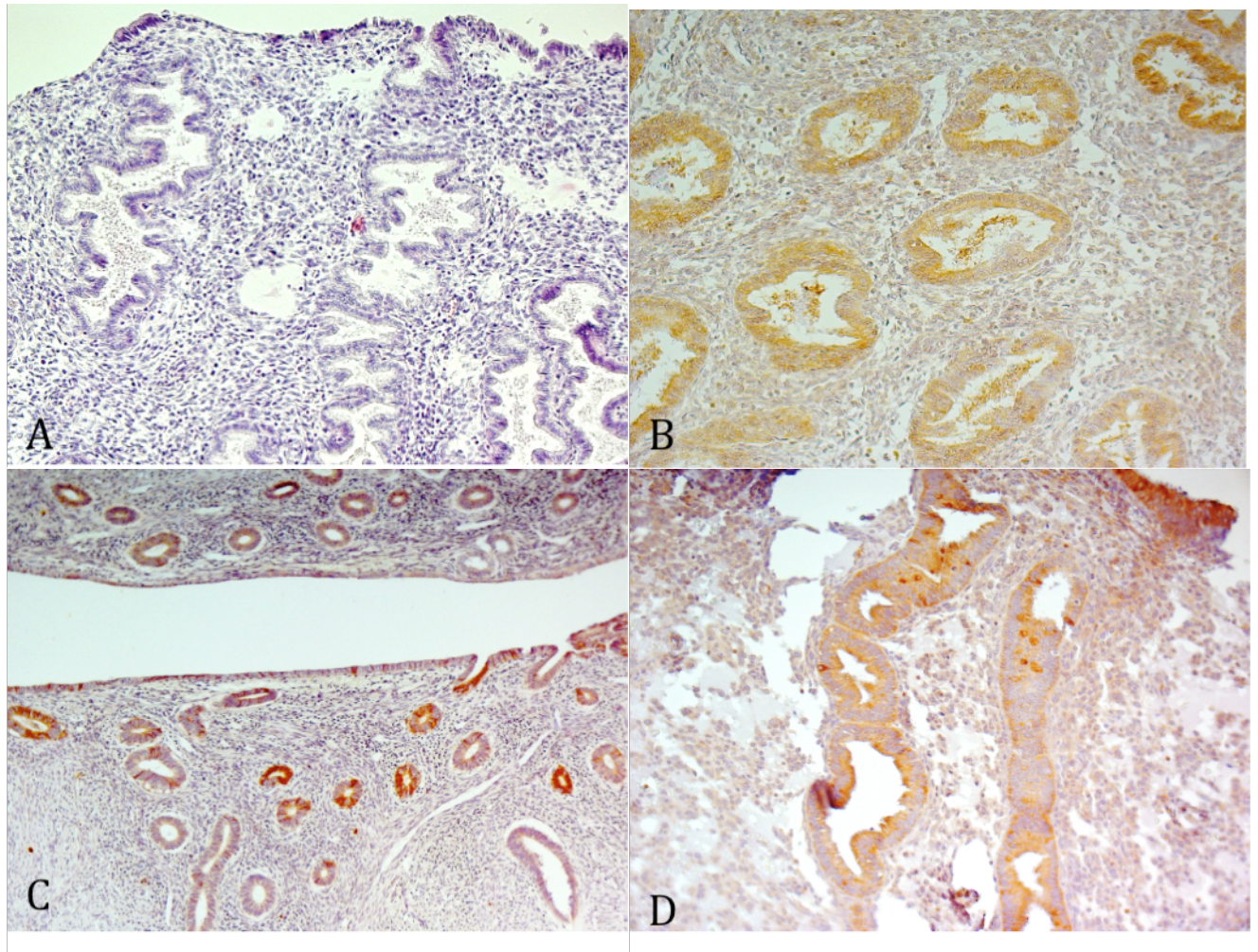


A Präparat Nr. 2131, mässig differenziertes endometrioides Adeno-Karzinom, 20x vergrössert, HE Färbung

B Präparat Nr. 2131, mässig differenziertes endometrioides Adeno-Karzinom, 20x vergrössert, immunhistochem. Darstellung von Calpain 1

C Präparat Nr. 10482, mässig differenziertes endometrioides Adeno-Karzinom, 20x vergrössert, immunhistochem. Darstellung von Calpain 2

D Präparat Nr. 4546, endometrioides Adeno-Karzinom, 20x vergrössert, immunhistochem. Darstellung von Calpastatin



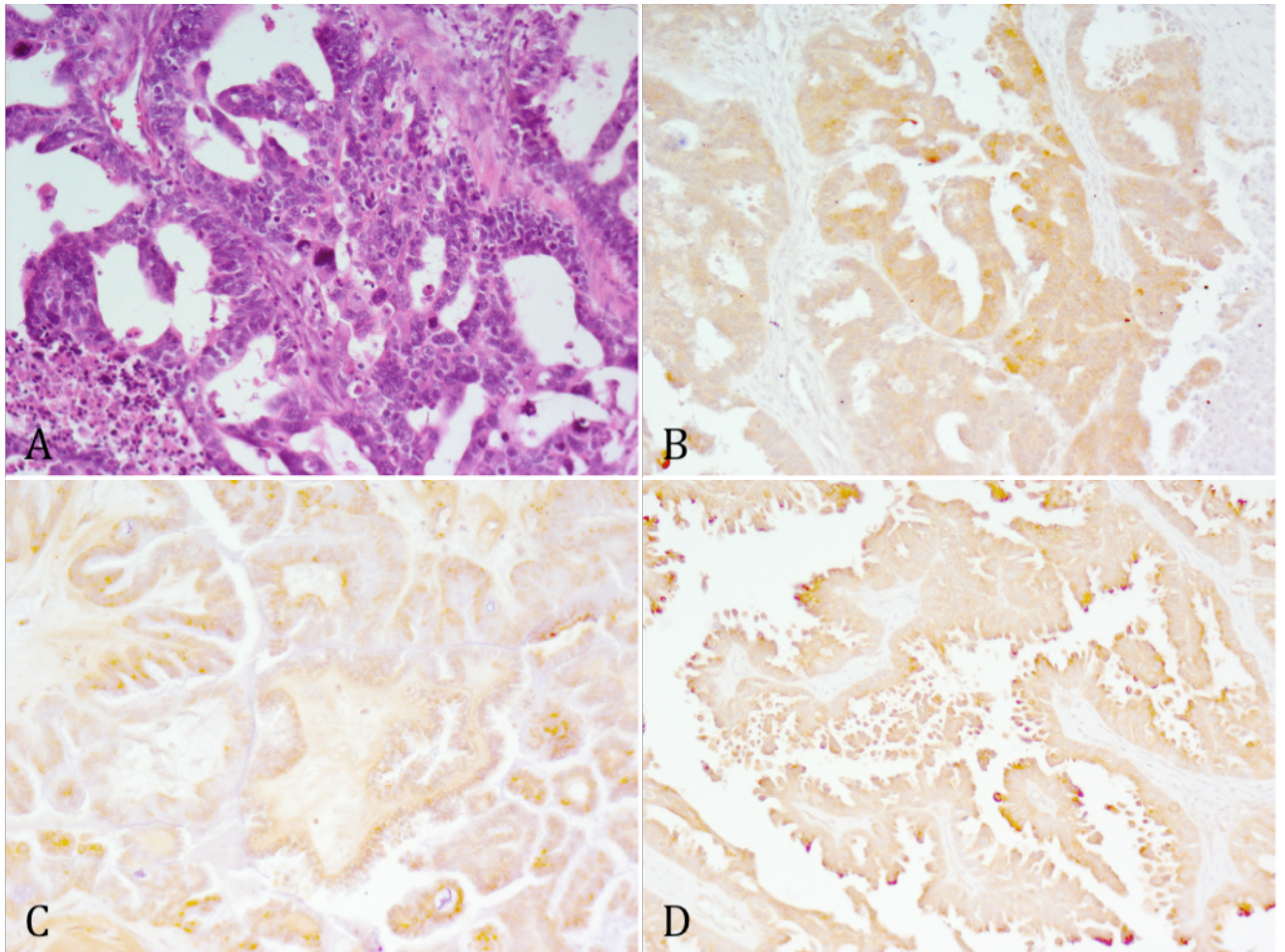
A Präparat Nr. 113, benignes Endometrium, sekretorisch umgewandelt, 20x vergrößert, HE-Färbung

B Präparat Nr. 113, benignes Endometrium, sekretorisch umgewandelt, 20x vergrößert, immunohistochem. Darstellung von Calpain 1

C Präparat Nr. 476, benignes Endometrium, atrophisch, 20x vergrößert, immunohistochem. Darstellung von Calpain 2

D Präparat Nr. 20, benignes Endometrium, umschriebene Hyperplasie, 20x vergrößert, immunohistochem. Darstellung von Calpastati

4.5.2. Ovarial-Karzinome und benignes Ovar

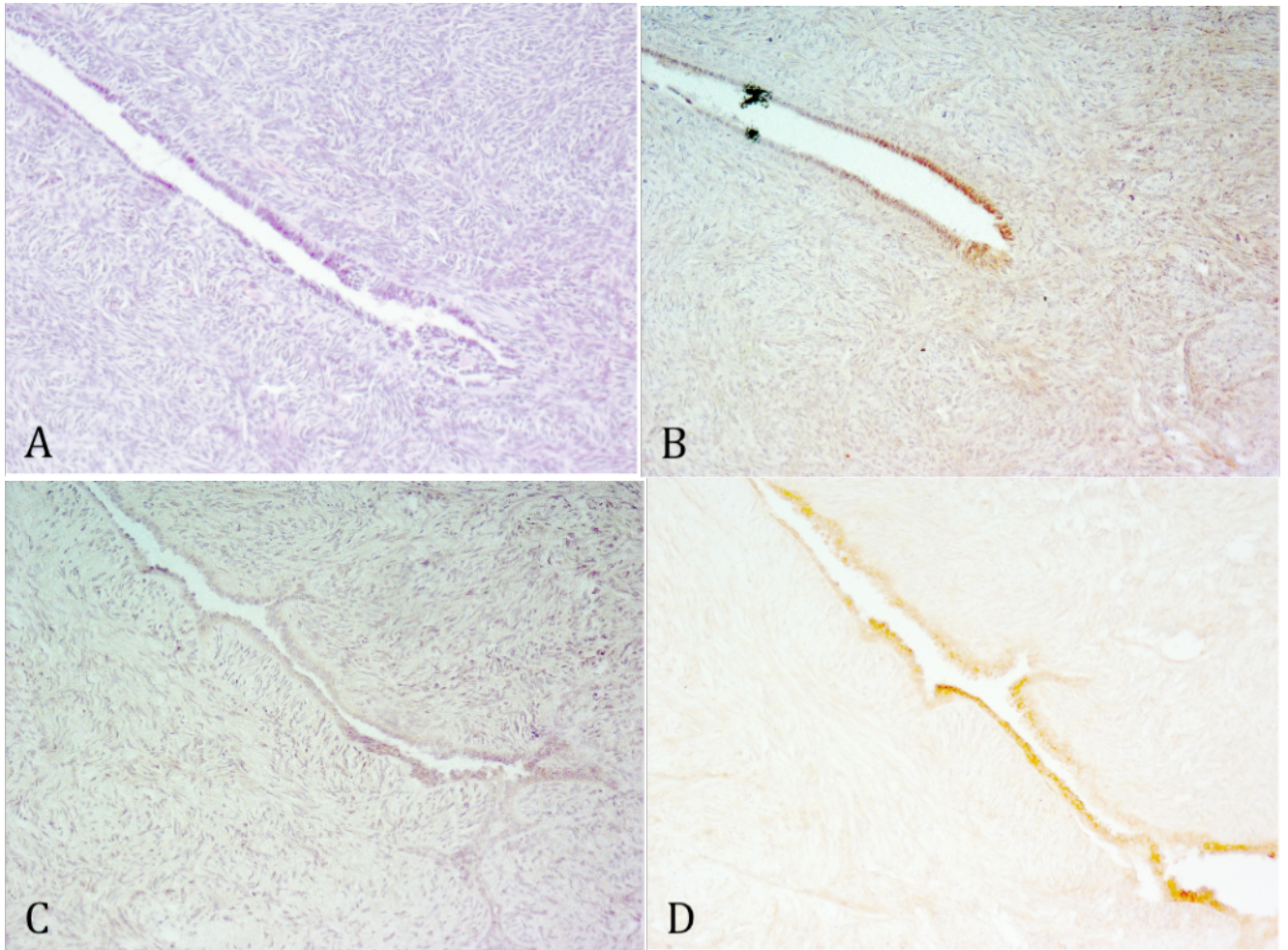


A Präparat Nr. 20594, mässig differenziertes Zystadeno-Karzinom, 20x vergrössert, HE-Färbung

B Präparat Nr. 20594, mässig differenziertes Zystadeno-Karzinom, 20x vergrössert, immunhistochem Darstellung von Calpain 1

C Präparat Nr. 20888 , serös-papilläres Adeno-Karzinom, 20x vergrössert, immunhistochem. Darstellung von Calpain 2

D Präparat Nr. 3935 , mässig differenziertes serös-papilläres Karzinom, 20x vergrössert, immunhistochem. Darstellung von Calpastatin



A Präparat Nr. 153, benignes Ovar, 20x vergrößert, HE-Färbung

B Präparat Nr. 153, benignes Ovar, 20x vergrößert, immunhistochem. Darstellung von Calpain 1

C Präparat Nr. 1063, benignes Ovar, 20x vergrößert, immunhistochem. Darstellung von Calpain 2

D Präparat Nr. 1063, benignes Ovar, 20x vergrößert, immunhistochem. Darstellung von Calpastatin

5. Diskussion

Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin in benignem und malignem Ovarial- und Endometrium-Gewebe. Es wurde auf eine mögliche Korrelation des Expressionsgrades unserer Enzyme untereinander sowie mit dem Malignitätsgrad und dem Tumorstadium hin untersucht.

Da von Calpainen bereits in zahlreichen anderen Veröffentlichungen über eine Rolle bei unterschiedlichen Tumoren berichtet wurde (wie zum Beispiel dem Prostata-Karzinom [135], Leber [5]- und Nierenzell-Karzinom [15], Hirntumoren [11,46,82], Hauttumoren [85]), liegt die Frage nahe, ob sie auch bei Endometrium- und Ovarialkarzinomen eine Rolle in ihrer Genese spielen. Nach unseren Erkenntnissen liegen bislang noch keine Untersuchungen bzw. Ergebnisse in der Literatur über die Rolle von Calpainen bei Endometrium- und Ovarialkarzinomen vor.

Bei beiden Tumoren sind die genauen molekularen Mechanismen wie es zur Tumorentstehung und -verbreitung kommt, noch nicht geklärt.

Allgemeine Risikofaktoren, die für die Entstehung dieser Karzinome relevant sind, wurden bereits reichlich untersucht. In der Pathogenese des Endometrium-Karzinoms spielt der Östrogen-Einfluss, eine frühe Menarche, späte Menopause sowie das PCO (polycystisches Ovar) eine Rolle.

Beim Ovarial-Karzinom sind dies eine positive Familienanamnese, ständige Ovulationen und chemische Karzinogene [97].

Calpaine sind bislang noch nicht als Risikofaktoren unserer zwei untersuchten Tumoren beschrieben worden.

Wir setzten es uns zum Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, welche Bedeutung den Calpainen 1, 2 und dessen Inhibitor Calpastatin in den Karzinomen zukommt. Vor allem aber interessiert uns auch, ob im Calpain-System mögliche Ansatzpunkte für eine neue Therapie zu finden sind. Für maligne Melanome ist bereits beschrieben worden, dass sich über das Calpain-System neue therapeutische Optionen ergeben können [84].

5.1. Diskussion der Methodik

Die Immunfluoreszenz-Färbung wurde 1941 durch den Mikrobiologen Albert Coons et al. eingeführt und stellt die älteste Variante der Immunhistochemie dar. Dank ihrer Hilfe ist es uns möglich geworden, die Expression der Enzyme Calpain 1, 2 und Calpastatin darzustellen.

Die indirekte Streptavidin-Biotin-Färbemethode wurde als immunhistochemisches Verfahren zur Darstellung unserer gewünschten Enzyme Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin an Paraffinschnitten ausgewählt. Sie besitzt eine hohe Sensitivität.

Unsere untersuchten Gewebearten sind wie der weitaus größte Anteil immunhistochemisch zu bearbeitende Proben ebenfalls in Paraffin eingebettet. Diese Einbettung hat den Vorteil, dass die Struktur des Präparates gut erhalten bleibt und dieses somit gut zu beurteilen ist. Allerdings wird die Antigenität hierbei stärker als bei den Gefrierschnitten beeinträchtigt (vor allem Oberflächenantigene können in Gefrierschnitten besser lokalisiert werden).

Weitere Nachteile sind unspezifische Hintergrundfärbungen. Sie sind gewöhnlich in Kollagen und Bindegewebe vorzufinden. Sie kommen vor, wenn Teile des Gewebes nicht der Fixativ-Lösung ausgesetzt wurden oder die Präparate einfach zu groß sind, so dass keine vollständige Penetration des Fixationsmittels möglich ist. Daher ist eine gute Auswahl der Präparate vor dem Färben sinnvoll.

Sollte ein Präparat austrocknen, bevor es in Fixationslösung getan wurde, kommt es vor allem an den Rändern zu unspezifischen Reaktionen. Aus diesem Grunde sollten vor allem die Randbereiche der Präparate nicht mit in die Bewertung mit einfließen.

Positive Anfärbungen von nekrotischen oder zerquetschten Zellen sind immer unspezifisch. Um diese zu vermeiden bzw. zu verringern sollte man vorab eine gute Auswahl seiner Präparate treffen. In diesem Fall ist dank der Hilfe von Pathologen (Frau Dr. Dohmen) unter Begutachtung der HE-Schnitte eine Auswahl an repräsentativen Gewebeschnitten erfolgt.

Nicht antigenspezifische Anfärbungen können durch Peroxidase-Aktivität des Häm-Moleküls der Erythrozyten verursacht sein. Endogene Peroxidase-Aktivität ist vor allem in roten und weißen Blutkörperchen vorzufinden. Blockierbar ist diese durch Zugabe von 30%iger H₂O₂-Lösung. Daraus folgt eine Erhöhung der Spezifität.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Zu dem jetzigen Zeitpunkt sind unseres Wissens nach in der Literatur noch keine vergleichbaren Arbeiten über Untersuchungen von Calpain-Expressionen in Endometrium- und Ovarialkarzinomen bekannt, welche auf mögliche Zusammenhänge zwischen malignem und benignem Gewebe oder Tumorstadien hin untersuchten. Für andere Tumoren, so geschehen bei Hauttumoren (Epithelzellkarzinomen und Basalzellkarzinomen) liegen bereits Ergebnisse vor. So ist in einem Vergleich der zwei oben genannten Tumoren hinsichtlich der Expression von Calpain 1 und Calpain 2 eine deutlich reduzierte Immunreaktivität für Calpain 1 in den Basalzellkarzinomen herausgekommen.

5.2.1. Zusammenhang zwischen histopathologischen Daten der Tumoren und Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Da wie bereits schon erwähnt, den Calpainen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen wie Karzinogenese, Zellmigration und Tumorausdehnung zugesprochen wird, ist es nur verständlich, dass wir auch hier versuchen, mögliche Korrelationen mit histopathologischen Tumordaten aufzudecken.

5.2.1.1. Tumorstadium (pT)

Das Tumorstadium der Ovarialkarzinome korrelierte nicht mit der Expression unserer Enzyme Calpain 1, 2 und Calpastatin. Auch bei den malignen Endometrium-Geweben ergaben sich in unseren Tests keine statistischen Signifikanzen.

5.2.1.2. Lymphknotenstatus (pN)

Da allen unseren untersuchten Endometrium-Geweben der Lymphknotenstatus N0 zugeordnet wurde, konnte hier keine Aussage gemacht werden über mögliche Zusammenhänge.

Für das Ovarial-Karzinom zeigte sich mit zunehmendem N-Stadium eine geringere Farbeintensität (SI) von Calpain 2 (SI (Cal2) x N: $p=0,026$). Für Calpain 1 und Calpastatin konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen im Vergleich zwischen der Immunreaktivität und dem Lymphknotenstatus aufgezeigt werden.

Eine vergleichbare Studie, allerdings über Calpain (PCR-Untersuchungen), untersuchte dessen Expression in menschlichen Nierenzell-Karzinomen auf eine Korrelation mit dem

Lymphknoten-Status und dem histologischen Typ des Tumors. Hierbei zeigte sich mit zunehmendem Differenzierungsgrad des Tumors eine verminderte Calpain 1-Expression. Des Weiteren zeigte sich bei Patienten mit Klarzellkarzinomen, welche keine Lymphknotenmetastasierung aufwiesen eine quantitativ geringere Calpain 1-mRNA-Expression als bei Patienten mit einem bereits vorhandenen Lymphknotenbefall. Man geht davon aus, dass hier erhöhte Calpain-Level zu einer Streuung der Tumorzellen in die Lymphknoten führen und somit Calpain 1 als ein Prognosefaktor für Klarzellkarzinome anzusehen ist [15].

5.2.1.3. Grading (Malignitätsgrad)

Für das endometriale Gewebe ließen sich keine statistischen Signifikanzen aufweisen. Das Ovarial-Gewebe hingegen wies sowohl für die Färbintensität (SI (Cal1) x G: $p=0,007$) als auch den Immunreaktiven Score (IRS (Cal1) x G: $p=0,025$) von Calpain 1 eine statistische Signifikanz bezüglich der Korrelation mit dem Malignitätsgrad auf. Mit zunehmendem Malignitätsgrad korrelierten eine erniedrigte Färbintensität und ein erniedrigter Immunreaktiver Score.

Diese Ergebnisse ähneln denen einer Studie über Nierenzellkarzinome. Hierbei konnten mit zunehmendem Malignitäts-Charakter (in der Reihenfolge Onkozytom > chromophobes Karzinom > papilläres und Klarzellkarzinom) eine abnehmende Expression von Calpain 1 dargestellt werden. Eine extrem hohe Calpain 1-Expression fand sich in den benignen Onkozytomen [15]. Bezüglich Calpain 2 und Calpastatin ließen sich keine statistisch signifikanten Korrelationen mit dem Malignitätsgrad nachweisen.

Es ist bekannt, dass p53 (ein Tumorsuppressorprotein) bei der Pathogenese verschiedener Tumoren eine wichtige Rolle spielt. Von den bei Karzinomen entdeckten Mutationsdefekten ist die in p53 die am häufigsten. p53 ist ein Substrat der Calpaine. Inhibitoren von Calpain wirken somit stabilisierend auf p 53 und können den p53-Level steigern und so ein Tumorwachstum vermindern. Dies konnte 2001 von Benetti et al gezeigt werden. In MCF-7- (Brustkrebs) und RKO-Zellen (Kolonkarzinom) wurde eine Steigerung des endogenen p53-Levels durch den Einsatz von Calpain-Inhibitor I und II erwirkt [50].

Durch Calpain-Inhibitoren konnte eine Hemmung der β 1- und β 3-integrin-vermittelte Zell-Wanderung durch eine Festigung der zytoskelettalen Bindung nachgewiesen werden. Die Inhibitoren insbesondere stabilisieren die Zell-Adhäsion, erhöhen die Bindungskraft und vermindern die Zell-Löslösungsrate.

Daher wurde es als eine Möglichkeit angesehen, die pathologische Zell-Wanderung (wie zum Beispiel die Tumor-Metastasierung) zu behandeln, indem man Calpain-Inhibitoren zum Einsatz bringt [39]. Ebenfalls belegt ist, dass eine Inhibition von Calpain die Motilität von Fibroblasten und Myofibroblasten hemmt [31].

Ebenso hofft man, einen Therapieansatz bei der Behandlung des Prostata-Karzinoms gefunden zu haben. Hier sollen ebenfalls Calpain-Inhibitoren zum Einsatz kommen und über die $\beta 1 C$ -Untereinheit von Integrin eine pathologische Zellmigration wie die Tumor-Metastasierung verhindern [70].

Calpain-Inhibitoren verursachen in Prostata-Karzinomen vermehrt Apoptose. Dies konnte in einer Studie dargestellt werden [135].

In der Mehrheit von Ovarial- und Brustkrebszellen ist ARHI, ein putatives Tumorsuppressorgen herunterreguliert. Durch eine Reexpression von ARHI über einen Calpain-abhängigen Weg in Tumoren mit fehlender Expression kam es zu einem gehemmten Tumor-Wachstum, einer erniedrigten Invasivität und Apoptose wurde induziert.

5.2.2. Vergleich der Enzym-Expression von normalem Gewebe mit Karzinom-Gewebe

Endometrium-Karzinom und benignes Endometrium-Gewebe

Für Calpain 1 und Calpain 2 ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit der Dignität des Gewebes. Alle signifikanten Werte bezogen sich ebenso wie beim Ovarial-Gewebe nur auf das Enzym Calpastatin.

Das endometriale Gewebe zeigte in 89 % eine positive zytoplasmatische Immunreaktivität für Calpain 1, 2 und Calpastatin. Lediglich drei der benignen und ein malignes Endometrium-Gewebe wiesen keine Immunreaktivität auf.

Die Immunreaktivität für Calpain 1 lag beim Ovarial-Karzinom (Mittelwert IRS Calpain 1: 6,89) im Durchschnitt etwas über der beim entsprechenden benignen Gewebe (Mittelwert IRS Calpain 1: 5,88), ergab aber keine statistische Signifikanz.

Calpain 2 zeigte sowohl für malignes (Mittelwert IRS Calpain 2: 8,51) als auch benignes (Mittelwert IRS Calpain 2: 8,51) Gewebe in etwa gleich hohe Immunreaktivität.

Im endometrialen Gewebe korrelierte die Anzahl der positiven Zellen bezüglich Calpastatin statistisch signifikant mit der Gewebe-Dignität (Mittelwert PP Calpastatin Endometrium-Karzinom: 83,17; Mittelwert PP Calpastatin Endometrium benigne: 71,27; $p=0,037$). Es zeigten sich hier im Gegensatz zum Ovarial-Gewebe in den benignen Präparaten eine niedrigere Anzahl positiver Zellen als in dem entsprechenden malignen.

Ovarial-Karzinom und benignes Ovarial-Gewebe

Für Calpain 1 und Calpain 2 ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit der Dignität des Gewebes. Alle signifikanten Werte bezogen sich auf das Enzym Calpastatin. 92 % der untersuchten Ovarial-Gewebe zeigten eine positive Immunreaktivität für Calpain 1, 2 und Calpastatin. Es fielen vier benigne Ovarial-Gewebe aufgrund negativer Immunreaktivität heraus.

Für Calpain 1 lagen die Werte der Immunreaktivität des Ovarial-Karzinoms (Mittelwert IRS Calpain 1: 8,75) im Mittel etwas höher als die des benignen Ovars (Mittelwert IRS Calpain 1: 7,83). Es ergaben sich aber keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Eine Studie über Basal- und Epithelzellkarzinome konnte ebenso im Vergleich mit benignen Geweben keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Calpain 1 Expression entdecken [85].

Calpain 2 zeigte im Ovarial-Karzinom (Mittelwert IRS Calpain 2: 7,6) durchschnittlich eine höhere Immunreaktivität als in dem entsprechenden benignen Ovar (Mittelwert IRS Calpain 2: 6,9). Der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

Der Chi-Quadrat-Test deckte für das Enzym Calpastatin im Ovarial-Karzinom eine signifikant schwächere Färbeintensität im Vergleich zum benignen Gewebe auf (Mittelwert SI Calpastatin Ovarial-Karzinom: 2,3; Mittelwert SI Calpastatin Ovar: 2,9; $p=0,007$). Der Mann-Whitney-Test brachte einen statistische Signifikanz für die Anzahl positiver Zellen (Mittelwert PP Ovarial-Karzinom: 90,15; Mittelwert PP Ovar: 94,5; $p=0,001$) sowie den Immunreaktiven Score (Mittelwert IRS Ovarial-Karzinom: 9,2; Mittelwert IRS Ovar: 11,6; $p=0,005$) im Vergleich mit der Gewebe-Dignität des Ovars zutage. Sowohl die Anzahl der positiven Zellen als auch der Immunreaktive Score waren in den malignen Geweben niedriger bzw. weniger ausgeprägt als in den dazugehörigen benignen Geweben.

Es konnten für die benignen als auch die malignen Gewebeproben eine Immunreaktivität hinsichtlich Calpain 1, 2 und Calpastatin nachgewiesen werden.

In Bezug auf das Endometrium-Gewebe war der Wert für die Anzahl positiver Zellen für Calpastatin statistisch signifikant im Chi-Quadrat-Test. Der Immunreaktive Score des malignen Gewebes lag etwas über dem des benignen, zeigte aber keine statistische Signifikanz. Daher ist es fraglich, ob dieser eine Wert eine korrekte Aussage machen kann und in wie weit er für uns von Bedeutung ist. Es sollten sich weitere Untersuchungen anschließen und auch die mRNA-Expression getestet werden. So geschehen bei einer Studie über Hauttumoren. Hier konnte immunhistochemisch eine erniedrigte Expression von Calpain 1 in Basalzellkarzinomen gefunden werden, in der Polymerasekettenreaktion aber erhöhte Level von Calpain 1- und 2-mRNA in Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen gegenüber der normalen Haut [⁸⁵].

Anders hingegen sieht es beim Ovarial-Gewebe aus. Da konnten sowohl für den Immunreaktiven Score als auch für die Anzahl positiver Zellen und die Färbeintensität statistisch signifikante Werte ermittelt werden, so dass dies ein glaubwürdiges Ergebnis darstellt.

5.2.3. Zusammenhang zwischen den Expressionen von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin

Hierbei wurde auf Interaktionen unter den Enzymen selbst hin untersucht. Es ist bereits bekannt, dass Calpastatin der endogene Inhibitor von Calpain 1 und 2 ist. Auch liegen schon Ergebnisse über einige molekulare Mechanismen der Interaktion bzw. Hemmung unter den Enzymen selbst vor. Es stellt sich nun die Frage, ob wir aus unseren Untersuchungen neue Erkenntnisse über das Calpain-System bezüglich Endometrium- und Ovarialkarzinom gewinnen können.

Um mögliche Zusammenhänge zu evaluieren, bedienen wir uns des Chi-Quadrat-Tests und des Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten.

Endometrium-Karzinom und benignes Endometrium-Gewebe

Für die malignen Endometrium-Gewebe zeigten sich signifikante Zusammenhänge im Chi-Quadrat hinsichtlich des Anteils positiv reagierender Zellen zwischen Calpain 1 und Calpain

2 ((PPZZ (C1) x PPZZ (C2): $p=0,002$) sowie zwischen Calpain 1 und Calpastatin (PPZZ (C1) x PPZZ (CA): $p=0,025$). Es korrelierten höhere Werte von Calpain 1 mit höheren Werten von Calpain 2 beziehungsweise Calpastatin.

Auch bei den gutartigen Gewebeproben ergaben sich im Chi-Quadrat statistische Signifikanzen. Hier war dies der Fall für die Färbeintensität im Vergleich von Calpain 2 mit Calpastatin (SI (C2) x SI (CA): $p=0,039$) und für den Anteil positiv reagierender Zellen im Vergleich von Calpain 1 mit Calpain 2 (PPZZ (C1) x PPZZ (C2): $p=0,015$).

Der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient zeigte allenfalls mäßige Korrelationen an. Hinsichtlich der p-Werte ergaben sich statistische Signifikanzen für das Endometrium-Karzinom. So ging eine höherer Anteil an positiven Zellen von Calpain 1 mit einem erhöhten Anteil positiver Zellen an Calpastatin einher (PPGZ (C1) x PPGZ (CA): $p=0,001$, $r=0,579$). Im benignen Endometrium-Gewebe korrelierten ein erhöhter IRS von Calpain 1 mit einem erhöhten IRS von Calpain 2 (IRS (C1) x IRS (C2): $p=0,040$, $r=0,488$). Höhere IRS-Werte von Calpain 1 gingen mit höheren IRS-Werten von Calpastatin (IRS (C1) x IRS (CA): $p=0,032$, $r=0,508$) einher.

Der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient zeigte in allen oben genannten Fällen nur eine mäßige Korrelation ($0,4 > r > 0,7$) an. Somit sind die Ergebnisse nicht eindeutig zu verwerten und es lassen sich keine Rückschlüsse auf die Interaktionen im Calpain-System ziehen.

Ovarial-Karzinom und benignes Ovarial-Gewebe

Der Chi-Quadrat-Test konnte für das Ovarial-Karzinom keine statistisch signifikanten Zusammenhänge anzeigen. Im benignen Ovarialgewebe hingegen ist beim Vergleich der Färbeintensitäten von Calpain 1 und Calpain 2 eine Korrelation aufgefallen (SI (C1) x SI (C2): $p=0,031$). Es ging eine stärkere Färbeintensität von Calpain 1 mit einer stärkeren Färbeintensität von Calpain 2 einher.

Der Spearman-Korrelationskoeffizient für Ovar und Ovarialkarzinom war überwiegend schwach. Hinsichtlich der p-Werte ergaben sich statistische Signifikanzen für den Zusammenhang zwischen IRS von Calpain 1 und 2 ($p=0,04$) sowie Calpastatin ($p=0,032$). Ebenfalls unter 0,05 lag der p-Wert von der Anzahl positiver Zellen von Calpain 1 und dem IRS von Calpain 2 ($p=0,024$). All diese Zusammenhänge zeigten aber nur eine mäßige

Korrelation an, so dass auch hier über den Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten kein eindeutiger Rückschluss auf das Calpain-Calpastatin-System zu ziehen ist.

Abschließend können wir die zu Beginn der Arbeit gestellten Fragen wie folgt beantworten:

1. Es ist uns gelungen, in Ovarial-Karzinomen, benignen Ovarial-Geweben, Endometrium-Karzinomen sowie in den entsprechenden benignen Geweben die Enzyme Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin mit einer immunhistochemischen Methode darzustellen.

2. Untersucht man die Gewebeproben auf einen Zusammenhang zwischen Expression der Enzyme und histopathologischen Tumordaten, so findet sich eine statistische Signifikanz bei den Ovarialkarzinomen

-> mit steigendem Malignitätsgrad sank die Färbeintensität und der Immunreaktive Score von Calpain 1.

-> mit positivem Lymphknotenstatus sank die Färbeintensität von Calpain 2.

3. Bei dem Vergleich von benignem mit malignem Gewebe bezüglich der Expression von Calpain 1, Calpain 2 und Calpastatin konnten statistisch signifikante Unterschiede nur hinsichtlich des Enzyms Calpastatin festgestellt werden, und hier vor allem für das ovarielle Gewebe.

-> Sowohl die Färbeintensität, der Immunreaktive Score sowie die Expression des Enzyms waren in Ovar-Karzinom-Geweben vermindert.

-> In Endometrium-Karzinomen fand sich eine vermehrte Expression von Calpastatin.

4. Im Vergleich der Expression von Calpain 1, 2 und Calpastatin zueinander stellten wir nur mäßige Korrelationen fest.

Unsere herausgefundenen Daten, hinzugefügt zu den bereits bekannten Funktionen der Calpaine, lassen auf eine wichtige Rolle dieser Enzyme hinsichtlich Progression und Malignität von Tumoren schließen. Es ist bereits weithin bekannt, dass das Calpain-System mit Calpain 1, 2 und seinem Antagonisten Calpastatin in verschiedene Vorgänge bei der

Tumorgenese mit verwickelt ist, so zum Beispiel bei Apoptose oder der Zellmigration. Allerdings konnte auch in dieser Studie noch keine definitive Aufgabe den Calpainen zugeordnet werden. Da es noch viele Calpain-Substrate zu identifizieren gibt als auch noch nicht die genaue Funktion des Calpain-Systems bekannt ist, sind weiterführende Studien nötig um bessere Aussagen über die Funktion der Calpaine in Ovarial- und Endometrium-Karzinomen bzw. anderen Tumoren zu definieren und um eine klinische Relevanz zu testen.

References

- 1 Akiyama M, Dale BA, Smith LT, Shimizu H, Holbrook KA. Regional difference in expression of characteristic abnormality of harlequin ichthyosis in affected fetuses. *Prenat Diagn* 1998;18:425-436.
- 2 Anagli J, Vilei EM, Molinari M, Calderara S, Carafoli E. Purification of active calpain by affinity chromatography on an immobilized peptide inhibitor. *Eur J Biochem* 1996;241:948-954.
- 3 Ando Y, Miyachi Y, Imamura S, Kannagi R, Murachi T. Purification and characterization of calpains from pig epidermis and their action on epidermal keratin. *J Invest Dermatol* 1988;90:26-30.
- 4 Andresen K, Tom TD, Strand M. Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 1991;266:15085-15090.
- 5 Arora AS, de Groen PC, Croall DE, Emori Y, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma cells resist necrosis during anoxia by preventing phospholipase-mediated calpain activation. *J Cell Physiol* 1996;167:434-442.
- 6 Arthur JS, Crawford C. Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1996;1293:201-206.
- 7 Atencio IA, Ramachandra M, Shabram P, Demers GW. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ* 2000;11:247-253.
- 8 Averna M, De TR, Capini P, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E. Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca(2+)-dependent proteolysis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2669-2678.
- 9 Bao JJ, Le XF, Wang RY, Yuan J, Wang L, Atkinson EN, LaPushin R, Andreeff M, Fang B, Yu Y, Bast RC, Jr. Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway. *Cancer Res* 2002;62:7264-7272.
- 10 Bartus RT, Baker KL, Heiser AD, Sawyer SD, Dean RL, Elliott PJ, Straub JA. Posts ischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:537-544.
- 11 Behrens MM, Martinez JL, Moratilla C, Renart J. Apoptosis induced by protein kinase C inhibition in a neuroblastoma cell line. *Cell Growth Differ* 1995;6:1375-1380.
- 12 Bi X, Chang V, Siman R, Tocco G, Baudry M. Regional distribution and time-course of calpain activation following kainate-induced seizure activity in adult rat brain. *Brain Res* 1996;726:98-108.

- 13 Blanchard H, Grochulski P, Li Y, Arthur JS, Davies PL, Elce JS, Cygler M. Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat Struct Biol* 1997;4:532-538.
- 14 Bolli R, Cannon RO, Speir E, Goldstein RE, Epstein SE. Role of cellular proteinases in acute myocardial infarction. I. Proteolysis in nonischemic and ischemic rat myocardium and the effects of antipain, leupeptin, pepstatin and chymostatin administered in vivo. *J Am Coll Cardiol* 1983;2:671-680.
- 15 Braun C, Engel M, Seifert M, Theisinger B, Seitz G, Zang KD, Welter C. Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. *Int J Cancer* 1999;84:6-9.
- 16 Busch WA, Stromer MH, Goll DE, Suzuki A. Ca²⁺-specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. *J Cell Biol* 1972;52:367-381.
- 17 Carafoli E, Molinari M. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:193-203.
- 18 Cottin P, Vidalenc PL, Merdaci N, Ducastaing A. Evidence for non-competitive inhibition between two calcium-dependent activated neutral proteinases and their specific inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1983;743:299-302.
- 19 Crawford C, Brown NR, Willis AC. Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin. *Biochem J* 1993;296 (Pt 1):135-142.
- 20 Croall DE, Chacko S, Wang Z. Cleavage of caldesmon and calponin by calpain: substrate recognition is not dependent on calmodulin binding domains. *Biochim Biophys Acta* 1996;1298:276-284.
- 21 Croall DE, DeMartino GN. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 1991;71:813-847.
- 22 David LL, Shearer TR, Shih M. Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem* 1993;268:1937-1940.
- 23 de Rosbo NK, Bernard CC. Multiple sclerosis brain immunoglobulins stimulate myelin basic protein degradation in human myelin: a new cause of demyelination. *J Neurochem* 1989;53:513-518.
- 24 Earnest JP, Santos GF, Zuerbig S, Fox JE. Dystrophin-related protein in the platelet membrane skeleton. Integrin-induced change in detergent-insolubility and cleavage by calpain in aggregating platelets. *J Biol Chem* 1995;270:27259-27265.
- 25 Edmunds T, Nagainis PA, Sathe SK, Thompson VF, Goll DE. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1991;1077:197-208.
- 26 Emons G. Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2006. In Deutsche Krebsgesellschaft e.V., editor. Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2006. Zuckschwerdt Verlag, 2006.

- 27 Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Imahori K, Suzuki K. Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3590-3594.
- 28 Figueiredo-Pereira ME, Banik N, Wilk S. Comparison of the effect of calpain inhibitors on two extralysosomal proteinases: the multicatalytic proteinase complex and m-calpain. *J Neurochem* 1994;62:1989-1994.
- 29 Fox JE. On the role of calpain and Rho proteins in regulating integrin-induced signaling. *Thromb Haemost* 1999;82:385-391.
- 30 Garach-Jehoshua O, Ravid A, Liberman UA, Reichrath J, Glaser T, Koren R. Upregulation of the calcium-dependent protease, calpain, during keratinocyte differentiation. *Br J Dermatol* 1998;139:950-957.
- 31 Glading A, Chang P, Lauffenburger DA, Wells A. Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 2000;275:2390-2398.
- 32 Gonen H, Shkedy D, Barnoy S, Kosower NS, Ciechanover A. On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Lett* 1997;406:17-22.
- 33 Guroff G. A NEUTRAL, CALCIUM-ACTIVATED PROTEINASE FROM THE SOLUBLE FRACTION OF RAT BRAIN. *J Biol Chem* 1964;239:149-155.
- 34 Hao LY, Kameyama A, Kuroki S, Takano J, Takano E, Maki M, Kameyama M. Calpastatin domain L is involved in the regulation of L-type Ca²⁺ channels in guinea pig cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:756-761.
- 35 Hiddemann W, Huber H, Bartram CR. Die Onkologie. In Hiddemann W, Huber H, Bartram CR, editors. *Die Onkologie*. Berlin: Springer Verlag, 2004:1058-1089.
- 36 Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, Del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000;26:163-175.
- 37 Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* 2001;7:355-362.
- 38 Huston RB, KREBS EG. Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca²⁺. II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochemistry* 1968;7:2116-2122.
- 39 Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, Zhang W, Mellgren RL, Lauffenburger DA, Ginsberg MH, Horwitz AF. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem* 1997;272:32719-32722.

- 40 Inomata M, Hayashi M, Ohno-Iwashita Y, Tsubuki S, Saïdo TC, Kawashima S. Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 1996;328:129-134.
- 41 Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* 1977;252:7610-7616.
- 42 Ishiura S, Murofushi H, Suzuki K, Imahori K. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization. *J Biochem (Tokyo)* 1978;84:225-230.
- 43 Kawasaki H, Emori Y, Imajoh-Ohmi S, Minami Y, Suzuki K. Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease. *J Biochem (Tokyo)* 1989;106:274-281.
- 44 Kawasaki H, Emori Y, Suzuki K. Calpastatin has two distinct sites for interaction with calpain--effect of calpastatin fragments on the binding of calpain to membranes. *Arch Biochem Biophys* 1993;305:467-472.
- 45 Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashita T, Saïdo TC, Yamasaki T, Moritake K, Saya H, Nakao M. The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med* 1998;4:915-922.
- 46 Kimura Y, Saya H, Nakao M. Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. *Neuropathology* 2000;20:153-160.
- 47 Kishimoto A, Kajikawa N, Shiota M, Nishizuka Y. Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J Biol Chem* 1983;258:1156-1164.
- 48 Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, Nishizuka Y. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J Biol Chem* 1989;264:4088-4092.
- 49 Kondo SI, Kawamura K, Iwanaga J, Hamada M, Aoyagi T. Isolation and characterization of leupeptins produced by Actinomycetes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1969;17:1896-1901.
- 50 Kubbutat MH, Vousden KH. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol* 1997;17:460-468.
- 51 Lane RD, Allan DM, Mellgren RL. A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells. *Exp Cell Res* 1992;203:5-16.
- 52 Lin GD, Chattopadhyay D, Maki M, Wang KK, Carson M, Jin L, Yuen PW, Takano E, Hatanaka M, DeLucas LJ, Narayana SV. Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat Struct Biol* 1997;4:539-547.

- 53 Litersky JM, Johnson GV. Phosphorylation of tau in situ: inhibition of calcium-dependent proteolysis. *J Neurochem* 1995;65:903-911.
- 54 Löffler, G. and Petrides, P. E. *Biochemie und Pathobiochemie*. 778-779. 1997.
Ref Type: Generic
- 55 Ma H, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR. Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:454-461.
- 56 Ma H, Fukiage C, Kim YH, Duncan MK, Reed NA, Shih M, Azuma M, Shearer TR. Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization. *J Biol Chem* 2001;276:28525-28531.
- 57 Ma H, Shih M, Hata I, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR. Lp85 calpain is an enzymatically active rodent-specific isozyme of lens Lp82. *Curr Eye Res* 2000;20:183-189.
- 58 Ma H, Yang HQ, Takano E, Hatanaka M, Maki M. Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J Biol Chem* 1994;269:24430-24436.
- 59 Maki M, Takano E, Osawa T, Ooi T, Murachi T, Hatanaka M. Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1988;263:10254-10261.
- 60 Mathiasen IS, Sergeev IN, Bastholm L, Elling F, Norman AW, Jaattela M. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:30738-30745.
- 61 McGinnis KM, Gnegy ME, Park YH, Mukerjee N, Wang KK. Procaspase-3 and poly(ADP)ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:94-99.
- 62 Mellgren RL. Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. *FEBS Lett* 1980;109:129-133.
- 63 Melloni E, Michetti M, Salamino F, Minafra R, Pontremoli S. Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:193-197.
- 64 Melloni E, Michetti M, Salamino F, Pontremoli S. Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for mu-isoforms. *J Biol Chem* 1998;273:12827-12831.
- 65 Menard HA, el-Amine M. The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1996;17:545-547.
- 66 MEYER WL, FISCHER EH, KREBS EG. ACTIVATION OF SKELETAL MUSCLE PHOSPHORYLASE B KINASE BY CA. *Biochemistry* 1964;3:1033-1039.

- 67 Michel M, Fleckman P, Smith LT, Dale BA. The calcium-activated neutral protease calpain I is present in normal foetal skin and is decreased in neonatal harlequin ichthyosis. *Br J Dermatol* 1999;141:1017-1026.
- 68 Michetti M, Viotti PL, Melloni E, Pontremoli S. Mechanism of action of the calpain activator protein in rat skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1991;202:1177-1180.
- 69 Molinari M, Carafoli E. Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes. *J Membr Biol* 1997;156:1-8.
- 70 Moro L, Perlino E, Marra E, Languino LR, Greco M. Regulation of beta1C and beta1A integrin expression in prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004;279:1692-1702.
- 71 Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC. Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience* 1996;73:979-987.
- 72 Murakami T, Hatanaka M, Murachi T. The cytosol of human erythrocytes contains a highly Ca²⁺-sensitive thiol protease (calpain I) and its specific inhibitor protein (calpastatin). *J Biochem (Tokyo)* 1981;90:1809-1816.
- 73 Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB, Wang KK. Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J* 1996;319 (Pt 3):683-690.
- 74 Nishiura I, Koyama T, Tanaka K, Aii H, Amano S. The occurrence of different types of spinal tumours in one patient. A case report and review of the literature. *Neurochirurgia (Stuttg)* 1989;32:52-55.
- 75 Nixon RA. Calcium-activated neutral proteinases as regulators of cellular function. Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1989;568:198-208.
- 76 Nixon RA. A "protease activation cascade" in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000;924:117-131.
- 77 Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisaragi M, Suzuki K. Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* 1984;312:566-570.
- 78 Oldenburg KR, Hubbell WL. Invertebrate rhodopsin cleavage by an endogenous calcium activated protease. *Exp Eye Res* 1990;51:463-472.
- 79 Ono Y, Sorimachi H, Suzuki K. Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:289-294.
- 80 Pfeleiderer A, Breckwoldt M, Martius G. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2002:201-214.

- 81 Pontremoli S, Melloni E, Salamino F, Sparatore B, Michetti M, Horecker BL. Cytosolic Ca²⁺-dependent neutral proteinases from rabbit liver: activation of the proenzymes by Ca²⁺ and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:53-56.
- 82 Ray SK, Patel SJ, Welsh CT, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiforme: upregulation of calpain and caspase-3. *J Neurosci Res* 2002;69:197-206.
- 83 Reed NA, Castellini MA, Ma H, Shearer TR, Duncan MK. Protein expression patterns for ubiquitous and tissue specific calpains in the developing mouse lens. *Exp Eye Res* 2003;76:433-443.
- 84 Reichrath J, Rech M, Seifert M. Vitamin D-induced apoptosis and melanoma: does calpain represent the major execution protease rather than caspases? *J Pathol* 2003;201:335-336.
- 85 Reichrath J, Welter C, Mitschele T, Classen U, Meineke V, Tilgen W, Seifert M. Different expression patterns of calpain isozymes 1 and 2 (CAPN1 and 2) in squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC) of human skin. *J Pathol* 2003;199:509-516.
- 86 Resing KA, al-Alawi N, Blomquist C, Fleckman P, Dale BA. Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of Ca²⁺ in the second stage. *J Biol Chem* 1993;268:25139-25145.
- 87 Richard I, Broux O, Allamand V, Fougereuse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, . Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995;81:27-40.
- 88 Robinson A. Inhibiting calpain, rescuing cells. *CMAJ* 1996;154:193-195.
- 89 Saido TC, Nagao S, Shiramine M, Tsukaguchi M, Sorimachi H, Murofushi H, Tsuchiya T, Ito H, Suzuki K. Autolytic transition of mu-calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms. *J Biochem (Tokyo)* 1992;111:81-86.
- 90 Saido TC, Shibata M, Takenawa T, Murofushi H, Suzuki K. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 1992;267:24585-24590.
- 91 Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2628-2632.
- 92 Sakai K, Akanuma H, Imahori K, Kawashima S. A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis. *J Biochem (Tokyo)* 1987;101:911-918.
- 93 Salamino F, Sparatore B, De TR, Pontremoli R, Melloni E, Pontremoli S. The calpastatin defect in hypertension is possibly due to a specific degradation by calpain. *Biochim Biophys Acta* 1991;1096:265-269.

- 94 Salvesen G, Parkes C, Abrahamson M, Grubb A, Barrett AJ. Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem J* 1986;234:429-434.
- 95 Sarin A, Adams DH, Henkart PA. Protease inhibitors selectively block T cell receptor-triggered programmed cell death in a murine T cell hybridoma and activated peripheral T cells. *J Exp Med* 1993;178:1693-1700.
- 96 Sato N, Fujio Y, Yamada-Honda F, Funai H, Wada A, Kawashima S, Awata N, Shibata N. Elevated calcium level induces calcium-dependent proteolysis of A-CAM (N-cadherin) in heart--analysis by detergent-treated model. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:649-653.
- 97 Schmidt and Matthiesen. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 482-495. 1992.
Ref Type: Generic
- 98 Sedarous M, Keramaris E, O'Hare M, Melloni E, Slack RS, Elce JS, Greer PA, Park DS. Calpains mediate p53 activation and neuronal death evoked by DNA damage. *J Biol Chem* 2003;278:26031-26038.
- 99 Shi Y, Melnikov VY, Schrier RW, Edelstein CL. Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F509-F517.
- 100 Shiba E, Tsujinaka T, Kambayashi J, Kosaki G. Purification and characterization of Ca²⁺-activated neutral protease inhibitor from human platelets. *Thromb Res* 1983;32:207-214.
- 101 Siman R, Noszek JC, Kegerise C. Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J Neurosci* 1989;9:1579-1590.
- 102 Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1989;264:20106-20111.
- 103 Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca(2+)-binding domain. *J Biol Chem* 1993;268:19476-19482.
- 104 Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 1997;328 (Pt 3):721-732.
- 105 Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K, . Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem* 1995;270:31158-31162.
- 106 Spencer MJ, Mellgren RL. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet* 2002;11:2645-2655.

- 107 Spinedi A, Oliverio S, Di SF, Piacentini M. Calpain involvement in calphostin C-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1489-1492.
- 108 Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994;159:229-237.
- 109 Suzuki K, Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett* 1998;433:1-4.
- 110 Suzuki K, Tsuji S, Kubota S, Kimura Y, Imahori K. Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J Biochem (Tokyo)* 1981;90:275-278.
- 111 Szomor Z, Shimizu K, Fujimori Y, Yamamoto S, Yamamuro T. Appearance of calpain correlates with arthritis and cartilage destruction in collagen induced arthritic knee joints of mice. *Ann Rheum Dis* 1995;54:477-483.
- 112 Takano E, Ma H, Yang HQ, Maki M, Hatanaka M. Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett* 1995;362:93-97.
- 113 Tamai M, Matsumoto K, Omura S, Koyama I, Ozawa Y, Hanada K. In vitro and in vivo inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64. *J Pharmacobiodyn* 1986;9:672-677.
- 114 Theopold U, Pinter M, Daffre S, Tryselius Y, Friedrich P, Nassel DR, Hultmark D. CalpA, a Drosophila calpain homolog specifically expressed in a small set of nerve, midgut, and blood cells. *Mol Cell Biol* 1995;15:824-834.
- 115 Tompa P, Baki A, Schad E, Friedrich P. The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain. *J Biol Chem* 1996;271:33161-33164.
- 116 Torhorst J, Freudenberg N, Riede U-N. Weibliches Genitalsystem und Plazenta. In Riede U-N, Schäfer H-E, editors. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme Verlag, 1999:881-883.
- 117 Torhorst J, Freudenberg N, Riede U-N. Weibliches Genitalsystem und Plazenta. In Riede U-N, Schäfer H-E, editors. *Stuttgart: Thieme Verlag, 1999:864-871*.
- 118 Touyarot K, Poussard S, Cortes-Torrea C, Cottin P, Micheau J. Effect of chronic inhibition of calpains in the hippocampus on spatial discrimination learning and protein kinase C. *Behav Brain Res* 2002;136:439-448.
- 119 Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem (Tokyo)* 1996;119:572-576.
- 120 Tullio RD, Passalacqua M, Averna M, Salamino F, Melloni E, Pontremoli S. Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. *Biochem J* 1999;343 Pt 2:467-472.
- 121 Vanderklish PW, Bahr BA. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol* 2000;81:323-339.

- 122 Wang KK. Developing selective inhibitors of calpain. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:139-142.
- 123 Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference?, by Kevin K.W. Wang. Vol. 23, pp. 20-26. *Trends Neurosci* 2000;23:59.
- 124 Wang KK, Nath R, Posner A, Raser KJ, Buroker-Kilgore M, Hajimohammadreza I, Probert AW, Jr., Marcoux FW, Ye Q, Takano E, Hatanaka M, Maki M, Caner H, Collins JL, Fergus A, Lee KS, Lunney EA, Hays SJ, Yuen P. An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6687-6692.
- 125 Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV, Keegan M, Herzog L, Allen H. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:187-196.
- 126 Wang KK, Villalobo A, Roufogalis BD. Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem J* 1989;262:693-706.
- 127 Wang KK, Yuen PW. Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:412-419.
- 128 Waxman L, KREBS EG. Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem* 1978;253:5888-5891.
- 129 Wittekind, C. and Wagner, G. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 1997. Ref Type: Generic
- 130 Yamazaki M, Ishidoh K, Suga Y, Saido TC, Kawashima S, Suzuki K, Kominami E, Ogawa H. Cytoplasmic processing of human profilaggrin by active mu-calpain. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:652-656.
- 131 Yang HQ, Ma H, Takano E, Hatanaka M, Maki M. Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of mu-calpain large subunit. *J Biol Chem* 1994;269:18977-18984.
- 132 Yoshida H, Murachi T, Tsukahara I. Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, in bovine lens. *FEBS Lett* 1984;170:259-262.
- 133 Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K. A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *FEBS Lett* 1995;358:101-103.
- 134 Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K. Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:376-383.
- 135 Zhu W, Murtha PE, Young CY. Calpain inhibitor-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:1130-1137.

7. Abkürzungen

° C	Grad Celsius
μ	Mikro
Aceton	Aceton benzolfrei, Hedinger GmbH & Co
ARHI	Ras homologue I
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
Ca	Calpastatin
CAPN 1, Cal 1	Calpain 1, m-Calpain
CAPN 2, Cal 2	Calpain 2, μ-Calpain
CDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
Cl	chain large
Cs	chain small
CT	Computertomographie
C-terminal	carboxyterminal
DAB	3,3-Diaminobenzidin (50 x Concentrate), Chemicon, ES 005
DAB-Buffer	(10 x Concentrate); Chemicon, ES 010
DAB-Tabletten für ICA	Abbott, 3087 E
3-(Triethoxysilyl)-propylamine	Merck-Schuchardt, 213-048-4
EF	E-Helix, F-Helix
Entellan	Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie Esomeregemisch; Merck
Ethanol	Ethanol, vergällt mit 1 % Ethylmethylketon; Merck, 200-578-6
FG	Fischgelatine
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie

	et d' Obstétrique
G	Grading
Gelatin	Teleostean gelatin from cold water fish Skin; Sigma Chemical CO, G-7765
GnRH	Gonadotropes releasing hormon
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie; Merck
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
HCl	Wasserstoffchlorid
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
Hühner-Albumin	Fluka, 5461
IRS	Immunreaktiver Score
i.v.	intravenös
IVP	intravenöse Pyelographie
Kaninchen-Anti-Calpain II	large subunit, polyklonaler Antikörper; Chemicon, AB 1625
Kaninchenimmunglobuline/Biotin	Dako, E-0432
Kaninchen-Serum normal	Dako A/S, X-0902
KDa	Kilodalton, Einheit der Molekularmasse
Maus-Anti-Calpain I	large subunit, monoklonaler Antikörper; Chemicon, MAB 3082
Maus-Anti-Calpastatin	monoklonaler Antikörper; Chemicon, MAB 3084
Mausimmunglobuline/Biotin	(Kaninchen F(ab') ₂); Dako, E-0413
MCF	Human breast adenocarcinoma cell line
MRT	Magnetresonanztomographie

7. Abkürzungen

n	Anzahl
N-terminal	aminoterminal
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PH	potentia hydrogenii
pN	Metastasierungsgrad in Lymphknoten
PP	Prozentzahl positiver Zellen
PPGZ	Anzahl der als positiv gewerteten Zellen, angegeben in Prozent
PPZZ	Anzahl der als positiv gewerteten Zellen, umgerechnet in den Score nach Remmele und Stegner
pT	Tumorstadium
RKO	rectal carcinoma cell line
RNA	Ribonucleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS-Elektrophorese	Natriumlaurylsulfat
SI	staining intensity (Färbeindex)
Streptavidin-HRP	Streptavidin-Meerrettichperoxidase- Komplex; Dako, P-0397
Substratreagenz für ICA	Abbott, 3087 F
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasierung (internationale Stadieneinteilung von malignen Tumoren)
TRIZMA-Base	Tris(hydrxymethyl)aminomethan; Sigma Chemical CO, T-3253
Vgl.	Vergleich

7. Abkürzungen

Xylol

Isomergemisch; Hedinger, 215-535-7

Ziegen-Serum normal

Dako A/S, X-0907

Herrn Prof. Dr. Drs. h.c. W. Schmidt, dem Direktor der Universitätsfrauenklinik Homburg/Saar, danke ich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die Bereitstellung eines Laboratoriumplatzes an seiner Klinik

Herrn Prof. Dr. med. M. Friedrich, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Klinikum Krefeld, danke ich für seine stetige fachliche Betreuung und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. med. B. Dohmen, Pathologin an dem pathologischen Institut in Kaiserslautern, danke ich für Ihre allzeitige Bereitschaft und Hilfe bei der Auswahl und Begutachtung der histologischen Schnitte.

Herrn Prof. Dr. med. R. M. Bohle, dem Direktor des Pathologischen Institutes der Universität des Saarlandes, bin ich zu Dank verpflichtet für die Überlassung der Gewebeblöcke, HE-Schnitte und der histopathologischen Befunde.

Allen Mitarbeiterinnen des Labors der Universitätsfrauenklinik Homburg/Saar, insbesondere Frau Nicole Wörner und Frau Barbara Linxweiler, danke ich für ihre Unterstützung und Beratung bei der praktischen Durchführung der immunhistologischen Färbungen.

Herrn Dipl.-Math. Dr. T. Georg aus dem Institut für Medizinische Biomathematik, Epidemiologie und Medizinische Informatik Homburg/Saar danke ich für seine kompetente Beratung bei der Auswahl und Durchführung des statistischen Test und der Auswertung der Ergebnisse.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Sie haben mir dieses Studium und somit auch die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht.

9. Lebenslauf

Vor- und Zuname	Iris Fromberg
Anschrift	Gudesbergstr. 10 66606 St.Wendel Tel.: 06851-4511 e-mail: irisfromberg@gmx.de
Geburtsdatum	23.05.1978
Geburtsort	Neunkirchen
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet
Eltern	Name des Vaters: Dr. Gunter Fromberg Name der Mutter: Silvia Fromberg
Anzahl der Geschwister	2
Schulbildung	1984 – 88 Grundschule St.Anna 1988 – 97 Gymnasium Wendalinum 1997 Abitur
Studium	ab 1997 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes / Homburg August 1999: Ärztliche Vorprüfung August 2000: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung August 2002: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung November 2003: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Beruflicher Werdegang	01.01.2004 – 30.09.2004: Ärztin im Praktikum an der Universitätsaugenklinik Homburg / Saar 01.10.2004 – 30.09.2006: Assistenzärztin an der Universitätsaugenklinik Homburg / Saar Seit 01.10.2006: Assistenärztin in der Gemeinschaftspraxis Dr. G. Fromberg & D. Fromberg in St. Wendel Seit 05.02.2009: Fachärztin für Augenheilkunde