

**Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

Untersuchung von Expression und prognostischer Relevanz von cellular-retinoic-acid-binding protein 2 (CRABP2), retinoic-acid-receptor α (RAR α), Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR) bei benignen und malignen Ovarialtumoren

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**vorgelegt von
Niklas Frank Jüngling
aus Bad Honnef
Kiel (2018)**

1. Berichterstatter: Privat-Dozentin Dr. med. Marion Tina van Mackelenbergh

2. Berichterstatter: Privat-Dozent Dr. Sebastian Hinz

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 19.11.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1.0 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Ätiologie	2
1.4 Symptomatik und Diagnostik	4
1.5 Histologische Klassifikation	4
1.6 Klassifikation	5
1.7 Grading	7
1.8 Therapie	7
1.9 Prognose	8
2. Hintergrund der Arbeit	9
2.1 Retinsäurestoffwechsel	10
2.1.2 Cellular-retinoic-acid-binding Protein 2 (CRABP2)	11
2.1.3 Retinoic-acid-rezeptor α (RAR α)	11
2.2 Sexualhormone	12
2.2.1 Östrogenrezeptor (ER)	12
2.2.2 Progesteronrezeptor (PR)	13
2.3 Proliferationsmarker Ki-67	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Gewebeproben und klinische Daten	15
3.2 Tissue Micro Arrays	15
3.3 Immunhistochemische Färbung	16
3.4 Labormaterialien	16
3.4.1 Materialien und Geräte	17
3.4.2 Chemikalien	18
3.4.3 Pufferlösungen	18
3.4.3 Verwendete primäre Antikörper	19
3.5 Schneiden der TMAs	20
3.6 Färbeprotokolle für CRABP2 und RAR α	20
3.6.1 Deparaffinierung der Schnitte	20
3.6.2 Antigendemaskierung und Blockierung der endogenen Peroxidase	20
3.6.3 Reduzierung der Hintergrundfärbung - primärer Antikörper	21
3.6.4 Sekundärer Antikörper - Farbumschlagsreaktion	21
3.6.6 Gegenfärbung und Fertigstellung der Präparate	21
3.6.7 Negativkontrolle	22

3.7 Färbeprotokoll für ER, PR und Ki-67	22
3.8 Auswertung des Färbeergebnisses	23
3.9 Statistische Auswertung	24
4. Ergebnisse	25
4.1 Diagnosealter	25
4.2 BMI der Patientinnen	25
4.3 Histologische Tumorentität	26
4.4 FIGO- Stadium	26
4.5 Grading	27
4.6 Operative Primärtherapie	28
4.7 Medikamentöse Primärtherapie	28
4.8 Ergebnisse der Färbungen von CRABP2	29
4.8.1 Vergleich der Proteinexpression von CRABP2 in benignen, BOT- Tumoren und Ovarialkarzinomen	29
4.8.2 Unterscheidung der Expression von CRABP2 in benignen/malignen Tumoren	30
4.8.3 Vergleich der Proteinexpression von CRABP2 in den unterschiedlichen FIGO- Stadien	32
4.8.4 CRABP2 Expression und Peritonealkarzinose	33
4.8.5 Krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die Expression von CRABP2 Expression	34
4.8.6 Gesamtüberleben in Bezug auf die Expression von CRABP2 Expression	36
4.9 Ergebnisse der Färbungen von RARα	37
4.9.1 Vergleich der Proteinexpression von RAR α zwischen malignen und nicht malignen Tumoren	37
4.9.2 Unterscheidung der Expression von RAR α in benignen/malignen Tumoren	38
4.10 Ergebnisse der Färbungen des Östrogenrezeptors α (ERα)	39
4.10.1 Vergleich der Proteinexpression des Östrogenrezeptors α zwischen malignen und nicht malignen Tumoren	39
4.10.2 Unterscheidung der Expression des Östrogenrezeptors α in benignen/malignen Tumoren	40
4.11 Ergebnisse der Färbungen des Progesteronrezeptors (PR)	41
4.11.1 Vergleich der Proteinexpression des Progesteronrezeptors zwischen malignen und nicht malignen Tumoren	41
4.11.2 Unterscheidung der Expression des Progesteronrezeptors in benignen/malignen Tumoren	42
4.12 Korrelation der Marker untereinander	43
5. Diskussion	44
5.1 Klinisch-pathologische Faktoren	44
5.2 Expression von CRABP2	45
5.3 Expression von RAR α	47
5.4 Expression von ER α	48
5.5 Expression von PR	49
5.6 Validität und Aussicht	49
6. Zusammenfassung	51
Literaturverzeichnis	VIII

Anhang	XV
Veröffentlichungen	XXI
Danksagung	XXII
Lebenslauf	XXIII

Abkürzungsverzeichnis

BOT	Borderlinetumor der Ovarien
BRCA1/2	Breast cancer 1/2; Brustkrebsgen 1/2
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cyclin-depending kinase
CD133	Cluster of differentiation 133
CRABP2	Cellular retinoic-acid binding protein 2
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EOC	Epithelial ovarian cancer
ER	Oestrogenrezeptor
etc.	et cetera
f.	folgende
ff.	fortfolgende
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et Obstetrique
Her2/neu	Human epidermal growth factor 2
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
Ki-67	Proliferationsmarker Ki-67
PR	Progesteronrezeptor
RAR α	retinoic-acid receptor alpha
S.	Seite
s.	siehe
STIC	Seröse tubare intraepitheliale Karzinome
Tab.	Tabelle
TMA	Tissue-Micro-Array
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World health organisation
z. B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassische Einteilung in High und low Grade Karzinome.	4
Tabelle 2: Neue Figoklassifikationen von 2014.	6
Tabelle 3: Verwendete Materialien und Geräte.	17
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.	18
Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper.	19
Tabelle 6: Bestimmung des IRS nach Remmele.	24
Tabelle 7: BMI der Patientinnen.	25
Tabelle 8: Korrelationen der Marker untereinander.	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadium nach FIGO. _____	27
Abbildung 2: Expression von CRABP2 in den unterschiedlichen Dignitäten. _____	30
Abbildung 3: ROC Analyse zu CRABP2. _____	31
Abbildung 4: Expression von CRABP2 in den verschiedenen FIGO Stadien. _____	32
Abbildung 5: CRABP2 und Peritonealkarzinose. _____	33
Abbildung 6: Zusammenhang zwischen CRABP2 und DFS _____	34
Abbildung 7: Die Expression von CRABP2 ist mit dem Gesamtüberleben assoziiert. _____	36
Abbildung 8: Die Expression von RAR α variiert zwischen den Dignitäten. _____	37
Abbildung 9: ROC Analyse zu RAR α . _____	38
Abbildung 10: Die ER α Expression variiert zwischen den Dignitäten. _____	39
Abbildung 11: ROC Analyse zu ER. _____	40
Abbildung 12: Die PR Expression variiert zwischen den Dignitäten. _____	41
Abbildung 13: ROC Analyse zu PR. _____	42

1.0 Einleitung

Histogenetisch betrachtet liegen ovariellem Gewebe drei verschiedene Gewebe zugrunde. Neben den Keimzellen und ovariellem Stroma spielen bei der Entwicklung ovarialer Neoplasien sowohl das Oberflächenepithel, als auch die Tuben, eine wichtige Rolle (s. Kap 1.2). Aus diesen Geweben entwickeln sich die für die vorliegende Arbeit relevanten Karzinome, Tumoren des Borderlinetypes (BOT) und benigne Tumoren (1).

1.1 Epidemiologie

Mit 3,3 % aller weiblichen Krebserkrankungen stellt das Ovarialkarzinom (EOC) das achthäufigste Malignom der Frau dar. Bei einer Inzidenz von 18/100000 erkrankten daran im Jahr 2012 etwa 7380 Frauen in unserem Land. International gesehen liegt Deutschland bezüglich der Neuerkrankungsraten knapp hinter anderen westlichen Industrienationen wie den USA, Dänemark und Polen, jedoch weit vor den Mittelmeernationen (2). Zahlenmäßig ist das Ovarialkarzinom damit nach dem Corpuskarzinom der zweithäufigste - aber tödlichste - Genitaltumor der Frau. Die Neuerkrankungsraten steigen bis zum 85. Lebensjahr kontinuierlich an, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren liegt. Für das Jahr 2016 wird eine etwas niedrigere Inzidenz von etwa 7200 Frauen angenommen, laut Robert-Koch-Institut ist sie bereits seit der Jahrtausendwende leicht rückläufig (3).

Trotz intensiver Forschung, einer besseren operativen Versorgung und neuen medikamentösen Ansätzen ist die Mortalität hingegen nur geringfügig rückläufig. Diese Tatsache basiert vor allem darauf, dass das Ovarialkarzinom aufgrund fehlender Frühsymptome oftmals erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert wird. So werden 61% der Karzinome erst im T3 Stadium entdeckt. Dies führt zu einer aktuellen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 41% (3). Ungefähr 75% der Patientinnen erleiden innerhalb von zwei Jahren ein Rezidiv (4).

Für den Borderlinetumor (BOT), ein nicht-invasiv wachsender Tumor des Ovars, wird eine in den letzten Jahrzehnten ansteigende Inzidenz von 16,6/100000 bei einem medianen Erkrankungsalter von 55,2 Jahren angegeben (5). Sie treten somit häufiger in jüngeren Lebensjahren auf, werden oft in frühen Stadien diagnostiziert und zeichnen sich durch eine weitaus bessere Prognose als Ovarialkarzinome aus (6).

1.2 Ätiologie

In der Mehrzahl der Fälle tritt das Ovarialkarzinom sporadisch auf. Bei nur knapp 10 % der Fälle handelt es sich um familiär bedingte Ovarialkarzinome, denen größtenteils Mutationen in bekannten Hochrisikogenen zugrunde liegen (2). Über die genaue Pathogenese des Ovarialkarzinoms existieren unterschiedliche Hypothesen. Bereits 1971 postulierte Fathalla, dass ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Ovulationen und dem Auftreten ovarieller Neoplasien existiert (7). Eine prokarzinogene Rolle von Ovulation, Epithelruptur und postovulatorischer Inflammation wird vermutet (8). Unterstützt wird diese These durch eine nachgewiesene Risikoreduktion von bis zu 30% durch langjährige Einnahme oraler Kontrazeptiva (9). Aus Fathallas Sicht ist der leichte Inzidenzrückgang trotz geringerer Anzahl an Schwangerschaften, die ebenfalls einen protektiven Faktor darstellen, ein positiver Effekt der flächendeckenden Einnahme oraler Kontrazeptiva in der westlichen Welt (10). Gegenstand aktueller Studien ist die Diskussion, ob vor allem seröse Ovarialkarzinome ihren Ursprung im Eileiter haben, der nach der Ovulation ebenfalls von entzündlichen Mediatoren belastet wird (11). Als weitere Risikofaktoren werden die postmenopausale Hormonersatztherapie, eine frühe Menarche und ein spätes Klimakterium sowie polycystische Ovarien genannt. Rauchen wird als Risikofaktor insbesondere für das Entstehen muzinöser Ovarialkarzinome diskutiert (12). In mehreren Metaanalysen zeigte sich zudem eine positive Korrelation zwischen BMI und Erkrankungswahrscheinlichkeit (13) (14). Hier scheint vor allem der BMI zum Zeitpunkt des frühen Erwachsenenalters eine große Rolle zu spielen (15). In mehreren Studien wurde zudem die protektive Wirkung einer Tubenligatur nachgewiesen (2).

Das größte Risiko für ein Ovarialkarzinom stellen Mutationen in den Genen *BRCA-1* und *BRCA-2* dar. In der Literatur wird ein kumulatives Erkrankungsrisiko einer Patientin, bis zum 70. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, bei einer *BRCA1* Mutation mit 29 % und bei einer *BRCA2* Mutation mit 15 % angegeben (16). Daneben existieren bei diesen Patientinnen erhöhte Inzidenzen von anderen Malignomen. Als weitere Hochrisikoerkrankung wurde das HNPCC Syndrom (hereditary non polyposis colon cancer syndrom), auch Lynch 2 Syndrom genannt, identifiziert. Hierbei handelt es sich um Mutationen in DNA-Reparaturgenen. Bei den meisten Genträgern verursacht diese autosomal-dominant vererbte Erkrankung ein Kolonkarzinom, jedoch erhöht es auch die Wahrscheinlichkeit an einem Endometrium- und Ovarialkarzinom zu erkranken. Bei etwa 10 % der an HNPCC erkrankten Patientinnen wird im Laufe des Lebens ein Ovarialkarzinom festgestellt (2).

Im Falle einer familiären Belastung von Brust- und Eierstockkrebs wird die genetische Testung der autosomal-dominant vererbten Hochrisikogene *BRCA1/2* empfohlen. Bei Nachweis von Mutationen können prophylaktische Operationen durchgeführt werden. Die Durchführung einer Adnektomie kann das Erkrankungsrisiko *BRCA* positiver Frauen für Brustkrebs um 90%, für Eierstockkrebs um 95% senken (17). Eine weitere Risikoreduktion für Brustkrebs ist durch eine Mastektomie zu erreichen (17) (18).

Aktuell existieren zwei Ansätze zur Karzinogenese des Ovarialkarzinoms. Es wird postuliert, dass niedriggradige Karzinome eine langsame, schrittweise Entwicklung über verschiedene, größtenteils benigne Vorläuferläsionen nehmen, bis sie nach einiger Zeit in ein invasives Karzinom übergehen. Dabei häufen sich beim sogenannten Typ 1 Karzinom verschiedene genetische Mutationen. Hier sind insbesondere Mutationen in den Genen *KRAS*, *BRAF* und *ERBB2* zu nennen. Die Prognose dieser Tumoren ist deutlich besser als die der deutlich häufiger vorkommenden Karzinome des zweiten Typs, die sich zum Teil aus serösen, tubaren, intraepithelialen Karzinomen in den Fimbrien entwickeln (STICs) (19). Hierbei kommt es hauptsächlich zu einer Mutation des *TP53* Genes (20) (17).

	<u>Typ 1 Karzinome</u> low grade Karzinome (serös, muzinös, endometroid low grade)	<u>Typ 2 Karzinome</u> high-grade Karzinome (serös, endometroid high grade)
Vorläuferläsionen	Adenofibrom/Zystadenom-> Atypisch proliferativ wachsender seröser Tumor> nicht invasiver mikropapillärer seröser Tumor → invasives mikroapillär seröses Karzinom	STICs
Chromosomale Instabilität	Gering	Hoch
Typische genetische Mutation	<ul style="list-style-type: none"> • <i>KRAS</i> • <i>BRAF</i> • <i>ERBB2</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>TP53</i>

Progression des Tumors	Langsame, schrittweise Entwicklung	Schneller Progress
-------------------------------	------------------------------------	--------------------

Tabelle 1: klassische Einteilung in high und low Grade Karzinome (20)

1.4 Symptomatik und Diagnostik

Betroffene Patientinnen geben vor allem allgemeine, unspezifische Symptome wie einen Blähbauch oder Druckgefühl im Bauch, einen steigenden Leibesumfang oder Energieverlust an (22). Aufgrund fehlender spezifischer Symptome und Screening Methoden wird das Ovarialkarzinom meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate aktuell nur knapp 40% (23). Bei Verdacht kommen diagnostische Untersuchungen wie der Ultraschall, die CT oder die MRT-Untersuchung infrage. Die endgültige Diagnose erfolgt erst durch histologischer Sicherung.

Diese Zahlen zeigen, dass eine frühere Diagnosestellung einen wichtigen Beitrag zur Mortalitätssenkung darstellen könnte. Bislang konnte jedoch weder die bimanuelle vaginale Untersuchung (24) noch eine routinemäßige Bestimmung des Tumormarkers CA125 oder ein regelmäßiger transvaginaler Ultraschall in Studien eine Senkung der Mortalität erreichen (24)(25). CA125 wird von Organen exprimiert, die aus dem embryonalem Zölömeplithel abstammen und ist ein in der Verlaufskontrolle des Ovarialkarzinomes wichtiger Marker, der sowohl zum Therapiemonitoring und der Rezidivdiagnostik eingesetzt wird (26)(27). Aktuell empfiehlt die deutsche Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) in ihrer S3 Leitlinie weder eine CA125 Bestimmung noch einen routinemäßigen transvaginalen Ultraschall als Vorsorgeuntersuchung für das Ovarialkarzinom (28).

1.5 Histologische Klassifikation

Sowohl die BOT als auch die Karzinome werden histologisch durch ihre hauptsächlich vorkommende Zelldifferenzierung in verschiedene Klassen unterteilt. Bei den Karzinomen handelt es sich in überwiegendem Maße um seröse Tumore (70%), gefolgt von endometrioiden und muzinösen Karzinomen (je 10%). Die restlichen 10% repräsentieren die seltenen klarzelligen, kleinzelligen und undifferenzierten Tumoren sowie den Brennertumor (29).

1.6 Klassifikation

Im Jahre 2014 wurde die seit 1987 gültige etablierte klinische Staginginteilung der „*Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique*“ (FIGO) ebenso wie die auf histologischen Kriterien basierende Einteilung der WHO aktualisiert. Eine der Hauptänderungen war die fortan gleiche Klassifikation von Ovarial- und Tubenkarzinom sowie primären Peritonealkarzinomen (30).

<u>FIGO Klassifikation von 1998</u>	<u>FIGO Klassifikation von 2014</u>
I: Tumor auf Ovarien beschränkt	I: Tumor auf Ovarien <i>oder Tube</i> beschränkt
IA: Tumor auf ein Ovar beschränkt, intakte Kapsel, keine malignen Zellen in Aszites /Peritonealzytologie	IA: Tumor auf ein Ovar <i>oder Tube</i> beschränkt, intakte Kapsel keine malignen Zellen in Aszites /Peritonealzytologie
IB: Tumor in beiden Ovarien, intakte Kapsel, keine malignen Zellen in Aszites /Peritonealzytologie	IB: Tumor in beiden Ovarien <i>oder Tuben</i> , intakte Kapsel, keine malignen Zellen in Aszites /Peritonealzytologie
IC: Tumor in einem oder beiden Ovarien, zusätzlich entweder : Kapselruptur, Tumor auf Oberfläche, maligne Aszites oder Peritonealzytologie	IC: Tumor in einem oder beiden Ovarien <i>oder Tuben</i> , zusätzlich eins aus:
	<i>IC1: intraoperative Kapselruptur</i>
	<i>IC2: präoperative Kapselruptur oder Tumor auf Oberfläche</i>
	<i>IC3 Maligne Aszites oder Peritonealzytologie</i>
II: Tumor in einem oder beiden Ovarien mit Einbeziehung des Beckens	II: Tumor in einem oder beiden Ovarien <i>oder Tuben</i> mit Einbeziehung des Beckens <i>oder primärer peritonealer Metastasierung</i>
IIA: Einbeziehung des Uterus oder der Tube, keine malignen Zellen in Aszites /Peritonealzytologie	IIA: Einbeziehung des Uterus oder der Tube <i>oder der Ovarien</i>
IIB: weitere Ausbreitung im Becken, keine malignen Zellen in Aszites	IIB: weitere intraperitoneale Ausbreitung im Becken

/Peritonealzytologie	
IIC: IIA oder IIB plus malignen Zellen in Aszites oder Peritonealcytologie	
III: Tumor in einem oder beiden Ovarien , zusätzlich mit mikroskopisch nachweisbaren extrapelvinen peritonealen Metastasen und/oder regionalen Lymphknotenmetastasen	III: Tumor in einem oder beiden Ovarien oder der Tube oder primärer peritonealer Metastasierung mit bestätigten extrapelvinen Metastasen und/oder retroperitonealen Lymphknotenmetastasen
IIIA: mikroskopisch sichtbare Peritonealkarzinose	IIIA1: nur retroperitonealer Lymphknotenbefall
	IIIA2: mikroskopisch sichtbare extrapelvine peritoneale metastasen mit oder ohne retroperitonealem Lymphknotenbefall
IIIB: makroskopisch sichtbare extrapelvine Peritonealkarzinose bis 2 cm	IIIB: makroskopisch sichtbare pelvine Peritonealkarzinose bis 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen (inklusive Leberkapsel und Milz, aber ohne parenchymatöse Organe)
IIIC: makroskopisch sichtbare extrapelvine Peritonealkarzinose über 2 cm und/oder regionaler Lymphknotenbefall	IIIC: makroskopisch sichtbare extrapelvine Peritonealkarzinose über 2 cm mit oder ohne retroperitonealem Lymphknotenbefall
IV: Fernmetastasen außer Peritonealmetastasen	IV: Fernmetastasen außer Peritonealmetastasen
	IVA: Pleuraerguss mit maligner Zytologie
	IVB: parenchymatöse Metastasen oder Metastasen in extraabdominalen Organe

Tabelle 2: Neue Figoklassifikationen von 2014.(30)

1.7 Grading

Das Grading sagt aus, ob und in welchem Umfang der Tumor noch Ähnlichkeit zu seinem Ursprungsgewebe besitzt. *Shimizu et al.* veröffentlichten 1998 ein System zur Graduierung epithelialer Ovarialkarzinome. Diese Arbeitsgruppe bewertete die Anzahl der Mitosen im Haupttumorgewebe, die dominante histologische Gewebeart und die Zellkernpolymorphismen. Daraus entwickelten sie ein System, dass die Ovarialkarzinome von Grad eins bis drei klassifiziert, wobei Grad drei das am schlechtesten differenzierte Gewebe darstellt. (31) Eine neuere, molekulargenetische Einteilung berücksichtigt die mittlerweile gebräuchliche Unterscheidung zwischen High-Grade und Low-Grade Karzinomen (s. [Kapitel 1.3](#)) (20).

1.8 Therapie

Bei Karzinomverdacht stellt die offene Stagingoperation mit Hysterektomie, Adnektomie und gegebenenfalls Lymphadenektomie das Verfahren der Wahl dar, ein endoskopisches Vorgehen wird laut AGO nicht empfohlen. Bei einseitigem Befall im Stadium FIGO IA kann bei Wunsch und entsprechender Aufklärung nach adäquatem Staging fertilitätserhaltend operiert werden (28). Vor allem bei fortgeschrittenen Karzinomen stellt die maximale Tumorreduktion einen bedeutenden prognostischen Faktor dar (32). Während der Operation soll laut Leitlinie eine Untersuchung und Palpation der gesamten Abdominalhöhle erfolgen und jedes makroskopisch verdächtige Areal biopsiert werden. Zudem wird eine Spülzytologie und je nach Stadium und Pathologie eine Omentektomie und Appendektomie empfohlen. Weitere Empfehlungen und aktuelle Hinweise werden in den regelmäßig aktualisierten Leitlinien publiziert (33)(28).

Nach der Operation erfolgt in den meisten Fällen eine sechs Zyklen andauernde platinhaltige Chemotherapie. So wird bei einem frühen Karzinom eine Carboplatin-haltige, bei einem fortgeschrittenen Karzinom eine Kombinationstherapie mit Carboplatin und Paclitaxel empfohlen. Die Therapie mit einem Angiogenesehemmer wie zum Beispiel Bevacizumab kann ab Stadium IIIB zum Einsatz kommen. Bei niedriggradigen, hoch differenzierten Karzinomen im Stadium FIGO Ia kann laut Leitlinie auch gänzlich auf eine Chemotherapie verzichtet werden (28).

Abhängig von ihrem Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapeutika werden Ovarialkarzinome in platinsensible und platinrefraktäre Tumoren aufgeteilt, wobei bei einem platinsensiblen Karzinom das Rezidiv definitionsgemäß erst nach frühestens sechs Monaten auftritt. Zur

Therapie eines platinresistenten Rezidivs wird als zweite Chemotherapie ein nicht platinhaltiges Medikament wie Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabin oder Paclitaxel empfohlen. Platinsensible Rezidive können in Kombination mit einem platinhaltigen Medikament erneut therapiert werden. Eine hormonelle Behandlung des Ovariakarzinomes hingegen wird aktuell nicht empfohlen (28). Gegenstand derzeitiger Forschung ist die Suche nach Rezeptoren oder biologisch aktiven Proteinen, die Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie (targeted therapy) sein könnten (34). Sie nehmen in der aktuellen pharmakologischen Therapie vieler Krankheiten einen neuen Stellenwert ein. Durch sie wird eine individualisierte, auf den Tumor zugeschnittene Therapie ermöglicht. Sie blockieren pathogenetisch relevante Proteine und Rezeptoren und ermöglichen somit neue Wege in der Therapie. Prominenteste Beispiele sind der Tyrosinkinasehemmer Imatinib bei der Behandlung der chronisch-myeloischen Leukämie und der Antikörper Trastuzumab, der bei Patientinnen mit einer Her2/neu Überexpression zur Behandlung des Mammakarzinomes eingesetzt wird.

Die Therapie der BOT beinhaltet laut Leitlinie ebenfalls ein chirurgisches Staging mit Omentektomie, Appendektomie, Salpingo-Oophorektomie, Spülzytologie, und peritonealen Biopsien. Bei fertilitätserhaltendem Operieren wird eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit diskutiert. BOT sollten adjuvant nicht systemisch therapiert werden (28).

1.9 Prognose

Als individuelle Prognosefaktoren sollten laut AGO das Tumorstadium, der postoperative Tumorrest, Alter, Allgemeinzustand, histologischer Typ, Tumorgrading und eine erfolgte leitliniengerechte Therapie berücksichtigt werden (28).

Weitere tumorspezifische Marker, denen in Studien eine prognostische Relevanz nachgewiesen wurde, waren unter anderen der Stammzellmarker cluster of differentiation 133 (CD133) (35), der epidermal-growth-factor-receptor (EGFR)(36), P53 (37) und der vascular-endothelial-growth-receptor (VEGF) (38). Leider hat sich bis zum heutigen Zeitpunkt keiner dieser Marker im klinischen Alltag durchsetzen können, so dass die Therapie und prognostische Voraussagekraft noch immer nicht den biologischen Individualitäten jedes einzelnen Karzinoms gerecht werden können.

2. Hintergrund der Arbeit

Wie bereits erörtert, stellt das Ovarialkarzinom die Wissenschaft sowohl in therapeutischen als auch in diagnostischen und prognostischen Aspekten vor große Aufgaben. Der Bedarf neuer prognostisch wertvoller Marker und potenzieller Angriffspunkte einer zielgerichteten Therapie ist immens. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Expression von CRABP2, RAR α , ER und PR in Ovarialkarzinomen sowie benignen Ovarialtumoren und Tumoren des Borderlinetypes (BOT) immunhistochemisch zu untersuchen und die Expression in den unterschiedlichen Tumoren zu vergleichen. Hierfür wurden Färbeprotokolle für die Marker CRABP2, RAR α etabliert. Anschließend wurden die Untersuchungsergebnisse unter Einbeziehung der individuellen Patientendaten evaluiert um etwaige Korrelationen zu identifizieren. Auf dieser Grundlage sollen Aussagen zur Validität der genannten Biomarker getroffen werden. Besonderer Wert wird auf die Beantwortung folgender Fragen gelegt:

- 1.) Welche deskriptiven Aussagen lassen sich über das untersuchte Kollektiv treffen?
- 2.) Wie werden die jeweiligen Marker in den unterschiedlichen Geweben auf Proteinebene exprimiert?
- 3.) Welche Korrelationen lassen sich zwischen den einzelnen Markern untereinander nachweisen?
- 4.) Welche Assoziationen bestehen zwischen den Markern und den klinischen Variablen sowie dem krankheitsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben? Sind die Marker von prognostischer Relevanz?

2.1 Retinsäurestoffwechsel

Vitamin A und seine Metaboliten (Retinoide) spielen in vielen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der optischen Wahrnehmung eine große Rolle (39). Vitamin A Mangel verursacht Nachtblindheit, Knochenatrophie und Immundefizite, ein Überschuss führt zu teratogenen Effekten in der Schwangerschaft, was zu einer stark kontrollierten Abgabe von Retinsäuren in der Behandlung der Akne bei Frauen in gebärfähigem Alter geführt hat (40). Auf zellulärer Ebene beeinflussen sie durch Einfluss auf die Genexpression Wachstum, Apoptose und Differenzierung der Zelle (41).

Die Aufnahme der Retinoide erfolgt hauptsächlich in Form von β -Carotin aus Gemüse, aber auch über Retinylester, wie sie in Milch und bestimmten Fleischarten vorkommen (42). Beide Quellen stellen Vorstufen dar, die nach der Aufnahme in das intestinale Epithel in transportables Retinol umgewandelt und anschließend in der Leber gespeichert werden. Dabei ermöglicht das Retinol-bindende Protein den Transport des hydrophoben Retinols zu den Zielgeweben (43). In vivo existieren neben Retinol mit dem in der Retina befindlichen Retinal (11 cis-Retinal) sowie der aktiven Form all-trans-Retinsäure (ATRA), auch Tretinoin genannt, zwei weitere Isomere (42).

Innerhalb der Zelle erfolgt der Transport zu den Zielstrukturen hauptsächlich mithilfe von Trägerproteinen, wie den cellular-retinol-binding-proteins (CRBs) und den cellular-retinoic-acid-binding-proteins (CRABPs) (42). Die Wirkung wird über nukleäre Rezeptoren wie den retinoid-x-receptor (RXR) und vor allem durch die retinoic-acid-receptor (RARs) entfaltet (44).

Das Wissen um einen möglichen therapeutischen Nutzen durch den Einsatz von Medikamenten, die in den Retinoidstoffwechsel eingreifen, ist derzeit begrenzt. In einigen Studien konnte eine positive Wirkung einer Vitamin A Einnahme zur Prävention eines Zweitumors nachgewiesen werden, eine primäre präventive Wirkung im Sinne einer Prophylaxe gegen bestimmte Karzinome wird derzeit diskutiert (45)(46). Jedoch zeigte eine kürzlich angelegte Metaanalyse mit über 500.000 eingeschlossenen Frauen keine nennenswerte Senkung der Inzidenz von Malignomen bei langfristiger Einnahme von Vitamin A, E und K (47). Seit längerem ist bekannt, dass Retinoide zu einer Wirkverstärkung von Chemotherapeutika beim Ovarialkarzinom führen (48).

Aktuell wird bei der Behandlung anderer Malignome, wie beispielsweise der akuten Promyelozyten-Leukämie, die ausdifferenzierende Wirkung des Tretinoins genutzt. Bei soliden Tu-

moren hingegen hat sich dieser Erfolg bislang nicht nachweisen und durchsetzen können (49). Aktuell existieren keine Studien mit größerer Fallzahl über die Bedeutung des Retinsäurestoffwechsels beim Ovarialkarzinom. Hierfür wurden in dieser Arbeit zwei zentrale Proteine dieses Stoffwechsels untersucht.

2.1.2 Cellular-retinoic-acid-binding Protein 2 (CRABP2)

CRABP2 ist ein Polypeptid mit einem Gewicht von 15.500 Dalton und bindet ausschließlich Tretinoin (50) (42). Dieses Protein wird konstitutionell vor allem in der Haut, in Muskelgewebe und im Knochen exprimiert, ist jedoch auch bei Anwesenheit von Retinsäure in anderen Geweben induzierbar (42). Als Shuttleprotein bindet es Retinsäure an einer spezifischen Domäne und transportiert es zu seinen Zielstrukturen im Zellkern. Eine erhöhte Proteinexpression von CRABP2 steht im Verdacht bei einigen Malignomen, wie dem Glioblastoma multiforme oder dem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, mit einer schlechten Prognose einherzugehen (51)(52). Beim Ovarialkarzinom wurde in einer Studie mit kleiner Fallzahl eine erhöhte Expression vor allem beim serösen Typ nachgewiesen. Aufgrund der Abwesenheit von CRABP2 in klarzelligem Karzinomen wird bereits über eine Schlüsselrolle von CRABP2 in der histologischen Differenzierung der Karzinome diskutiert (53). Bislang fehlen Studien mit größerer Fallzahl und einer langfristigen Follow-up-Untersuchung der Patientinnen.

2.1.3 Retinoic-acid-rezeptor α (RAR α)

Aktuell sind sowohl von RAR als auch von RXR jeweils 3 Klassen (α bis γ) bekannt, die zur Familie der nukleären Rezeptoren gehören. Diese Rezeptoren bilden meistens Heterodimere, die ligandenabhängig an spezifische DNA Sequenzen binden (54). Lautete die ursprüngliche Annahme, dass die Aktivierung von RARs zu einer Aktivierung der Transkription führt, zeigten neue Untersuchungen, dass die Aktivierung ebenfalls einen antiproliferativen, apoptotischen Einfluss auf die Zelle haben kann (55)(54).

Eine ansteigende Expression von RAR α wurde beim Wandel von benignen zu prämaligen und malignen Brustzellen beschrieben (56). Zudem scheint eine erhöhte Expression in Östrogenrezeptor positiven Mammakarzinomen mit dem Nichtansprechen auf eine antihormonelle Therapien assoziiert zu sein (57). Vorhergehende Studien an Kohorten mit geringen Fallzahlen konnte eine vermehrte Expression von RAR α insbesondere in fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen nachweisen (58). Insbesondere das Zusammenspiel zwischen RAR α und

CRABP2 in der Entstehung des Ovarialkarzinomes als auch eine etwaige Bedeutung im Zusammenspiel mit Sexualhormonen sind bislang ungeklärt.

2.2 Sexualhormone

Östrogen und Progesteron gehören zur Familie der Steroidhormone, die in vivo aus Cholesterin synthetisiert werden können. Nach der Bindung durch einen meist zytoplasmatischen Rezeptor erfolgt der Transport in den Zellkern, wo sie direkten Einfluss auf die Genexpression nehmen (59).

2.2.1 Östrogenrezeptor (ER)

Seit einigen Jahren sind zwei Isoformen des Östrogenrezeptors bekannt, wobei der ER α vor allem in Uterus, Ovar, Prostata und Nebenhoden, der ER β hingegen hauptsächlich in Knochenmark, Kolon und Gefäßendothel nachgewiesen werden kann (60). Sie können mit vielen verschiedenen Rezeptoren, wie beispielsweise dem ebenfalls untersuchten RAR α Heterodimere bilden und dadurch Einfluss auf unterschiedliche Signalkaskaden innerhalb der Zelle nehmen. So zeigte sich beispielsweise eine durch Östrogen vermittelte Expression von RAR α in Brustkrebszellen, die für die Wirkung von Östrogen in der Zielzelle essentiell ist (60). Malignome wie beispielsweise das Ovarialkarzinom, das Mammakarzinom aber auch das Prostatakarzinom entstehen oder wachsen unter dem Einfluss von Östrogenen (61). Östrogene besitzen auf Zellen, die den Östrogenrezeptor exprimieren, eine proliferative Wirkung. Als Steroidhormon diffundiert Östrogen durch die Zellmembran und bindet an den zytoplasmatischen ER, der als ligandeninduzierter Transkriptionsfaktor wirkt. Es bewirkt beispielsweise eine Herunterregulierung von Kinase-inhibierenden-Proteinen p27 und p21 bei gleichzeitiger Aktivierung von CDKs und startet damit den mitotischen Zyklus (62). Ein Entzug dieses Wachstumssignales kann die Progression und Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs senken und hat in der Therapie hormonsensibler Mammakarzinome einen festen Stellenwert (63). Als Beispiel hierfür ist Tamoxifen zu nennen, ein selektiver Östrogenrezeptor-Modulator, der antagonistisch am ER der Brust, jedoch agonistisch am ER des Endometriums wirkt. Dem Nutzen der Blockade eines wichtigen Wachstumsfaktors für hormonsensible Mammakarzinome steht dabei eine erhöhte Inzidenz eines Endometriumkarzinomes gegenüber (64). Weitere Medikamente wie die in der postmenopausalen Therapie des Mammakarzinoms genutzten Aromataseninhibitoren oder der Östrogenrezeptorantagonist Fulvestrant haben ebenfalls das Ziel die proliferative Wirkung von Östrogenen zu minimieren. Klinisch zeigen Mammakarzinome

teilweise nach gewisser Zeit Resistenzen gegen eine antihormonelle Therapie, entweder durch Herunterregulierung des ER oder durch bislang noch größtenteils unverstandene Mechanismen bei unveränderter ER Expression (65). Hier bestehen zwischen dem Mamma- und Ovarialkarzinom entscheidende Unterschiede. Auch beim Ovarialkarzinom, insbesondere beim high-grade serösen Ovarialkarzinom (66), lässt sich größtenteils eine ER Expression nachweisen, jedoch sind sowohl die Datenlage als auch die Ergebnisse einer endokrinen Therapie ernüchternd. Trotz vorübergehenden Ansprechraten von etwa 40% konnte bei den Patientinnen kein langfristiger Benefit erzielt werden (67).

2.2.2 Progesteronrezeptor (PR)

Auch beim Progesteronrezeptor lassen sich zwei Isoformen α und β unterscheiden. Vorherige Studien zeigten, dass bei etwa 35% der Ovarialkarzinome eine verstärkte Progesteronrezeptorexpression nachweisbar ist, wobei die endometroiden und serösen Karzinome den größten Anteil bilden. Aktuell wird eine protektive Rolle von Progesteron im Rahmen der ovariellen Karzinogenese diskutiert, die im Einklang mit der nachgewiesenen Risikoreduktion eines Ovarialkarzinoms durch Multiparität oder der Einnahme oraler Kontrazeptiva steht (68). Passend dazu konnte in Studien eine Abnahme der Progesteronrezeptorexpression mit der Entwicklung von Ovarialkarzinomen korreliert werden (69). Eine eventuelle Verbindung zwischen Sexualhormon- und Retinsäurestoffwechsel ist derzeit noch nicht weiter untersucht worden.

2.3 Proliferationsmarker Ki-67

Der Proliferationsmarker Ki-67 wird durch das Gen *MKI-67* auf dem langen Arm von Chromosom 10 codiert (70). Der Name setzt sich aus dem Entdeckungsort Kiel und der Nummer des Klonen auf einer Wellplatte, auf der ein entsprechender muriner Antikörper gefunden wurde, zusammen (71). Das Antigen wird nur in Zellen exprimiert, die sich in der G1, S, G2 Phase oder innerhalb der Mitose befinden. Durch die fehlende Expression in Zellen der G0 Phase lässt sich mit dem Nachweis von Ki-67 eine proliferative Zelle darstellen (72). Diese Eigenschaft führte dazu, dass die Bestimmung dieses Parameters in der momentanen histopathologischen Bewertung des Proliferationsverhaltens von Malignomen eine große Rolle spielt. In der klinischen Praxis wird dieser Marker zum Beispiel für die pathologische Beurteilung von Brust- und Prostatakarzinomen benutzt (73)(74). Dennoch ist die eigentliche Aufgabe dieses Proteines bis heute ungeklärt. Klinisch wird der Wert für Ki-67 in Form des Ki-67

Indexes angegeben, der dem Prozentwert Ki-67 positiver Zellen von 100 gezählten Zellen entspricht. In einer dänischen Studie wurde zum einen eine positive Korrelation zwischen höhergradigen Ovarialkarzinomen nach FIGO und der Höhe der Ki-67 Expression nachgewiesen, zum anderen war eine erhöhte Ki-67 Expression mit einem verkürzten Gesamtüberleben verbunden (75).

3. Material und Methoden

3.1 Gewebeproben und klinische Daten

Die Tissue-Micro-Arrays (TMA) sowie die Färbeergebnisse für Ki-67 wurden uns von vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ivo Meinhold-Heerlein freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die TMAs wurden aus paraffineingebetteten Gewebsblöcken des Archivs der Pathologie des UKSH, Campus Kiel erstellt. Die insgesamt zehn TMA-Blöcke enthielten Gewebeproben von 178 Patientinnen, bei denen im Zeitraum zwischen 1997 und 2007 ein Tumor der Ovarien diagnostiziert wurde. Innerhalb des Kollektivs standen 140 Ovarialkarzinomen jeweils 19 benignen und 19 Tumoren des Borderlinetypes (BOT) gegenüber. Alle in dieser Arbeit bewerteten Tumoren wurden in der Pathologie des UKSH, Campus Kiel untersucht und beurteilt. Dadurch standen histopathologische Daten zu allen Tumoren zur Verfügung. Die retrospektiv erhobenen klinischen Daten entstammen den Arztbriefen, Epikrisen und elektronischen Krankenakten des Orbis-Systems. Die Follow-up Daten wurden durch die Abfrage des Tumorregisters Schleswig-Holsteins sowie des klinikinternen Orbis-Systems erhoben. Alle erhobenen persönlichen Daten wurden nach Datenschutzrichtlinien behandelt und zur statistischen Auswertung doppelt verblindet. Die Zustimmung der einzelnen Patientinnen und der Ethikkommission des UKSH lag vor (Beschluss der Ethikkommission D542/17).

3.2 Tissue Micro Arrays

Tissue Micro Arrays (TMAs) sind in Paraffin eingebettete Gewebeblöcke, die mehrere hundert verschiedene Gewebeproben enthalten können (76). Für die Herstellung werden repräsentative Gewebeproben in der Größenordnung von etwa 0,06 mm im Durchmesser aus vorher markierten paraffineingebetteten Geweben (Donorblock) ausgestanzt und nebeneinander in einen neuen Block (Akzeptorblock) eingefügt. TMAs eignen sich gut für immunhistochemische Untersuchungen verschiedener Gewebe, da in einem einzigen Färbeschritt eine große Menge verschiedener Proben gefärbt werden können. Um die meist geringe repräsentative Kraft einer einzelnen Stanze auszugleichen werden wie in dieser Arbeit meist bis zu vier Proben des gleichen Gewebes nebeneinander platziert. Ein großer Vorteil im Vergleich zu Einzelfärbungen ist neben einer Zeitersparnis vor allem die Vergleichbarkeit der Proben, da alle Proben in einem Färbungsvorgang unter gleichen Bedingungen gefärbt werden können.

3.3 Immunhistochemische Färbung

Paul Ehrlich beschrieb 1891 die Bindung von bestimmten Toxinen an die Zelloberfläche eukaryotischer Zellen und schuf damit die Grundlage der Immunhistochemie. Das Funktionsprinzip dieser Technik ist die Bindung eines spezifischen Antikörpers (meist eines Immunglobulins) an ein zelleigenes Antigen. In einem nächsten Schritt kann dieser Antigen-Antikörperkomplex durch die Bindung eines sekundären Antikörpers, der vorher mit einem Enzym gekoppelt wurde, erweitert werden. Die enzymatische Koppelung wird für eine Farbumschlagsreaktion genutzt, die die Detektion unter dem Lichtmikroskop ermöglicht (77). Diese Methode eignet sich sowohl für die pathologische Diagnostik und Diagnosestellung in der klinischen Routine, als auch für Forschung an eingelagerten Gewebeproben. Trotz aller modernen molekularen, genetischen und epigenetischen Untersuchungsmöglichkeiten bleibt der Immunhistochemie immer noch eine wichtige Rolle in der biologischen Aufarbeitung von Tumoren erhalten (78).

Abhängig von den gewünschten anzufärbenden Antigenen werden verschiedene Färbeprotokolle laborabhängig erarbeitet, die dann möglichst standardisiert durchgeführt werden. Bei der Etablierung neuer Marker stellt die Austestung des richtigen Protokolls eine große Aufgabe dar. Für die vorliegende Arbeit wurden Protokolle für die Marker RAR α und CRABP2 etabliert, die Färbung des ER und PR erfolgten im Vollfärbeautomaten des Instituts für Pathologie am UKSH, Campus Kiel. Die in dieser Arbeit untersuchten und bewerteten Antikörper wurden mithilfe verschiedener Verfahren angefärbt. Die durchgeführten Färbungen von CRABP2 und RAR α wurden mithilfe des EnVisionTM Detection System (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) untersucht.

3.4 Labormaterialien

Im folgenden Abschnitt werden die zur Untersuchung im Labor verwendeten Materialien inklusive deren Herkunft bzw. Hersteller kurz tabellarisch aufgelistet. Dabei wird zwischen mechanischen Geräten und chemischen Substanzen unterschieden. Auch die Zusammensetzung der genutzten Pufferlösung sowie die Konzentration der verschiedenen verwendeten Antikörper werden beschrieben.

3.4.1 Materialien und Geräte

<u>Produkt</u>	<u>Produzent, Sitz des Produzenten</u>
Computer HP Compaq Elite 1100	HP
Feuchte Kammer	Eigenproduktion aus Diakasten Viko
Handzähler Manual counter EE 53.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kamera Axio Cam Mrc	Zeiss
Kurzzeitmesser	TFA Dostmann/Wertheim
Laborwage BL610	Sartorius AG, Göttingen
Latex-Handschuhe	Ansell GmbH, München
Messzylinder	DURAN Produktions GmbH & Co. KG, Mainz
Microtome Blades Type S35	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Mikrowellengeschirr	VWR International GmbH, Bruchsal
Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA
Objektträger Thermo Scientific Super Frost	Menzel GmbH, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago, IL, USA
pH-Meter Modell 765	Knick, Nürnberg
Pinsel DaVinci 3 (Mikrotomgebrauch)	Hugo Hamann GmbH & Co. KG, Kiel
Pipetten Research® (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Trichter	VWR International GmbH, Bruchsal
Vortex-Genie®1	VWR International GmbH, Bruchsal
Wasserbad	Kunz Instruments A/S, Kopenhagen, Dänemark

Tabelle 3: Verwendete Materialien und Geräte.

3.4.2 Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Produzent</u>
Citronensäure Monohydrat	1002440500, Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100%	1.00983.2500, Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaun sauer nach Mayer, Nr. T865.2, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Nr. T865.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HCL 25%(Salzsäure)	1003161000, Merck KGaA, Darmstadt
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Nr.822287, Merck-Schuchardt OHG, Hohebrunn
NAOH (Natronlauge)	1091371000, Merck KGaA, Darmstadt
NACL (Natriumchlorid)	WAL41402 1000, Walter-CMP GmbH & Co Kiel
Tri-Natrium-Citrat- Dihydrat	1002440500, Merck KGaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	1083820500, Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	WAL 124015000, Walter-CMP GmbH & Co Kiel

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

3.4.3 Pufferlösungen

Zehn Liter Waschpuffer (TBS Puffer) wurden wie folgt zusammengesetzt:

83,6 g NaCL (1,43 mol/l) + 12,0 g TRIS (10 mmol Tris Buffer); anschließend Einstellen des pH auf 7,4 unter Verwendung von HCL; Auffüllen auf 10 l mit Aqua destillata

Zur Antigendemaskierung wurde ein Citratpuffer mit pH 6 benutzt:

1,92 g Citronensäure Monohydrat auf 1000ml Aqua destillata; Einstellung auf pH 6 mithilfe von NaOH

3.4.3 Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Klon	Tierspezies	Produzent	Inkubationsdauer	Verdünnung	Temperatur
RAR α	2D2; mono- clonal	Maus	Abnova GmbH Hei- delberg	über Nacht	1:250	4 ° C
CRABP2	Polyclonal	Kaninchen	Sigma- Aldrich Che- mie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	über Nacht	1:250	4 ° C
ER	6F11	Maus	Leica Mikro- systeme Ver- trieb GmbH Mikroskopie und Histolo- gie Wetzlar, Deutschland	20 min	1:150	Raumtempe- ratur
PR	16	Maus	Leica Mikro- systeme Ver- trieb GmbH Mikroskopie und Histolo- gie Wetzlar, Deutschland	30 min	1:200	Raumtempe- ratur
Ki-67	SP6; mono- klonal	Kaninchen	Thermo Fish- er Scientific, Fremont, CA, USA	30 min	1:300	Raumtempe- ratur

Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper.

3.5 Schneiden der TMAs

Mithilfe eines Mikrotoms (Modell 2050 Supercut, Reichert-Jung, Nussloch) wurden 3-4 μm dicke Schnitte abgetragen, die anschließend in einem 50 Grad Celcius warmen Wasserbad (Kunz Instruments A/S, Kopenhagen, Dänemark) geglättet wurden. Anschließend erfolgte die Auftragung der dünnen Gewebeproben auf beschichtete Objektträger (Thermo Scientific Super Frost; Menzel GmbH, Braunschweig) und die Trocknung der Proben über Nacht in einem 37 Grad Celcius warmen Brustschrank.

3.6 Färbeprotokolle für CRABP2 und RAR α

3.6.1 Deparaffinierung der Schnitte

Um Deparaffinierung und Rehydrierung zu vereinfachen wurden die Objektträger in Wiegen geschoben, die das gleichzeitige Eintauchen aller Objektträger in die jeweilige Lösung ermöglichen. Zunächst wurde die Wiege für 20 Minuten in ein Xylolbad (WAL 124015000, Walter-CMP GmbH & Co KG, Kiel) platziert, anschließend erfolgte das doppelte Eintauchen in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%; verdünnt aus 100% Ethanol; 1.00983.2500, Merck KGaA, Darmstadt). Nach mehrmaliger Spülung mit Leitungswasser wurden die Objektträger in der Demaskierungslösung inkubiert.

3.6.2 Antigendemaskierung und Blockierung der endogenen Peroxidase

Durch die Fixierung mit Formalin und der anschließenden Einbettung in Paraffin kann es zu einer Vernetzung der Proteine (Crosslinking) kommen, die eine immunhistochemische Darstellung der Zielstrukturen erschweren kann. Dieser Prozess ist mithilfe des HIER (Hitzeinduziertes Epitopretrieval) umkehrbar. Dafür wurden die Objektträger in einem Citratpuffer mit einem pH von 6 für 20 Minuten in einer Mikrowelle bei 900 Watt erhitzt und danach für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach fünf minütiger Wässerung in Leitungswasser wurde die Wiege zum Blocken der endogenen Peroxidase für 20 Minuten in eine 3%-ige Wasserstoffperoxidlösung (3% H_2O_2 ; verdünnt mit Aqua aus 30 % H_2O_2 Lösung; Nr.822287, Merck-Schuchardt OHG, Hohebrunn) getaucht. Nach erneuter dreimaliger Waschung in Leitungswasser erfolgte eine fünfminütige Inkubation im Waschpuffer.

3.6.3 Reduzierung der Hintergrundfärbung - primärer Antikörper

Bei der Färbung von CRABP2 wurde direkt mit der Auftragung des mit PBS verdünnten Antikörpers begonnen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Färbung von RAR α der primäre Antikörper mit einem *Antibody Diluent* der Firma Dako verdünnt. Dieses Reagenz beinhaltet einen sogenannten Background-Reducer, der die unspezifische Hintergrundfärbung reduziert. Nachdem die Zielkonzentrationen der primären Antikörper erreicht wurden (CRABP2 1:250; RAR α 1:400), erfolgte deren Auftragung auf die Objektträger. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer. Daraufhin begann die Fortsetzung der Färbung mit drei erneuten Waschgängen im Waschpuffer.

3.6.4 Sekundärer Antikörper - Farbumschlagsreaktion

Anschließend wurden die Objektträger abgespült und erneut die feuchte Kammer gelegt. Nun erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (sek. Goat-AK aus dem EnVision™ Detection System, Dako Denmark A/S, Kopenhagen). Die *EnVision™ Detection* Systeme ermöglichen mit einer einfachen Anwendung eine hohe Sensitivität der farblichen Markierung von gebildeten Antigen-Antikörper Komplexen. Der sekundäre Antikörper ist ein Polymerkonjugat, der hauptsächlich aus einem Dextranmolekül besteht und 70 Enzymmoleküle sowie bis zu 10 Antikörpermolekülen binden kann.(79) Dieses System arbeitet mit Meerrettichperoxidase, die aus der gleichnamigen Pflanze gewonnen wird, um die Bindung des sekundären Antikörpers an den primären sichtbar zu machen. Dafür wurden die Präparate nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer dreimalig mit dem Puffer gewaschen. Für die Farbentwicklung wurde das Chromogen DAB (Diaminobenzidin) benutzt. Dieses Chromogen bildet ein bräunliches Endprodukt, das in Alkohol unlöslich ist. Nach Auftragung des DAB wurden die Farbentwicklung nach 20 minütiger Inkubation durch Abspülen mit Aqua destillata gestoppt.

3.6.6 Gegenfärbung und Fertigstellung der Präparate

Nach erneuter Spülung der Präparate mit Leitungswasser erfolgte die Gegenfärbung mit einer Hämaunlösung (Hämaun sauer nach Mayer, Nr. T865.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) wobei die Wiegen für drei Minuten in die Lösung eingetaucht wurden. Zum Abschluss wurden die Präparate für 30 Minuten in Leitungswasser gewässert. Vor der Fertigstellung der Präparate erfolgte zur Dehydrierung das Eintauchen in eine aufsteigende Alkoholrei-

he. Nach dreiminütigem Eintauchen in Xylol erfolgte das Eindecken der Präparate mithilfe von Eukitt.

3.6.7 Negativkontrolle

Bei jedem Färbedurchgang wurde ein TMA als Negativkontrolle gefärbt. Die Negativkontrolle befand sich bei jedem Schritt mit den anderen Präparaten innerhalb der Wiege, jedoch wurde anstelle des primären Antikörpers der PBS Waschpuffer benutzt.

3.7 Färbeprotokoll für ER, PR und Ki-67

Die Färbungen für den ER und PR wurden mithilfe des Institutes für Pathologie am UKSH, Campus Kiel durchgeführt. Die Färbung und Auswertung von Ki-67 lag bereits vor der Arbeit vor, wurde jedoch ebenfalls dort vorgenommen. Diese Färbungen wurden mithilfe des Vollautomaten *Leica- BOND-MAX (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)* durchgeführt. Die genauen Arbeitsschritte wurden bereits erläutert, im Folgenden wird nun auf die Besonderheiten der einzelnen Färbungen eingegangen.

Die Färbung des ER erfolgte mit dem *Novocastra flüssigen monoklonalen Maus-Antikörper Estrogen Receptor; Produkt-Nr.: NCL-L-ER-6F11 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)*. Dieser IgG1 Antikörper des Klons 6F11 entspricht dem Molekül der A-Isoform des menschlichen Östrogenrezeptors in voller Länge und wird vor allem für die Bestimmung des Östrogenrezeptor α Status beim Mammakarzinom empfohlen (35). Für die Antigendemaskierung mittels HIER- Verfahren wurde die *BOND Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)* benutzt, eine auf EDTA basierenden Lösung mit einem pH von 9. Bei einer Konzentration von 67,5 mg/ml und einer Verdünnung von 1:150 wurde der primäre Antikörper für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der PR wurde mit dem *Novocastra Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper Progesterone Receptor Produkt-Nr.: NCL-L-PGR-312 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)* angefärbt. Dieser IgG1 Antikörper des Klons 16 entspricht der N-terminalen Region des menschlichen Progesteronrezeptors und wird für die Bestimmung des Progesteronrezeptor Status beim Mammakarzinom empfohlen. Ebenfalls nachgewiesen wurde die Färbung des PR sowohl in gesunden, als auch in tumorös veränderten Ovarien. (80) Zur Antigendemaskierung wurde hierbei ebenfalls das HIER- Verfahren angewendet, jedoch wurde die *BOND Epitope Retrieval Solution 1* benutzt, die aus einer auf Citrat basierten Lösung mit einem pH von 6 ba-

siert. Bei einer Konzentration von 324,0mg/ml und einer Verdünnung von 1:200 erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Für die Darstellung von Ki-67 wurde ein monoklonaler Kaninchen Antikörper gegen Ki-67 (*Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA*) verwendet. Für die Antigendemaskierung mittels HIER- Verfahren wurde hierbei ebenfalls die *BOND Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)* benutzt, eine auf EDTA basierenden Lösung mit einem pH von 9. Bei einer Verdünnung von 1:300 erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

3.8 Auswertung des Färbeergebnisses

Die verblindete Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde an einem Lichtmikroskop (*AxioLab; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA*) in 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Pro Patientin standen repräsentativ drei Tumorstanzen und eine Stromastanze zur Verfügung. Auf dem TMA, der die benignen Tumoren repräsentierte, standen nur 3 Stanzen pro Patientin zur Verfügung. Als Orientierung auf dem jeweiligen TMA dienten zwei Tonsillenstanzen, die neben der Stanze A1 in den Block eingefügt worden waren. Jede Stanze wurde, soweit genug Material vorhanden war, in 4 Gesichtsfelder eingeteilt. Diese wurden einzeln im Uhrzeigersinn mithilfe von Handzählern ausgezählt. Die Ergebnisse aller 4 Stanzen wurden nachher insgesamt bewertet und es erfolgte eine Einteilung des Tumors in die verschiedenen Scores. Die Auswertung der Östrogen- und Progesteronrezeptoranfärbung erfolgte nach dem System nach Remmele und Stegner. Sie etablierten 1987 ein System zur einheitlichen Bewertung von immunhistochemischen Färbungen, die heute vor allem in der Bewertung der Hormonrezeptorexpression beim Mammakarzinom Standard ist. Hierbei wird ein immunreaktiver Score (IRS) bestimmt, der sich aus dem Produkt von Färbeintensität und Prozentsatz der positiv gefärbten Zellkerne bildet. Anhand der Färbeintensität werden vier Grade bestimmt, wobei der am häufigsten auftretende Grad maßschlaggebend ist. Die Anzahl der nukleären Anfärbungen wird prozentual einem Wert zugeordnet (siehe Tabelle). So kann der IRS nach Remmele Werte zwischen null und zwölf annehmen (81). Die Formel lautet: $IRS = \text{Intensität der Färbung (FI)} \times \text{Prozentsatz nukleärer Anfärbung (PZ)}$.

Intensität der Färbung (FI)		Prozentsatz nukleärer Anfärbungen(PZ)	
ER und PR			
0	negatives Färbeergebnis	0% keine Anfärbung	0
1	schwaches Färbeergebnis	<10% Anfärbung	1
2	mäßiges Färbeergebnis	10% bis 50% Anfärbung	2
3	starkes Färbeergebnis	51% bis 80% Anfärbung	3
		81% bis 100% Anfärbung	4

Tabelle 6: Bestimmung des IRS nach Remmele (81)

Das Färbeergebnis für die Marker CRABP2 und RAR α wurde mithilfe des Histo-Scores bewertet, der aufgrund einer genaueren Auszählung und Bewertung aller Färbeintensitäten eine höhere Aussagekraft als der IRS nach Remmele hat. Hierbei wurden alle Zellen ausgezählt und vier Kategorien von keiner Färbung (0) bis starker Färbung (3) zugeteilt. Die Anzahl der in die vier verschiedenen Kategorien zugeilten Zellen wird anschließend als Prozentsatz zur Gesamtzahl der ausgezählten Zellen ausgedrückt. Anschließend erfolgt die Berechnung anhand der Formel: $H\text{-Score} = 0 * (\text{Anzahl der Zellen ohne Anfärbung in Prozent}) + 1 * (\text{Anzahl der Zellen mit Anfärbung 1 in Prozent}) + 2 * (\text{Anzahl der Zellen mit Anfärbung 2 in Prozent}) + 3 * (\text{Anzahl der Zellen mit Anfärbung 3 in Prozent})$. Der Höchstwert beträgt 300.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mithilfe der Software SPSS. Die deskriptive Statistik lieferte Ergebnisse zu Mittelwert, Standardabweichung sowie Maximal- und Minimalwerte.

Zur Beurteilung der Proteinexpression in den verschiedenen Dignitäten wurde der Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Die Korrelationsanalyse der Proteinexpressionen der einzelnen Marker wurde mithilfe der Spearmankorrelation durchgeführt. Zur besseren Unterscheidung der Proteinexpressionen innerhalb der Dignitäten wurden ROC-Analysen durchgeführt. Weitere durchgeführte Untersuchungen waren Student T-test, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Cox-Regressionsanalysen und der Mann-Whitney-U Test. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Diagnosealter

Als Diagnosealter wurde das Alter in vollen Jahren zum Zeitpunkt der Operation und der damit verbundenen endgültigen histologischen Sicherung definiert. Bei einer Verteilung des Lebensalters zwischen 26 und 89 Jahren betrug das durchschnittliche Diagnosealter aller Patientinnen 62,99 Jahren. Das Durchschnittsalter der Patientinnen, die an einen Ovarialkarzinom litten, betrug 62,0 Jahre. In den Gruppen der BOT und benignen Tumoren wurden zur besseren Vergleichbarkeit möglichst gleichaltrige Patientinnen ausgewählt. Dies führte zu einem eher untypisch hohen durchschnittlichem Durchschnittsalter von 62,2 Jahren bei den BOT und 63,2 Jahren bei den benignen Tumoren.

4.2 BMI der Patientinnen

Bei 138 Patientinnen konnten Daten zu Körpergröße und Körpergewicht ermittelt werden, aus denen der Body-Mass-Index (BMI) berechnet wurde. Über alle Tumoren verteilt lag der durchschnittliche BMI bei 25,26 kg/m². Definitionsgemäß liegt dies im Bereich der Präadipositas nach WHO- Bestimmung. Patientinnen mit einem Karzinom hatten durchschnittlich einen niedrigeren BMI als Patientinnen mit einem BOT- oder benignen Tumor.

Body Mass Index in kg/m ²	Karzinome	BOT	Benigne Tumoren
Minimaler Wert	14,4	17,3	21,1
Maximaler Wert	38,7	36,8	34,2
Standardabweichung	3,7	6,5	4,6
Durchschnittswert	24,8	27,4	27,1

Tabelle 7: BMI der Patientinnen.

4.3 Histologische Tumorentität

Für unsere Untersuchungen standen Proben und Daten von insgesamt 178 Tumoren zur Verfügung. Bezüglich ihrer Dignität teilten sich die Tumoren in 140 Ovarialkarzinome (78,6%), sowie 19 benigne und 19 BOT (je 10,7%) auf.

Histologisch betrachtet stellten die serösen Ovarialtumoren mit 119 Tumoren (66,9%) den größten Anteil dar, gefolgt von 34 (19,1%) endometrioiden und vier muzinösen Tumoren (2,2%). Als weitere histologische Entitäten wurden 21 benigne Zystenadenome und Inklusionszysten untersucht (11,8%).

4.4 FIGO- Stadium

Die Stadieneinteilung nach FIGO erfolgte gemäß der alten Klassifikation, da die neue erst 2014 veröffentlicht wurde und die Einteilung in die FIGO-Stadien den klinisch-pathologischen Daten entnommen worden sind (vgl. Tab. 2). Es konnten FIGO-Stadien von 158 Tumoren ermittelt werden. Davon befanden sich mit 63,3 % mehr als die Hälfte der Fälle in den fortgeschrittenen Stadien IIIC (67 Tumoren / 37,6 %) und Stadium IV (22 Tumoren / 12,4 %). Auf Stadium IA entfielen mit 20 Tumoren 11,2% der Fälle, und auf Stadium IC mit 17 Tumoren 9,6 %. Für benigne Tumoren wird keine Stadieneinteilung nach FIGO vorgenommen.

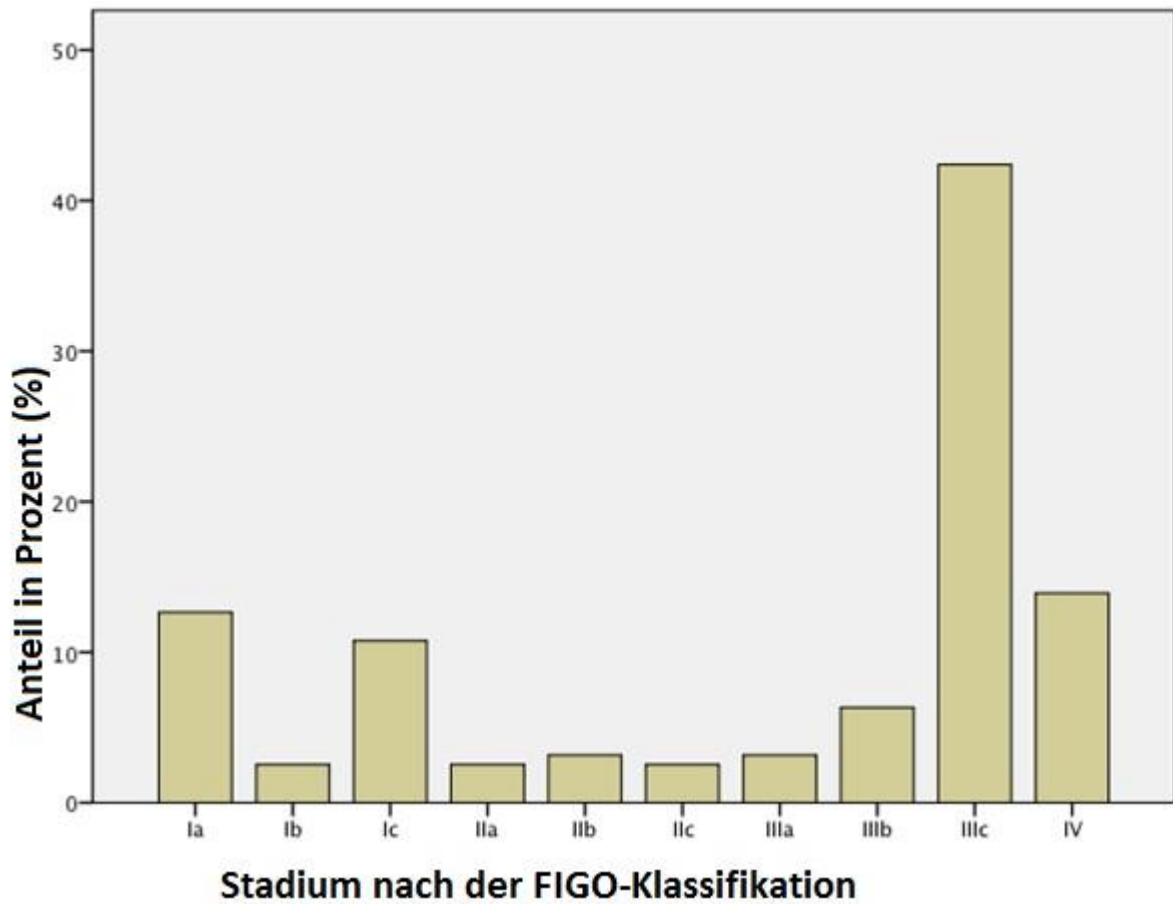


Abbildung 1: Stadium nach FIGO.

4.5 Grading

Von insgesamt 142 Tumoren konnte das tumorspezifische Grading ermittelt werden. Den größten Anteil bildeten 74 (52,2%) undifferenzierte G3 Tumoren, gefolgt von 61 (43%) mäßig differenzierten G2 Tumoren und 7 gut differenzierten G1 Tumoren (4,9%). Zum Zeitpunkt der histopathologischen Einteilung der Tumoren wurde noch nicht die neue Einteilung in low- und high-risk Karzinome verwendet, daher erfolgte die Einteilung des Gradings noch in die zu diesem Zeitpunkt geläufige Einteilung in G1 bis G3.

4.6 Operative Primärtherapie

Entsprechend der Leitlinien wurden alle Patientinnen mit dem präoperativen Verdacht auf einen Tumor maligner Genese primär mit dem Versuch der maximalen Tumorreduktion operiert. Innerhalb der Operation erfolgte bei allen Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom eine Hysterektomie, eine beidseitige Adnektomie und bei 118 (84%) Patientinnen eine Omentektomie. Zusätzlich entschied sich der Operateur in 44 Fällen (31%) zu einer Deperitonealisierung des Douglas. Aufgrund eines fortgeschrittenen Befundes entschied man sich in 43 Fällen (30,7%) bereits bei der Primäroperation zu einem darmchirurgischen Eingriff.

Insgesamt 80 (57%) Patientinnen litten bereits während der Erstoperation bereits an einer peritonealen Metastasierung; bei 61 Patientinnen konnte während der Operation makroskopisch sichtbarer Aszites festgestellt werden.

Alle Patientinnen mit einem BOT wurden beidseitig adnektomiert, 36% wurden zusätzlich hysterektomiert und in 2 Fällen erfolgte eine Omentektomie.

Bei 120 Patientinnen konnten Informationen zum postoperativen Tumorrest gefunden werden. Hierbei lag bei 81 (67,5%) Patientinnen ein postoperativer Tumorrest vor, der in 30 Fällen kleiner und in 51 Fällen größer als ein cm war. Bei 39 Patientinnen (32,5%) konnte eine makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden.

Alle BOT und benigne Tumoren konnte durch die Operation vollständig entfernt werden.

4.7 Medikamentöse Primärtherapie

Insgesamt konnten bei 119 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom Informationen zur adjuvanten Chemotherapie ermittelt werden, von denen 100 Patientinnen über mindestens sechs Zyklen behandelt wurden. Dabei erhielten 99 Patientinnen eine platinhaltige Chemotherapie, nur eine Patientin erhielt keine platinhaltige Chemotherapie. Fünf weitere Patientinnen erhielten eine Monotherapie mit Treosulfan per os. Bei 14 Patientinnen wurde aufgrund unterschiedlicher Gründe (Ablehnung, schlechter Allgemeinzustand, alternative Heilversuche) keine Chemotherapie durchgeführt. Die Daten der übrigen 21 Patientinnen konnten aufgrund externer Behandlung oder fehlender Dokumentation nicht ermittelt werden.

In der Gruppe der BOT- Patientinnen erhielten 5 Patientinnen wegen des Verdachtes auf invasive Anteile eine platinhaltige Chemotherapie.

4.8 Ergebnisse der Färbungen von CRABP2

4.8.1 Vergleich der Proteinexpression von CRABP2 in benignen, BOT- Tumoren und Ovarialkarzinomen

Insgesamt konnten die CRABP2 Expression in 174 Fällen repräsentativ ausgewertet und mithilfe des semiquantitativen H-Scores beurteilt werden. In vier Fällen konnte bei den benignen Tumoren keine repräsentative Auswertung erfolgen, so dass insgesamt 140 Ovarialkarzinome, 19 BOT und 15 benigne Tumoren untersucht werden konnten. Hierbei zeigte sich bei der Betrachtung aller Tumoren ein Mittelwert der Expression von 34,44 (\pm 39,74).

Ovarialkarzinome, BOT und benigne Tumoren zeigten signifikant unterschiedliche Expressionsintensitäten von CRABP2. Die höchste Expression von CRABP2 konnte in der Gruppe der Ovarialkarzinome nachgewiesen werden. Hier konnte eine mittlere Proteinexpression von 42,40 (\pm 40,61) bei einem Median von 35,34 nachgewiesen werden.

Etwas geringer fiel die Anfärbung in der Gruppe der Borderlinetumoren aus. Hier konnte eine mittlere Expression von 9,32 (\pm 19,53) festgestellt werden. Bei den benignen Tumoren konnte in überhaupt nur einem Fall eine Expression von CRABP2 nachgewiesen werden.

Die Zahlen in Abbildung zwei, vier und fünf entsprechen Patientennummern, der schwarze Querbalken zeigt den Median der jeweiligen Gruppe an.

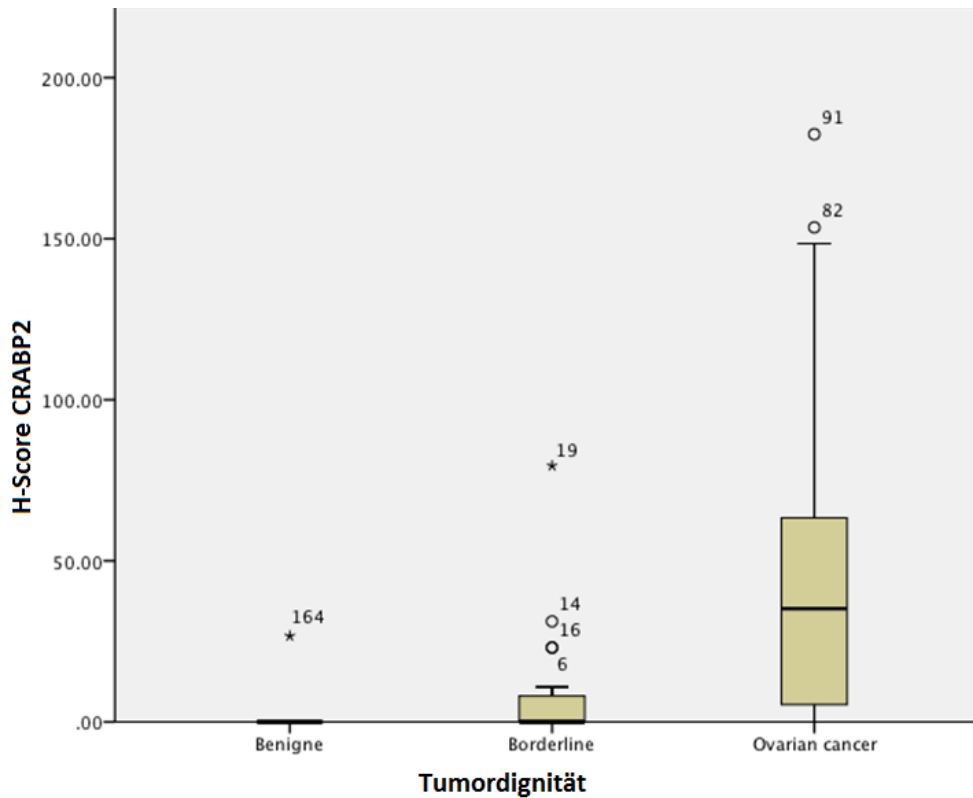


Abbildung 2: Expression von CRABP2 in den unterschiedlichen Dignitäten.

4.8.2 Unterscheidung der Expression von CRABP2 in benignen/malignen Tumoren

Mithilfe einer *receiver-operating characteristics curve (ROC)* wird eine graphische Darstellung zur Bewertung von Testverfahren ermöglicht. Jedem Wert eines Parameters kann eine bestimmte Sensitivität und Spezifität zugeordnet werden. Dies dient dazu, einen Wert herauszufinden, bei dem eine bestmögliche Unterscheidung für eine binäre Fragestellung möglich ist. Die Qualität der Untersuchung steigert sich mit Zunahme der *area under the curve (AUC)*, der Fläche unterhalb der Kurve.

In unserem Fall stellte sich die Frage, bei welcher CRABP2 Expression die bestmögliche Unterscheidung zwischen benignen und malignen Tumoren möglich ist. Hierbei wurde ein Cut-off von 5,57 ermittelt, bei dem die Differenzierung zwischen Karzinom und benignem Tumor die höchste Sensitivität (75,36%) und Spezifität (83,33%) erreicht. Die BOT wurden in dieser Berechnung ausgelassen.

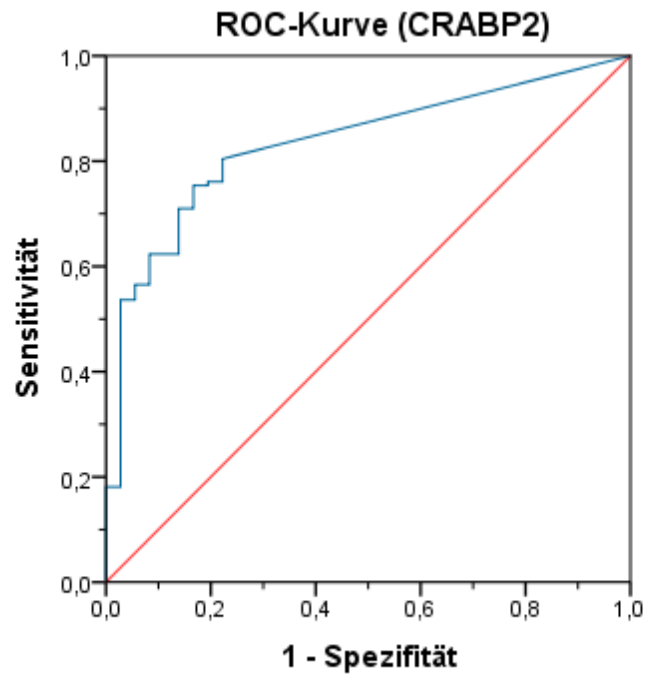


Abbildung 3: ROC Analyse zu CRABP2.

4.8.3 Vergleich der Proteinexpression von CRABP2 in den unterschiedlichen FIGO-Stadien

Es konnte eine Abhängigkeit zwischen FIGO- Stadium und Expression von CRABP2 festgestellt werden. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den einzelnen FIGO- Stadien. Der Durchschnittswert des Histo-Scores stieg mit steigendem FIGO-Stadium an. So lag der Durchschnittswert in Stadium I bei 20,21 ($\pm 34,71$) in Stadium II lag er bei 33,29 ($\pm 26,11$) bis er schließlich im Stadium IV einen Wert von 42,35 ($\pm 26,94$) erreichte.

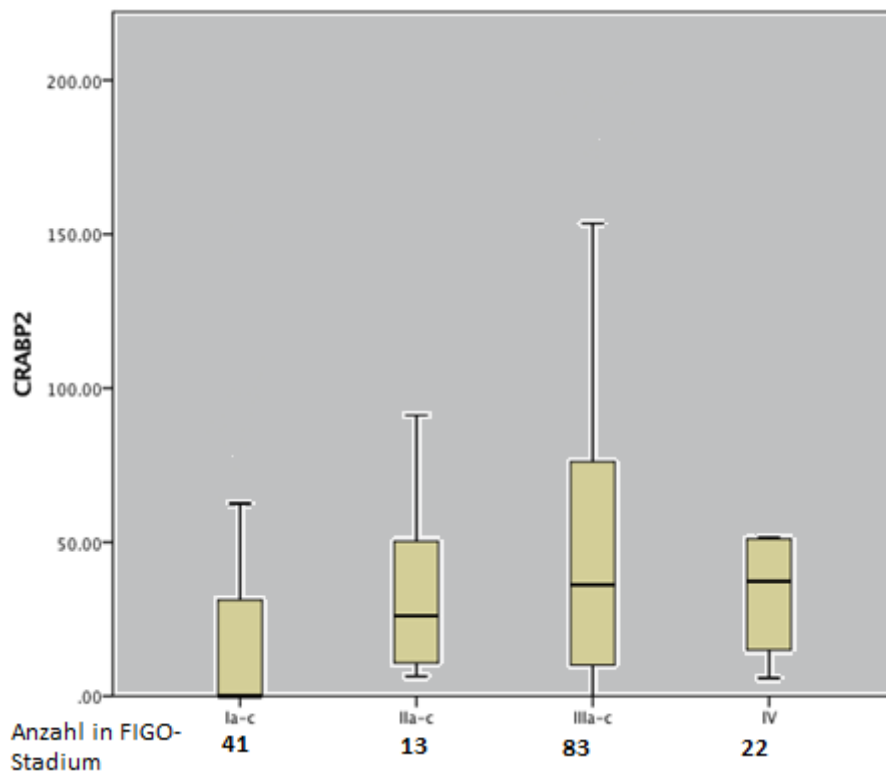


Abbildung 4: Expression von CRABP2 in den verschiedenen FIGO Stadien.

4.8.4 CRABP2 Expression und Peritonealkarzinose

Bei Patientinnen, die während der Primäroperation eine peritoneale Metastasierung aufzeigten, konnte eine vermehrte Expression von CRABP2 nachgewiesen werden. Analog dazu konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von CRABP2 bei Patientinnen mit Aszites ermittelt werden ($p=0,06$)

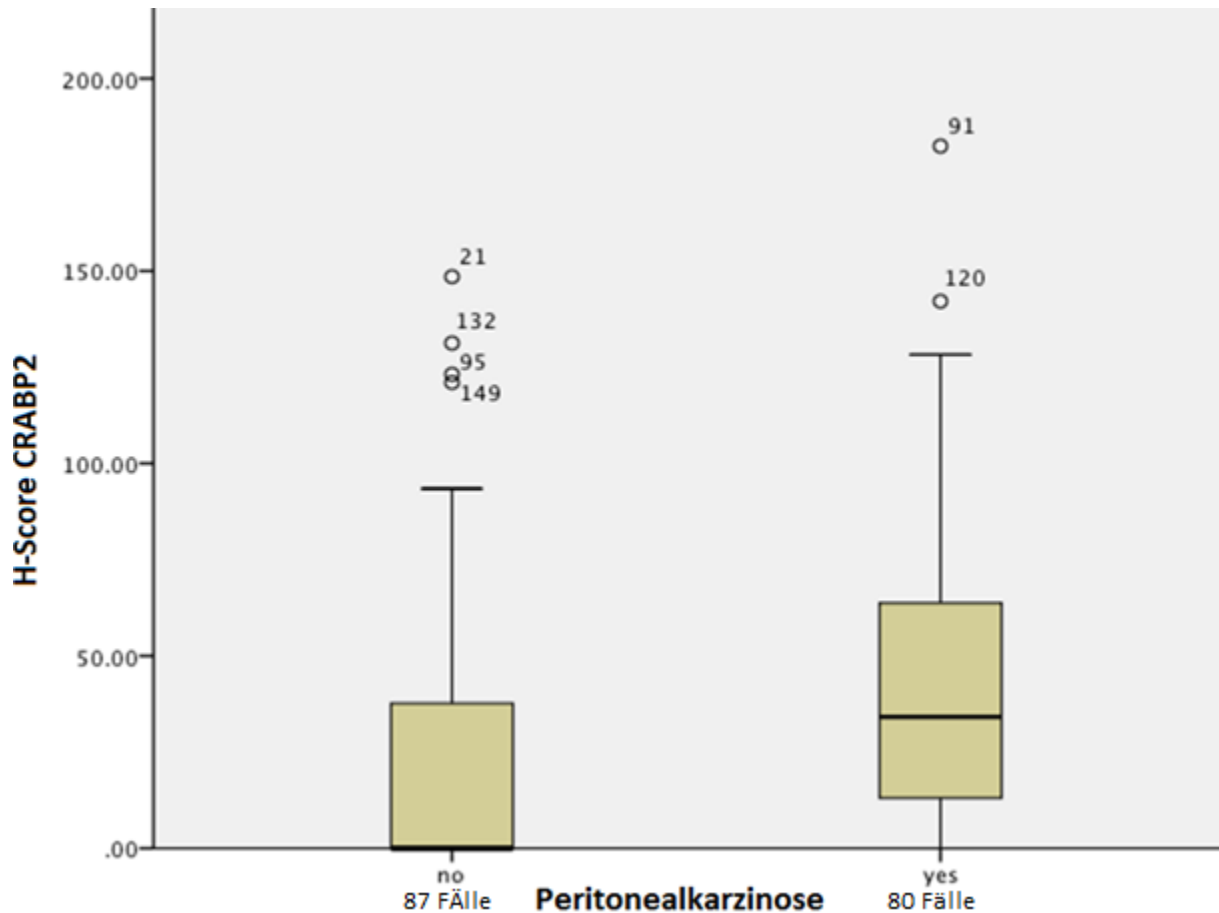


Abbildung 5: CRABP2 und Peritonealkarzinose.

4.8.5 Krankheitsfreies Überleben in Bezug auf die Expression von CRABP2 Expression

Als Ereignis wurde in dieser Untersuchung der Zeitpunkt des bestätigten Rezidives definiert. Um die verschiedenen starken Expressionsmuster von CRABP2 beim Ovarialkarzinom unterscheiden zu können wurde eine Grenze bei einem Histo-Score Wert von 55 gewählt. Dieser Wert teilt das Kollektiv so ein, dass 25% der Karzinome (42 Fälle) eine höhere Expression, und 75% (98 Fälle) eine niedrigere Expression nachweisen. Hierbei zeigte sich, dass alle 42 Patientinnen mit einer hohen CRABP2 Expression (>55 im Histo-Score) innerhalb von 10 Jahren ein Rezidiv erlitten, oder zensiert wurden. Ein typisches Beispiel für eine Zensur wäre eine lost-to-follow-up (LOF) Situation, in der sich eine Patientin aufgrund unterschiedlichster Ereignisse der Nachsorge entzieht. In der Gruppe der Patientinnen mit einer Expression von unter 55 rezidierte der Tumor innerhalb des Beobachtungszeitraumes nur bei 62% der Patientinnen.

Zusammenfassend zeigte die Überlebenszeitanalyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen CRABP2 Proteinexpression und dem krankheitsfreien Überleben. Eine erhöhte Expression war dabei prädiktiv für ein vermindertes krankheitsfreies Überleben ($p=0,002$).

Passend dazu zeigte eine Cox-Regressionsanalyse einen signifikanten Einfluss von CRABP2-Expression auf das Gesamtüberleben ($p=0,042$).

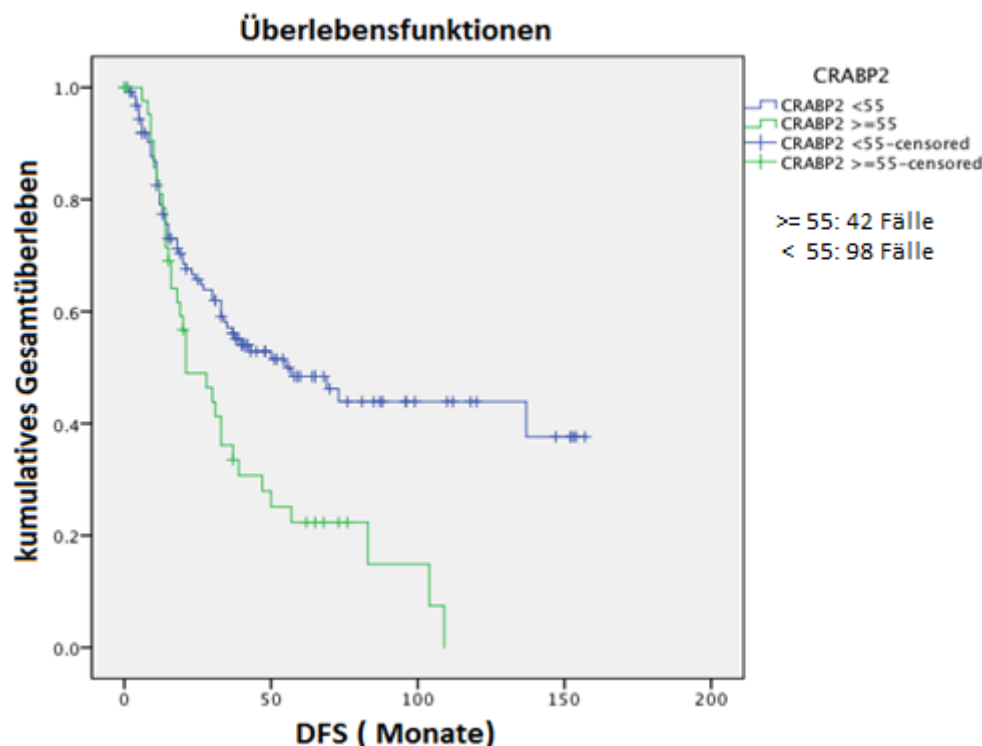


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen CRABP2 und DFS.

4.8.6 Gesamtüberleben in Bezug auf die Expression von CRABP2 Expression

In der Untersuchung des Einflusses der CRABP2 Expression auf das Gesamtüberleben (OS) wurde ebenfalls eine Einteilung der Kohorte vorgenommen. Es wurde die gleiche Unterteilung zur Gegenüberstellung der hohen Expressionen in der obersten Quartile (Histo-Score >55 mit 42 Fällen) gegen die unteren drei Quartilen (98 Fälle) vorgenommen. Hierbei zeigte sich ein verkürztes Gesamtüberleben der Gruppe, die bezüglich der CRABP2 Expression einen Wert von 55 überschritten. Eine erhöhte Expression von CRABP2 war prädiktiv für ein vermindertes Gesamtüberleben ($p=0,003$).

In weiteren Untersuchungen konnten keine signifikanten Einflüsse festgestellt werden.

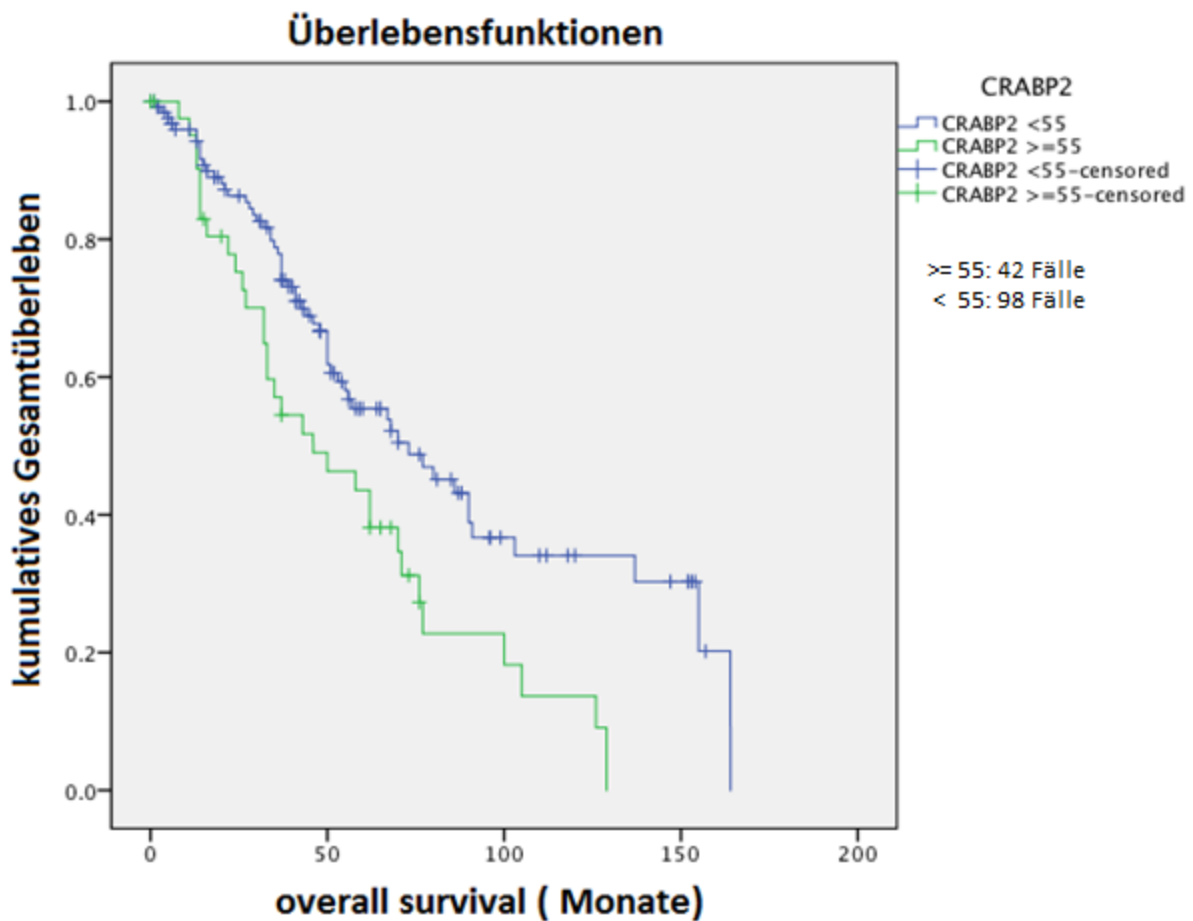


Abbildung 7: Die Expression von CRABP2 ist mit dem Gesamtüberleben assoziiert.

4.9 Ergebnisse der Färbungen von RAR α

Die Auswertung der Färbeergebnisse von RAR α erfolgte ebenfalls mithilfe des semiquantitativen Histo-Scores. Es konnten insgesamt 172 Tumoren repräsentativ untersucht werden.

4.9.1 Vergleich der Proteinexpression von RAR α zwischen malignen und nicht malignen Tumoren

Bei den 140 untersuchten Ovarialkarzinomen zeigte sich eine mittlere Expression von 45,49 (\pm 33,21). Unter den 19 untersuchten BOT- Tumoren konnte eine mittlere Expression von 64,94 (\pm 36,96) nachgewiesen werden.

Es standen repräsentative Schnitte von insgesamt 14 benignen Tumoren zur Verfügung, die eine mittlere Expression von RAR α von 77,43 (\pm 32,20) aufwiesen.

Im Vergleich zwischen den malignen Ovarialkarzinomen und den nicht malignen Tumoren (Benigne Tumoren und BOT- Tumoren) zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Maligne Tumoren exprimierten das untersuchte Protein im Vergleich zu den nicht-malignen Tumoren in signifikant geringerem Umfang. Der Median in der Gruppe der malignen Tumoren betrug 42,81. Bei den restlichen Tumoren lag der Median bei 66,17 bei einem Mittelwert von 70,24 (\pm 35,06).

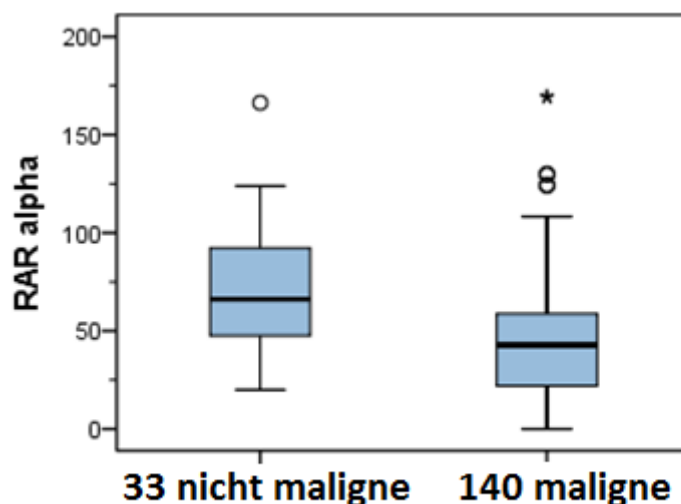


Abbildung 8: Die Expression von RAR α variiert zwischen den Dignitäten.

4.9.2 Unterscheidung der Expression von RAR α in benignen/malignen Tumoren

Eine durchgeführte ROC-Analyse ergab einen Cut-off Wert von 58,76. Dieser Wert stellt den besten Schwellenwert zur Differenzierung zwischen benignen und malignen Tumoren der bei der Unterscheidung zwischen malignen und nicht malignen Tumoren die höchste Sensitivität (74,82%) bei gleichzeitig höchster Spezifität (57,58%) erreicht.

Weitere statistische Untersuchungen zur Expression und prognostischen Relevanz von RAR α blieben ohne signifikante Ergebnisse.

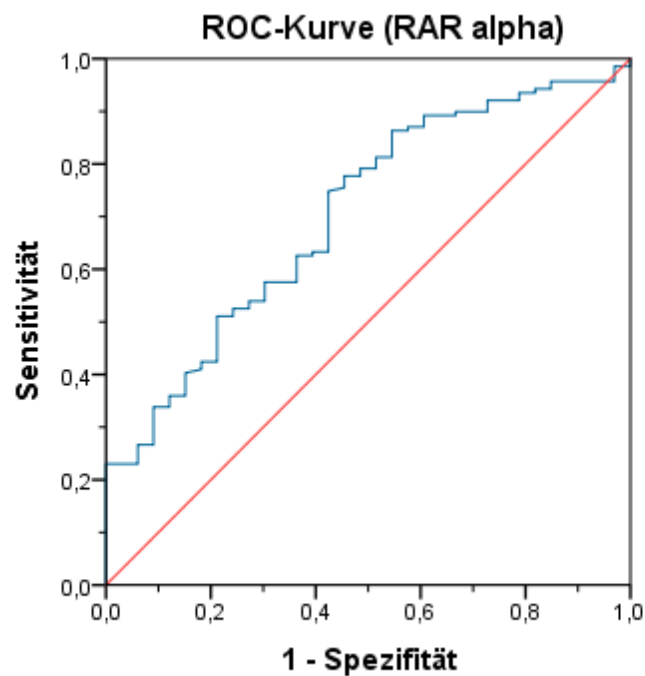


Abbildung 9: ROC Analyse zu RAR α .

4.10 Ergebnisse der Färbungen des Östrogenrezeptors α (ER α)

Die Färberegebnisse des ER α s wurden mithilfe des IRS nach Remmele ausgewertet. Insgesamt konnten 175 Tumoren repräsentativ bewertet werden.

4.10.1 Vergleich der Proteinexpression des Östrogenrezeptors α zwischen malignen und nicht malignen Tumoren

Nach Auswertung von 140 Ovarialkarzinomen zeigte sich eine mittlere Expression von 5,25 bei einer Standardabweichung von 3,98. Bei den BOT-Tumoren zeigte sich bei 19 untersuchten Tumoren eine durchschnittliche Expression von 7,74 (\pm 4,83). Die mittlere Proteinexpression in der Gruppe der benignen Tumoren betrug 8,28 (\pm 4,18). Die Gruppe der malignen Ovarialkarzinome zeigte im Vergleich zu der Gruppe der BOT-Tumoren und benignen Tumore eine signifikant geringere Expression des Östrogenrezeptors α ($p < 0,01$). In der Gruppe der Ovarialkarzinome lag der Median bei 6,00. Bei den nicht-malignen Tumoren lag der Median bei 9,00 bei einem Mittelwert von 8,00.

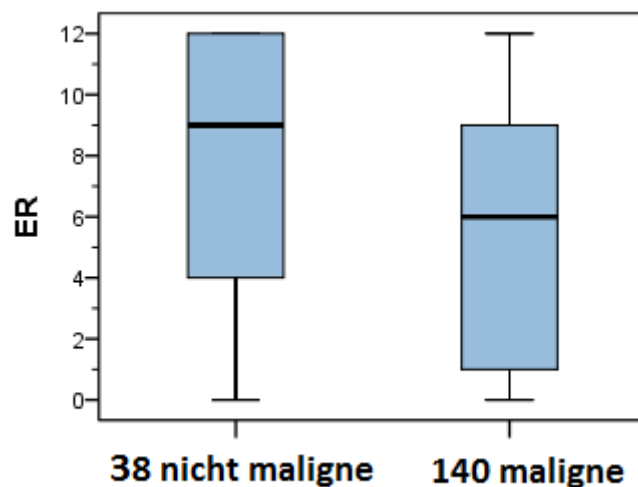


Abbildung 10: Die ER α Expression variiert zwischen den Dignitäten.

4.10.2 Unterscheidung der Expression des Östrogenrezeptors α in benignen/malignen Tumoren

Durch eine ROC-Analyse konnte ein Cut-off Wert von 7,5 ermittelt werden, der bei der Unterscheidung zwischen malignen und nicht-malignen Tumoren die höchste Sensitivität (67,39%) und höchste Spezifität (67,57%) erreicht.

Alle weiteren statistischen Untersuchungen zur Expression des ER blieben ohne signifikante Ergebnisse.

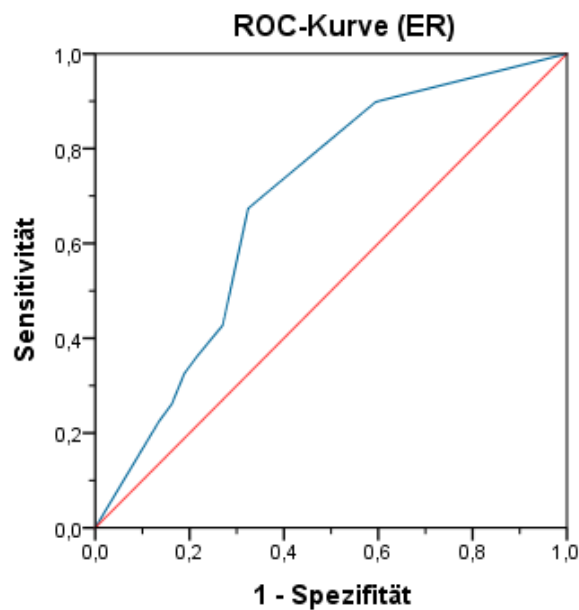


Abbildung 11: ROC Analyse zu ER.

4.11 Ergebnisse der Färbungen des Progesteronrezeptors (PR)

Die Auszählung und Bewertung des PR-Färbeergebnis erfolgte ebenfalls mithilfe des IRS nach Remmele. Von den 178 Tumoren lag von 174 Tumoren genug repräsentatives Material für eine Auszählung vor.

4.11.1 Vergleich der Proteinexpression des Progesteronrezeptors zwischen malignen und nicht malignen Tumoren

Die 140 ausgezählten Ovarialkarzinome zeigten eine mittlere Rezeptorexpression von 2,74 ($\pm 3,69$). Bei den BOT- Tumoren zeigte sich eine mittlere Expression von 7,37 ($\pm 4,95$), bei den benignen Tumoren lagen die Werte bei 9,33 ($\pm 3,48$).

Im Vergleich der malignen mit der nicht malignen Gruppe (BOT und benigne Tumoren) zeigte sich eine signifikant geringere Expression des Progesteronrezeptors bei malignen Tumoren ($p < 0,01$).

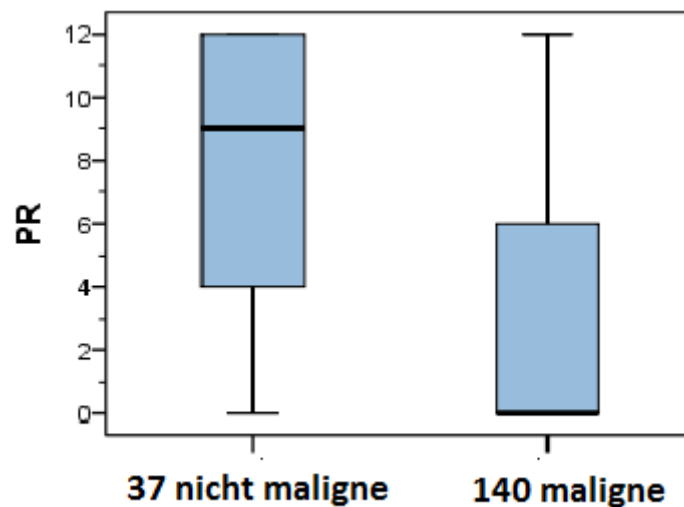


Abbildung 12: Die PR Expression variiert zwischen den Dignitäten.

4.11.2 Unterscheidung der Expression des Progesteronrezeptors in benignen/malignen Tumoren

Um einen Cut-Off Wert zwischen malignen und nicht-malignen Tumoren zu ermitteln wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Dabei konnte für einen Wert von 7,0 die höchste Sensitivität (89,29%) und Spezifität (70,59%) ermittelt werden.

Weitere Untersuchungen zur Expression von PR zeigten keine signifikanten Ergebnisse.

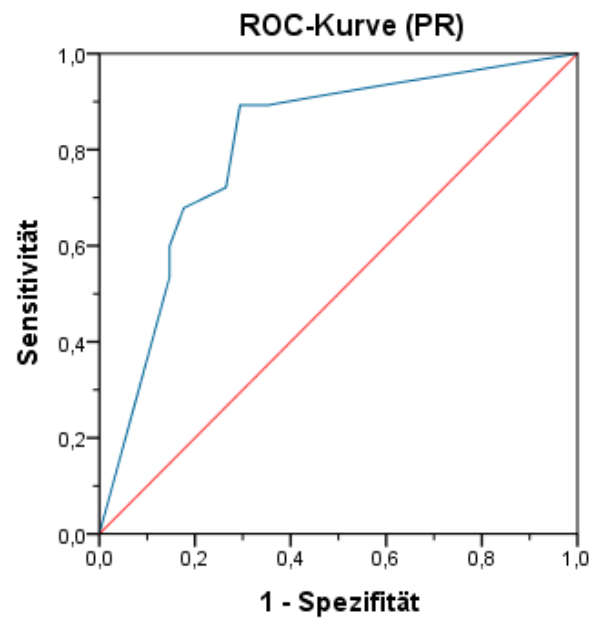


Abbildung 13: ROC Analyse zu PR.

4.12 Korrelation der Marker untereinander

	RAR α	ER α	PR	Ki67
CRABP2	p= 0,261 R= -0,87	p= 0,327 R= -0,075	<u>p= 0,022</u> <u>R= - 0,175</u>	p< 0,001 R= 0,394
RAR α	--	p= 0,77 R= 0,136	p= 0,136 R= 0,114	p= 0,002 R= -0,234
ER α	--	--	p< 0,001 R= 0,366	p= 0,002 R= -0,234
PR	--	--	--	p< 0,001 R= -0,293

Tabelle 8: Korrelationen der Marker untereinander.

Signifikanz auf 0,01 Niveau

Signifikanz auf 0,05 Niveau

Im Vergleich der einzelnen Marker untereinander zeigte CRABP2 eine positive Korrelation mit Ki67 (p=0,01; R= 0,394) und eine negative Korrelation mit dem PR (p= 0,022; R= - 0,175). RAR α zeigte eine schwache, aber signifikante negative Korrelation mit Ki67 (p=0,002; R= -0,234). Die Steroidhormonrezeptoren ER und PR zeigten untereinander eine signifikant positive Korrelation (p<0,001; R= 0.366). Mit dem Marker Ki67 korrelierten sowohl PR (p<0,001; R=-0,293) als auch ER (p=0,002; R=-0,234) negativ.

Weitere Vergleiche mit deskriptiven Faktoren wie dem BMI und dem Alter der Erstdiagnose zeigten keine weiteren nennenswerten Korrelationen.

5. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war der immunhistochemische Nachweis und die Untersuchung der prognostischen Relevanz des Expressionsmusters von CRABP2, RAR α , ER und PR auf Proteinebene bei verschiedenen Ovarialtumoren. Dafür wurde die Expression der einzelnen Marker in Ovarialkarzinomen mit der Expression in benignen Tumoren und der in BOT verglichen. Hierfür war die Etablierung neuer Färbeprotokolle für die Marker CRABP2, RAR α vonnöten. Darüber hinaus wurden die erhobenen Daten mit einer klinischen Datenbank korreliert, um klinisch relevante Aussagen sowie Einflüsse auf individuelle Parameter treffen zu können. Zusätzlich wurde der Einfluss von CRABP2 auf das Gesamtüberleben untersucht.

5.1 Klinisch-pathologische Faktoren

Mit insgesamt 140 Ovarialkarzinomen ist diese Arbeit bezüglich der Fallzahl mit anderen Untersuchungen in der Literatur zu vergleichen. Dort werden auch aufgrund der geringen Inzidenz oftmals Kollektive von unter 100 Tumoren untersucht. Die beiden Vergleichsgruppen der BOT und benignen Tumoren stellen mit jeweils 19 Fällen jedoch eher eine geringe Fallzahl dar. Dennoch lassen sich valide Schlüsse auf den Vergleich zwischen den Dignitäten ziehen. Deswegen wurden zum Beispiel innerhalb des Kollektivs der benignen Ovarialtumoren und der BOT darauf geachtet, dass die Altersstruktur mit dem Patientengut der Ovarialkarzinome vergleichbar ist. Das erklärt das höhere Durchschnittsalter der Patientinnen in diesen Gruppen im Vergleich zu den deutlich jüngeren Angaben in der Literatur (5). Die Gruppe der Ovarialkarzinome stellt das repräsentative Patientinnengut des UKSH, Campus Kiel, die zwischen 01.01.1997 und 31.12.2007 an einem Ovarialkarzinom operiert wurden, dar. Die Tatsache, dass das durchschnittliche Alter der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom in unserem Kollektiv bei 62,0 Jahren, und damit 7 Jahre unter dem bundesweiten Durchschnitt lag, kann der begrenzten Fallzahl geschuldet sein.

Gegenstand aktueller Diskussionen ist die Frage, in wieweit Adipositas als Risikofaktor für ein Ovarialkarzinom zu bewerten ist. Zahlreiche Studien sprechen dafür und benennen die Adipositas als moderaten Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinomes (82) (83). So sind etwa 40% der Ovarialkarzinompatientinnen als übergewichtig zu klassifizieren (84). Angelehnt an die Definition der WHO nimmt der BMI für die Einschätzung des Körpergewichtes eine führende Rolle ein. In dieser Arbeit betrug der durchschnittliche BMI einer Patientin mit einem Ovarialkarzinom 24,8 kg/m². Dieser Wert liegt knapp unterhalb des Präadipo-

sitasbereichs, den die WHO mit einem BMI-Wert ab 25 kg/m² bemisst (85). Dieser Wert entspricht jedoch dem durchschnittlichen BMI von Frauen, der in Deutschland momentan knapp 25 kg/m² beträgt. Ein Grund für dieses Ergebnis kann sein, dass der BMI der Patientinnen zum Zeitpunkt der Operation bestimmt wurde. Das Ovarialkarzinom, im Endzustand mit einer *Facies ovarica*, einem ausgemergeltem Habitus, einhergehend, gilt als sehr belastende und zehrende Krankheit. Somit spiegelt der BMI zum Zeitpunkt der Operation eventuell nicht den BMI in der Phase der Krankheitsentstehung wieder. Passend hierzu gilt in der Literatur insbesondere der BMI in der Phase der jungen Adoleszenz als Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms (15).

Von entscheidender Bedeutung für die Auswertung einer Arbeit über das Ovarialkarzinom ist die histologische Entität der untersuchten Tumoren. Da diese Arbeit die Proben aller Patientinnen eines Universitätskrankenhauses innerhalb von zehn Jahren untersucht, konnte eine nahe der Literatur gelegene Verteilung der histologischen Entitäten angenommen werden.

Mit insgesamt knapp 75% seröser und 23% endometroider Ovarialkarzinome entspricht das Kollektiv der aktuellen Literaturmeinung, die die Inzidenz seröser Karzinome auf etwa 70 % und den der endometroiden auf 10-15% schätzt (29). Auffallend war jedoch der Anteil der muzinösen Karzinome, der mit 2,2% um einiges geringer als die in der Literatur angegebenen 10% war. Dies kann an der insgesamt geringen Fallzahl liegen.

Mit 63,3% befand sich über die Hälfte der Karzinome in fortgeschrittenen FIGO- Stadien IIIC und IV. Dies verdeutlicht den Bedarf neuer diagnostischer und therapeutischer Methoden und steht im Einklang mit der gängigen Meinung, dass das Ovarialkarzinom unter anderem deshalb oftmals so schwerwiegend verläuft, weil es erst zu einem späten Zeitpunkt diagnostiziert wird, da aktuell keine entsprechende Vorsorge etabliert werden konnte (24) (25).

5.2 Expression von CRABP2

Besonderes Interesse innerhalb der vorliegenden Arbeit galt der Expression und prognostischen Bedeutung von CRABP2 in Ovarialkarzinomen sowie dem Vergleich der Expression mit BOT und benignen Tumoren. Aktuell existieren in der Literatur keine Untersuchungen zur prognostischen Aussagekraft von CRABP2 beim Ovarialkarzinom. Bei einigen anderen Malignomen, wie dem Glioblastoma multiforme oder dem Nicht-kleinzelligen-Bronchialkarzinom wurde CRABP2 bereits als negativer prognostischer Faktor beschrieben.

In dieser Arbeit zeigte die Gruppe der Ovarialkarzinome eine signifikant erhöhte Expression von CRABP2 im Vergleich zu den BOT und benignen Tumoren. Im Vergleich der einzelnen histologischen Entitäten innerhalb der Ovarialkarzinome konnte eine vermehrte Expression von CRABP2 sowohl bei serösen, als auch endometrioiden Karzinomen nachgewiesen werden.

Die Expression von CRABP2 scheint sich innerhalb verschiedener Tumoren und Geweben stark zu unterscheiden. Wie bereits erwähnt, wird CRABP2 konstitutionell unter anderem in Haut- und Muskelgewebe exprimiert. Untersuchungen an verschiedenen Malignomen zeigten dabei gegensätzliche Ausprägungen. So findet sich beispielsweise in Prostata- und Ösophaguskarzinomen eine stark verminderte Expression von CRABP2, in anderen Malignomen wie dem Nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinomen oder Mammakarzinomen jedoch eine vermehrte Expression von CRABP2 (86). Dabei korrelierten die jeweiligen Expressionen vor allem mit der individuellen Prognose, sodass CRABP2 zum Beispiel beim Ösophaguskarzinom aktuell als prognostischer Marker vorgeschlagen wird (86). Einige Arbeitsgruppen postulieren eine mögliche therapeutische Wirkung durch eine Reduzierung des CRABP2 Spiegels in Malignomen (87).

Mit einem Anteil von 63,3% befand sich zum Diagnosezeitpunkt weit über die Hälfte der Ovarialkarzinome bereits in den fortgeschrittenen FIGO- Stadien IIIC und IV. Interessanterweise konnte eine Abhängigkeit zwischen FIGO-Stadium und CRABP2 Expression nachgewiesen werden. Es zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Stadien, die durchschnittliche Expression verdoppelte sich zwischen Stadium I und IV. Bei den benignen Tumoren war eine Expression von CRABP2 in überhaupt nur einem Fall nachweisbar. Dies unterstreicht die eventuell vorhandene wichtige Rolle in der Entwicklung eines Karzinoms.

Weitere prognostisch ungünstige Parameter gingen mit einer vermehrten Expression von CRABP2 einher. So zeigten Patientinnen, die während der Erstoperation eine Peritonealkarzinose oder Aszites aufzeigten, eine signifikant erhöhte Expression von CRABP2.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass CRABP2 auf histologischer Ebene besonders beim serösen, weniger beim endometrioiden Ovarialkarzinom exprimiert wird. Desweiteren wurden die höchsten Expressionen bei fortgeschrittenen Karzinomen nachgewiesen. Eine erhöhte CRABP2 Expression war sowohl prädiktiv für ein vermindertes krankheitsfreies Überleben ($p = 0,002$) als auch für ein vermindertes Gesamtüberleben ($p = 0,003$). Ob die Ova-

rialkarzinome mit erhöhter CRABP2 Expression auf eine zielgerichtete Blockade von CRABP2 reagieren, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Sollten sich positive Effekte, wie beispielsweise eine antiproliferative Wirkung, durch eine Blockade erreichen lassen, so stellt CRABP2 zusätzlich zu der in dieser Arbeit nachgewiesenen prognostischen Aussagekraft ein interessantes Target für eine hochspezifische Therapie dar.

5.3 Expression von RAR α

Im Anschluss an die guten Ergebnisse der CRABP2 Untersuchungen stellte sich die Frage, welche weiteren Proteine des Retinsäurestoffwechsels eine wichtige Rolle in dem Signalweg spielen könnten. Dazu konnten in der Literatur verschiedene Angaben gefunden werden (vgl. Kap 2.1.2). So wurde als potenzieller Zielrezeptor RAR α identifiziert und genauer untersucht.

Hier zeigten die Ovarialkarzinome eine durchschnittliche Expression von 45,49 (H-Score) und damit eine geringere Expression als die BOT-Tumoren mit 64,94. Die höchste Expression wurde bei den benignen Tumoren mit einem H-Score von durchschnittlich 77,43 nachgewiesen. Damit zeigte sich im Vergleich zu den Ergebnissen der CRABP2-Anfärbungen ein gegensätzliches Ergebnis. Es scheint, als ob der RAR α im Gegensatz zu CRABP2 herunterreguliert sei.

Als Zielrezeptor des Retinoidstoffwechsels übt RAR α ein antiproliferatives, pro-apoptotisches und differenzierendes Signal auf die Zelle aus (vgl. Kap 2.1.3). Dennoch stehen die Ergebnisse nicht im Einklang mit der Literatur, die eine vermehrte Expression von RAR α vor allem in fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen nachweisen konnte (55). *Daponte* wies in einer Studie mit geringer Fallzahl (47 seröse Ovarialkarzinome) ebenfalls eine erhöhte Expression von RAR α in leicht bis mittelgradigen Karzinomen nach, in höhergradigen Stadien war die Expression des Rezeptors sogar ein unabhängiger prognostischer Faktor hinsichtlich PFS. Darüber hinaus war eine erhöhte Expression mit einem vermindertem Ansprechen auf die First-Line-Chemotherapie (Taxan und Carboplatin) assoziiert (88).

In dieser Untersuchung war das Ergebnis gegenteilig. Die hier untersuchten Ovarialkarzinome exprimierten das Protein in signifikant geringerem Ausmaß ($p < 0,001$) und es konnten keine Korrelationen hinsichtlich PFS oder OS ermittelt werden

Dieser Widerspruch sollte in kommenden Studien mit höheren Fallzahlen genauer untersucht werden. Aufgrund seiner in der Literatur beschriebenen prognostischen Wertigkeit sowohl hinsichtlich progressionsfreien Überlebens als auch auf das Ansprechen auf die First-Line

Chemotherapie bietet sich der RAR α als individueller Marker an. Diese These konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Hier sollten weitere Zielrezeptoren des Retinoidstoffwechsels untersucht werden, um identifizieren zu können, über welche Interaktionen mit Rezeptoren CRABP2 wirkt.

5.4 Expression von ER α

Aufgrund der aktuell herrschenden Kontroversen über die Bedeutung und Rolle des Östrogenstoffwechsels in Ovarialkarzinomen wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Expression des ER α untersucht. Beim Mammakarzinom wurde bereits nachgewiesen, dass eine Heterodimerbildung von RAR α und ER α Grundlage für eine effiziente Östrogenwirkung auf die Zielzelle ist (89).

Im Gegensatz zu zahlreichen Erkenntnissen beim Mammakarzinom ist die Rolle des ER und insbesondere des ER α beim Ovarialkarzinom Gegenstand aktueller Diskussionen. Obwohl beide Isoformen des Östrogenrezeptors strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten haben, wird ihnen eine gegensätzliche Wirkung zugeschrieben (90). ER α wird hierbei oftmals als Onkogen bezeichnet, das für das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen steht. Dem Gegenüber wird der ER β als Tumorsuppressorgen gestellt, das eine antiproliferative und apoptosefördernde Wirkung entfalten soll. Dennoch ist die Rolle des ER in Ovarialkarzinomen immer noch größtenteils unklar (87).

In der Literatur wird von einer erhöhten Expression des ER α insbesondere beim serösen Ovarialkarzinom berichtet (63). Dennoch zeigten bereits durchgeführte Studien keinen langfristigen Benefit für die Patientinnen nach medikamentöser Blockierung des Rezeptors (64).

Eine aktuelle Studie postuliert, dass eine erhöhte Expression von ER α mit einer besseren Fünf-Jahresprognose für endometroide Ovarialkarzinome einhergeht (91).

Zwischen den beiden Steroidhormonrezeptoren ER und PR konnte eine positive Korrelation nachgewiesen werden ($p < 0,001$; $R = 0,366$). Passend dazu wird der ER in der Literatur als Regulator der PR Expression beschrieben (92).

In dieser Arbeit zeigte die Gruppe der Ovarialkarzinome gegenüber den anderen Entitäten eine signifikant verringerte Expression von ER α ($p < 0,001$). Einer mittleren Expression von einem IRS 5,25 standen signifikant erhöhte Werte für die BOT und benignen Tumoren ge-

genüber. Dies steht im Widerspruch zur Literatur und sollte in weiteren Untersuchungen spezifiziert werden.

5.5 Expression von PR

Das Steroidhormon Progesteron nimmt in der Diskussion über die Entstehung eines Ovarialkarzinoms ebenfalls eine interessante Rolle ein. Wie bereits erwähnt existieren vom Progesteronrezeptor ebenfalls zwei Isoformen. In anderen Untersuchungen zeigen insbesondere endometroide und seröse Ovarialkarzinome in bis zu 35% der Fälle eine verstärkte Progesteronrezeptorexpression (89). In dieser Arbeit zeigte die Gruppe der Ovarialkarzinome eine signifikant erniedrigte Expression des PRs. Einer mittleren Rezeptorexpression von IRS 2,74 standen erhöhte Werte für die Gruppe der BOT (IRS 7,37) und den benignen Tumoren (IRS 9,33) gegenüber.

Insgesamt wird dem Progesteron eine protektive Rolle in der Genese des Ovarialkarzinoms zugeschrieben. Passend zu den festgestellten protektiven Faktoren wie Multiparität und orale Kontrazeptiva, beide mit vermehrten Progesteronspiegeln einhergehend, konnte eine Abnahme der Progesteronrezeptoren mit der Entwicklung von Ovarialkarzinomen korreliert werden (66).

In einer Metaanalyse ging eine erhöhte Progesteronrezeptorexpression mit einer günstigeren Prognose einher (93).

Es zeigte sich, dass die Ovarialkarzinome in unserer Kohorte im Vergleich zu nicht malignen Tumoren des Ovars signifikant verringerte Progesteronrezeptorexpressionen aufwiesen. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine negative signifikante Korrelation zwischen CRABP2 und PR nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Dieses Ergebnis ist im Zusammenhang zwischen der in dieser Arbeit nachgewiesenen negativen Prognose bei erhöhter CRABP2 Expression und der in der Literatur beschriebenen negativen Prognose bei erniedrigten Progesteronrezeptorexpression durchaus nachzuvollziehen. Demnach kommt eine erniedrigte Progesteronrezeptorexpression als Risikofaktor für den weiteren Verlauf eines Ovarialkarzinoms infrage.

5.6 Validität und Aussicht

Viele Studien zu Tumoren des Ovars sind oftmals durch eine geringe Fallzahl an Patientinnen sowie geringer Nachbeobachtungszeit und Datenerhebung gekennzeichnet. Dies liegt unter

anderem in der im Verhältnis zu häufigen Karzinomen wie dem Mamma- oder Prostatakarzinom geringen Inzidenz des Ovarialkarzinoms begründet. Diese Dissertation nimmt sowohl bezüglich der Fallzahl mit insgesamt 178 untersuchten Ovarialtumoren als auch der langen Nachsorgeuntersuchungen in der Literatur eine relevante Rolle ein.

Nachteilig sind der hohe Anteil der serösen Ovarialkarzinome im Vergleich der einzelnen histologischen Entitäten und besonders der geringe Anteil muzinöser Karzinome. Des Weiteren erlauben die Kollektive der nicht malignen Tumoren mit nur jeweils 19 Tumoren nur eine begrenzte Aussagekraft über den Vergleich zwischen den Dignitäten.

Die Nutzung von TMAs stellt, wie bereits erwähnt, eine etablierte Methode zur immunhistochemischen Untersuchung dar. Zur Verbesserung der Aussagekraft wurden in dieser Arbeit bei der Erstellung des TMAs jeweils drei Tumorstanzen und eine Stromastanze untersucht. Besonders kritisch ist die Beurteilung von BOT mithilfe von TMAs zu sehen, da das Gewebe dieser Tumoren sehr heterogen sein kann.

Um aus den Ergebnissen dieser Arbeit valide Aussagen treffen zu können, ist es notwendig, dass die in dieser Dissertation durchgeführten Expressionsanalysen in Kollektive mit größeren Fallzahlen reevaluiert und beurteilt werden.

6. Zusammenfassung

Aufgrund seiner unspezifischen Frühsymptome und damit verbundener später Diagnosestellung gehört das Ovarialkarzinom trotz relativ geringer Inzidenz von 18/100.000 Einwohnerinnen zu den tödlichsten Genitaltumoren bei Frauen. Aktuell sind weder zuverlässige Aussagen oder Prognosen über den individuellen Krankheitsverlauf noch individuelle, tumorspezifische Therapieansätze möglich. Hierfür bedarf es weiterer tumorbiologischer Kenntnisse. Der Bedarf neuer sowohl prognostisch als auch therapeutisch bedeutsamer Biomarker ist immens.

Der Retinsäurestoffwechsel, in anderen Malignomen bereits Bestandteil individueller Therapien und Prognosen, könnte ein interessanter Ansatz dafür sein und sollte in dieser Arbeit beispielhaft an den Proteinexpressionen von cellular-retinoic-acid-binding protein 2 (CRABP2) und retinoic-acid-receptoralpha (RAR α) untersucht werden. Zusätzlich wurden Untersuchungen der Sexualhormonrezeptoren Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression durchgeführt. Anschließend wurden alle Expressionen mit einer umfangreichen klinischen Datenbank korreliert.

Hierfür wurden 178 Ovarialtumoren, aufgeteilt in 140 Ovarialkarzinome, 19 Tumore des Borderlinetypes (BOT) und 19 benigne Tumoren, in Form von Micro-Tissue-Arrays (TMAs) angefärbt und untersucht. Dafür wurden neue Färbeprotokolle für die Darstellung der CRABP2 und RAR α Expression etabliert.

Im Wesentlichen zeigte sich, dass CRABP2 im Vergleich zu den anderen Dignitäten insbesondere in Ovarialkarzinomen, und dabei bei Karzinomen des serösen Typs exprimiert wurde. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression vor allem bei höhergradigen, fortgeschrittenen Tumoren nachgewiesen werden. Passend dazu litten Patientinnen mit erhöhter CRABP2 Expression in signifikant erhöhtem Umfang an einer Peritonealkarzinose und Aszites. Es stellte sich heraus, dass eine erhöhte CRABP2 Expression in der Kohorte mit prädiktiv sowohl für ein vermindertes krankheitsfreies Überleben ($p=0,002$) als auch für ein verkürztes Gesamtüberleben war ($p=0,003$). Es zeigte sich eine positive Korrelationen zwischen CRABP2 und dem Proliferationsmarker Ki-67 und eine negative mit dem Progesteronrezeptor ($p<0,05$).

Die Untersuchung der RAR α Expression zeigte gegensätzliche Ergebnisse. Hier zeigte die Gruppe der Ovarialkarzinome eine signifikant verringerte Expression ($p<0,01$) als die benignen Tumoren. Es zeigten sich keine weiteren Korrelationen.

Bei der Bestimmung der Sexualhormonexpression zeigte die Gruppe der Ovarialkarzinome sowohl bezüglich der ER als auch der PR Expression eine verringerte Expression. Die beiden untersuchten Sexualhormonrezeptoren standen in einer positiven Korrelation zueinander ($p < 0,001$).

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass der Retinsäurestoffwechsel ein interessantes Target für weitere Untersuchungen darstellt. Eine erhöhte Expression von CRABP2 konnte als prognostisch bedeutsamer Risikofaktor identifiziert werden. Weitere Untersuchungen des Stoffwechselweges könnten ebenfalls interessante Ziele für eine individuelle Therapie aufzeigen.

Die Rolle der Sexualhormonrezeptoren bleibt weiter ungeklärt, hierzu sind weitere Untersuchungen vonnöten um die prognostische und therapeutische Relevanz weiter zu beleuchten.

Literaturverzeichnis

1. Scully RE. Classification of human ovarian tumors. *Environ Health Perspect.* 1987;73:15–24.
2. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* [Internet]. 2000;19(1):3–10. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10883018>
3. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland. *Krebs Deutschl.* 2012;(10):90–3.
4. Yokoyama Y, Mizunuma H. Recurrent epithelial ovarian cancer and hormone therapy. *World J Clin Cases.* 2013;1(6):187–90.
5. Skirnisdttir I, Garmo H, Wilander E, Holmberg L. Borderline ovarian tumors in Sweden 1960-2005: Trends in incidence and age at diagnosis compared to ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2008;123(8):1897–901.
6. Fischerova D, Zikan M, Dundr P, Cibula D. Diagnosis, treatment, and follow-up of borderline ovarian tumors. *Oncologist.* 2012;17(12):1515–33.
7. Fathalla MF. INCESSANT OVULATION-A FACTOR IN OVARIAN NEOPLASIA *The Lancet.* 1971. S. 163.
8. Fleming JS, Beaugi CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2006. S. 4–21.
9. Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G, Brinton L, u. a. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls. *Lancet.* 2008;371(9609):303–14.
10. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. *Facts, views Vis ObGyn.* 2013;5(4):292–7.
11. Tone AA, Virtanen C, Shaw P, Brown TJ. Prolonged postovulatory proinflammatory signaling in the fallopian tube epithelium may be mediated through a BRCA1/DAB2 axis. *Clin Cancer Res.* 2012;18(16):4334–44.
12. Group C, Cancer O. Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis including 28 114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):946–56.
13. Bae HS, Kim HJ, Hong JH, Lee JK, Lee NW, Song JY. Obesity and epithelial ovarian cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *J Ovarian Res.* 2014;7:41.
14. Leitzmann MF, Koebnick C, Danforth KN, Brinton LA, Moore SC, Hollenbeck AR, u. a. Body mass index and risk of ovarian cancer. *Cancer.* 2009;115(4):812–22.
15. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review

- and meta-analysis. *JAMA*. 2013;309(1):71–82.
16. Nielsen HR, Nilbert M, Petersen J, Ladelund S, Thomassen M, Pedersen IS, u. a. BRCA1/BRCA2 founder mutations and cancer risks: impact in the western Danish population. *Fam Cancer* [Internet]. 2016;1–6. Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s10689-016-9875-7>
 17. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, u. a. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med*. 2002;346(21):1616–22.
 18. Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis C a, u. a. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med*. 2002;346(21):1609–15.
 19. Herr O, Singer P. Sind die meisten Ovarialkarzinome gar keine. 2011;2000–2.
 20. Vang R, Shih IM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*. 2009;16(5):267–82.
 21. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.10).
 22. Olson SH, Mignone L, Nakraseive C, Caputo TA, Barakat RR, Harlap S. Symptoms of ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 2001;98(2):212–7.
 23. ACOG. CO 477: The role of the obstetrician-gynecologist in the early detection of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 2011;117(3):742–6.
 24. Ebell MH1, Culp M2, Lastinger K1 DT. A systematic review of the bimanual examination as a test for ovarian cancer. *Am J Prev Med*. 2015;48(3):350–6.
 25. Partridge E, Kreimer AR, Greenlee RT, Williams C, Xu J-L, Church TR, u. a. Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2009;113(4):775–82. Verfügbar unter: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2728067&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 26. Kabawat SE, Bast RC, Bhan AK, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int J Gynecol Pathol*. 1983;2(3):275–85.
 27. Schorge JO, Modesitt SC, Coleman RL, Cohn DE, Kauff ND, Duska LR, u. a. SGO white paper on ovarian Cancer: Etiology, screening and surveillance. *Gynecologic Oncology*. 2010. S. 7–18.
 28. Fachgesellschaften + Patientenvertretung. S3 Leitlinie zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. 2013;<http://www.>Online version, abgerufen am 26.02.2016.
 29. Scully RE, Young RH CP. “Tumors of the ovary, fallopian tube, and broad ligament.”.

- 3rd series. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology; 1998. Fascicle 23.
30. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, u. a. Statement by the Kommission Ovar of the AGO: The New FIGO and WHO Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2015;75(10):1021–7.
 31. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: Testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer.* 1998;82(5):893–901.
 32. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: A meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2002;20(5):1248–59.
 33. Burges A, Schmalfeldt B. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(38):635–41.
 34. Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(3):183–203.
 35. Zhou Q, Chen A, Song H, Tao J, Yang H, Zuo M. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancer: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(3):3080–8.
 36. Noske A, Schwabe M, Weichert W, Darb-Esfahani S, Buckendahl A-C, Sehoul J, u. a. An intracellular targeted antibody detects EGFR as an independent prognostic factor in ovarian carcinomas. *BMC Cancer.* 2011;11(1):294.
 37. Wen WH, Reles A, Runnebaum IB, Sullivan-Halley J, Bernstein L, Jones LA, u. a. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol.* 1999;18(1):29–41.
 38. Hefler LA, Zeillinger R, Grimm C, Sood AK, Cheng WF, Gadducci A, u. a. Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006;103:512–7.
 39. Chapman MS. Vitamin A: History, Current Uses, and Controversies. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery.* 2012. S. 11–6.
 40. Doldo E, Costanza G, Agostinelli S, Tarquini C, Ferlosio A, Arcuri G, u. a. Vitamin A, cancer treatment and prevention: The new role of cellular retinol binding proteins. *BioMed Research International.* 2015.
 41. Fontana J a, Rishi a K. Classical and novel retinoids: their targets in cancer therapy. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK.* 2002;16(4):463–72.
 42. Zhang D, Holmes WF, Wu S, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids and ovarian cancer. *Journal of Cellular Physiology.* 2000. S. 1–20.
 43. Kanai M, Raz A, Goodman DS. Retinol-binding protein: the transport protein for

- vitamin A in human plasma. *J Clin Invest.* 1968;47(9):2025–44.
44. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* (80-). 1988;240:889–95.
 45. Dragnev KH, Rigas JR, Dmitrovsky E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist.* 2000;5(5):361–8.
 46. Bertone ER, Hankinson SE, Newcomb PA, Rosner B, Willet WC, Stampfer MJ, u. a. A population-based case-control study of carotenoid and vitamin A intake and ovarian cancer (United States). *Cancer Causes Control.* 2001;12(1):83–90.
 47. Koushik A, Wang M, Anderson KE, van den Bradt P, Clendenen T. Intake of vitamins A, C, and E and folate and the risk of ovarian cancer in a pooled analysis of 10 cohorts studies. *Cancer Causes Control.* 2015;26(9):1315–27.
 48. Guchelaar HJ1, Timmer-Bosscha H, Dam-Meiring A, Uges DR, Oosterhuis JW, de Vries EG MN. Enhancement of cisplatin and etoposide cytotoxicity after all-trans retinoic-acid-induced cellular differentiation of a murine embryonal carcinoma cell line. *Int J Cancer.* 55:442–7.
 49. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, u. a. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *The New England journal of medicine.* 1997.
 50. Shubeita HE, Sambrook JF, McCormick AM. Molecular cloning and analysis of functional cDNA and genomic clones encoding bovine cellular retinoic acid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(16):5645–9.
 51. Liu RZ1, Li S1, Garcia E1, Glubrecht DD1, Yin Poon H1, Easaw JC2 GR. Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma. *Glia.* 2016;64(6):963–7.
 52. Favorskaya I1, Kainov Y, Chemeris G, Komelkov A, Zborovskaya I TE. Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. *Tumor Biol.* 2014;35(Issue 10):10295–300.
 53. Toyama A, Suzuki A, Shimada T, Aoki C, Aoki Y, Umino Y, u. a. Proteomic characterization of ovarian cancers identifying annexin-A4, phosphoserine aminotransferase, cellular retinoic acid-binding protein 2, and serpin B5 as histology-specific biomarkers. *Cancer Sci.* 2012;103(4):747–55.
 54. Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(3):181–93.
 55. Xie H, Hou Y, Cheng J, Openkova MS, Xia B, Wang W, u. a. Metabolic profiling and novel plasma biomarkers for predicting survival in epithelial ovarian cancer. 2017;1–13.
 56. Peng X, Yun D, Christov K. Breast cancer progression in MCF10A series of cell lines is associated with alterations in retinoic acid and retinoid X receptors and with differential response to retinoids. *Int J Oncol.* 2004;25(4):961–71.

57. Johansson HJ, Sanchez BC, Mundt F, Forshed J, Kovacs A, Panizza E, u. a. Retinoic acid receptor alpha is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *Nat Commun.* 2013;4:2175.
58. Kappeler A, Aebi S, Kaiser PC, Ko M. Original article Retinoid receptors in ovarian cancer : expression and prognosis. 2005;(July):1477–87.
59. Ruff M, Gangloff M, Marie Wurtz J, Moras D. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res.* 2000;2(5):353–9.
60. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua S a, Jordan VC, Katzenellenbogen J a, Korach KS, u. a. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):773–81.
61. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *Journal of Clinical Investigation.* 2006. S. 561–70.
62. Cariou S, Donovan JC, Flanagan WM, Milic a, Bhattacharya N, Slingerland JM. Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):9042–6.
63. Schiavon G, Smith IE. Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16(2):206.
64. Jordan VC, Phelps E, Lindgren JU. Effects of anti-estrogens on bone in castrated and intact female rats. *Breast Cancer Res Treat.* 1987;10(1):31–5.
65. Viedma-Rodr??Guez R, Baiza-Gutman L, Salamanca-G??mez F, Diaz-Zaragoza M, Mart??nez-Hern??ndez G, Esparza-Garrido RR, u. a. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncology Reports.* 2014. S. 3–15.
66. Chen Y, Alvarez EA, Azzam D, Wander SA, Guggisberg N, Jord?? M, u. a. Combined Src and ER blockade impairs human breast cancer proliferation in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(1):69–78.
67. Li YF, Hu W, Fu SQ, Li JD, Liu JH, Kavanagh JJ. Aromatase inhibitors in ovarian cancer: is there a role? *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18(4):600–14.
68. Diep CH, Daniel AR, Mauro LJ, Knutson TP, Lange CA. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2015. S. R31–53.
69. Francesmary Modugno,1,2,3 Robin Laskey,3,4 Ashlee L Smith,4 Courtney L Andersen,3,5 Paul Haluska,6 and Steffi Oesterreich3 7. Hormone response in ovarian cancer: time to reconsider as a clinical target? *Endocr Relat Cancer.* 2012;19:255–79.
70. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schlüter C GJ. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics.* 1991;11:476–7.
71. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody

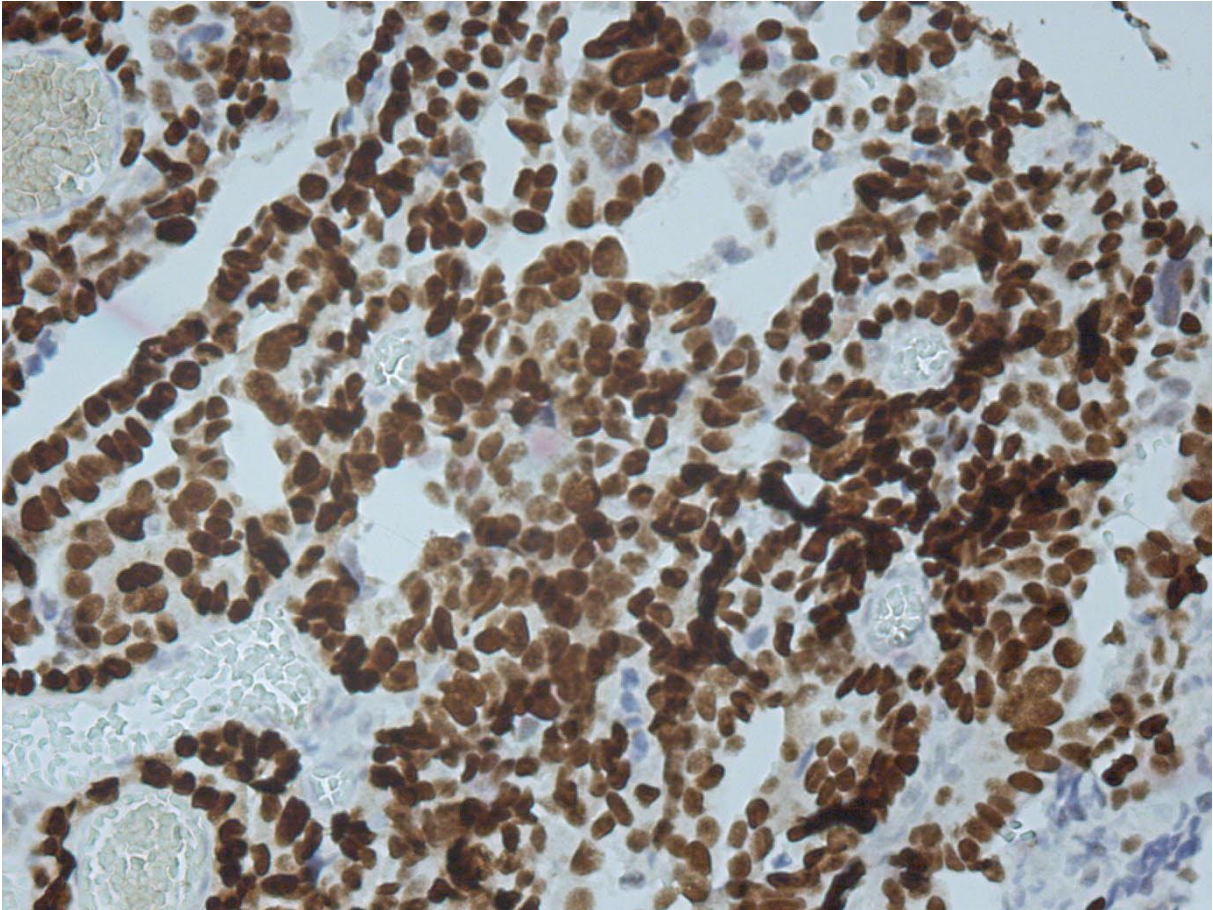
- reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13–20.
72. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000. S. 311–22.
 73. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, u. a. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):539–52.
 74. Fisher G, Yang ZH, Kudahetti S, Møller H, Scardino P, Cuzick J, u. a. Prognostic value of Ki-67 for prostate cancer death in a conservatively managed cohort. *Br J Cancer*. 2013;108(2):271–7.
 75. Heeran MC, Høgdall CK, Kjaer SK, Christensen L, Jensen A, Blaakaer J, Christensen IJ HE. Prognostic value of tissue protein expression levels of MIB-1 (Ki-67) in Danish ovarian cancer patients. From the „MALOVA“ ovarian cancer study. *APMIS*. 2013;121:1177–86.
 76. Simon R1, Mirlacher M SG. Tissue microarrays. *Methods Mol Med*. 2005;114:257–68.
 77. Ramos-Vara JA, Miller MA. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry--The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet Pathol* [Internet]. 2014;51(1):42–87. Verfügbar unter: <http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300985813505879>
 78. Swanson PE. Immunohistochemistry as a surrogate for molecular testing: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(2):81–96.
 79. Dako. Handbuch der Immunchemischen Färbemethoden. 3.Auflage:39–40.
 80. Biosystems L. Progesteron Receptor Clone 16 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™. Instr Use. :11.
 81. Remmele; Stegner. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe*. 1987;(8):138–40.
 82. Bjørge T, Lukanova A, Tretli S, Manjer J, Ulmer H, Stocks T, u. a. Metabolic risk factors and ovarian cancer in the Metabolic Syndrome and Cancer project. *Int J Epidemiol*. 2011;40(6):1667.
 83. Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolahdooz F, Webb PM. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2007;43(4):690–709.
 84. Fotopoulou C, Richter R, Braicu E-I, Kuhberg M, Feldheiser A, Schefold JC, u. a. Impact of obesity on operative morbidity and clinical outcome in primary epithelial ovarian cancer after optimal primary tumor debulking. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(9):2629–37.

85. Herausforderung Adipositas und Strategien zu ihrer Bekämpfung.
86. Yang Q, Wang R, Xiao W, Sun F, Yuan H, Pan Q. Cellular retinoic acid binding protein 2 is strikingly downregulated in human esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor. *PLoS One*. 2016;11(2).
87. Liu RZ, Li S, Garcia E, Glubrecht DD, Yin Poon H, Easaw JC, u. a. Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma. *Glia*. 2016;64(6):963–76.
88. Daponte A, Kostopoulou E, Chiotoglou I, Vanakara P, Minas M, Nakou M, u. a. Retinoid receptor alpha and Beta expression in serous ovarian tumors. *Oncology*. 2007;73(1–2):81–9.
89. Ross-Innes CS, Stark R, Holmes K a, Schmidt D, Spyrou C, Russell R, u. a. Cooperative interaction between retinoic acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer. *Genes Dev*. 2010;24(2):171–82.
90. Helguero L a, Faulds MH, Gustafsson J-A, Haldosén L-A. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*. 2005;24(44):6605–16.
91. Rambau P1,2, Kelemen LE3,4, Steed H5, Quan ML6, Ghatage P7 KM. Association of Hormone Receptor Expression with Survival in Ovarian Endometrioid Carcinoma: Biological Validation and Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 2017;
92. Petz LN, Nardulli a M. Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. *Mol Endocrinol*. 2000;14(7):972–85.
93. Zhao D, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Sun J. Prognostic role of hormone receptors in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(1):25–33.

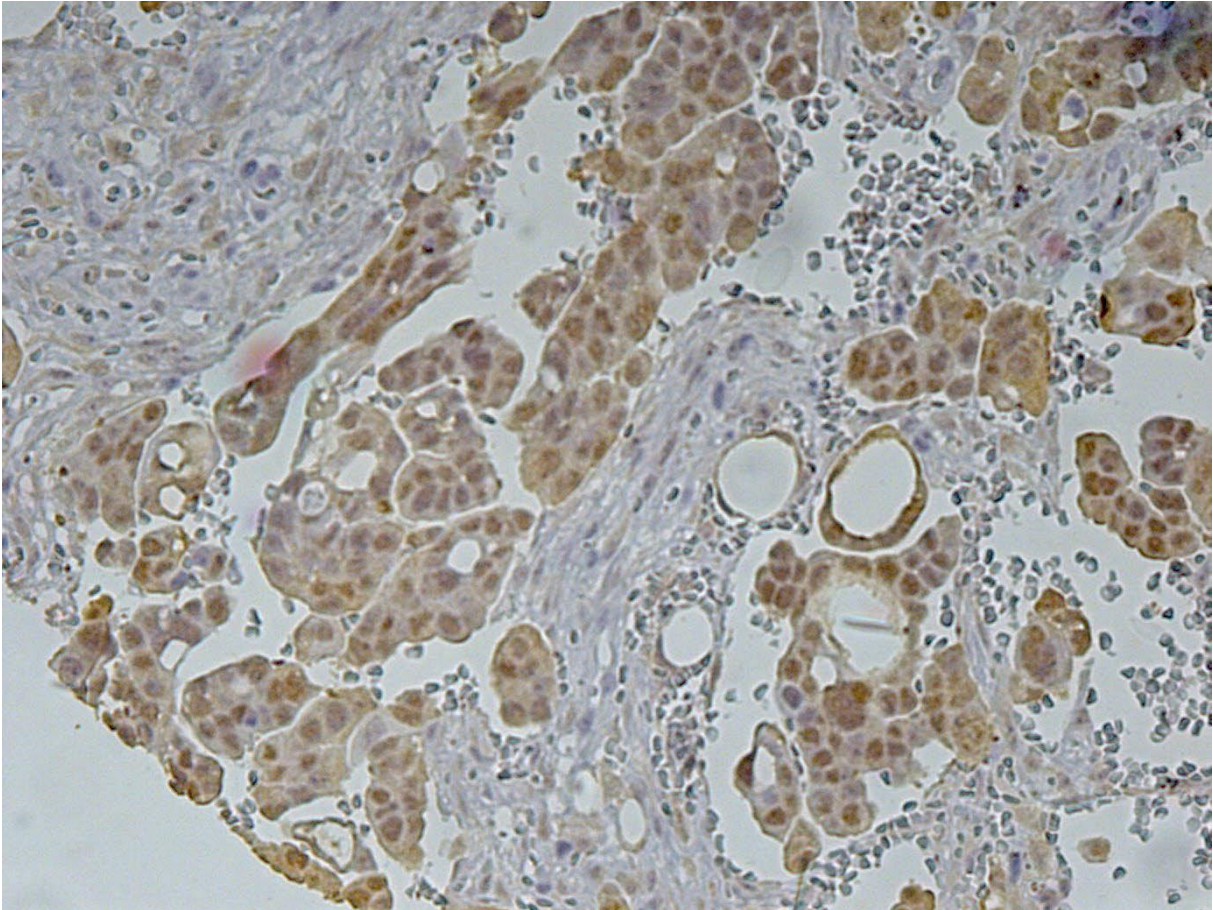
Anhang

	benign	BOT	EOT
Mean age at primary diagnosis	64 (39-82)	62.4 (36-83)	63 (26-89)
Mean BMI (kg/m ²)	27.1 (21.1-34.2)	27.4 (17.3-36.8)	24.8 (14.4-38.7)
Tumour Stage	n(%)	n(%)	n (%)
Ia		15 (79)	5 (3.6)
Ib		1 (5.3)	3 (2.2)
Ic		2 (10.5)	15 (10.8)
IIa			4 (2.9)
IIb		1 (5.3)	4 (2.9)
IIc			4 (2.9)
IIIa			5 (3.6)
IIIb			10 (7.2)
IIIc			67 (48.2)
IV			22 (15.8)
Histology			
inclusion cyst	4 (21.1)		
cystadenoma	7 (36.8)		
cystadenofibroma	8 (42.1)		
serous		15 (79)	104 (74.3)
mucinous		4 (21.1)	0
endometrioid			34 (24.3)
other			2 (1.4)
Ascites			
yes	0	0	61 (43.6)
no	19 (100)	19 (100)	63 (45)
Unknown	0	0	16 (11.4)
Mean Ca125 at diagnosis	104.32	105.57	1288
Tumor rest after surgery			
<1cm	19 (100)	19 (100)	69 (49.3)
>1cm			51 (36.4)
unknown			20 (14.3)
Systemic treatment			
yes	0	5	100
no	19 (100)	14	19
unknown	0	0	21

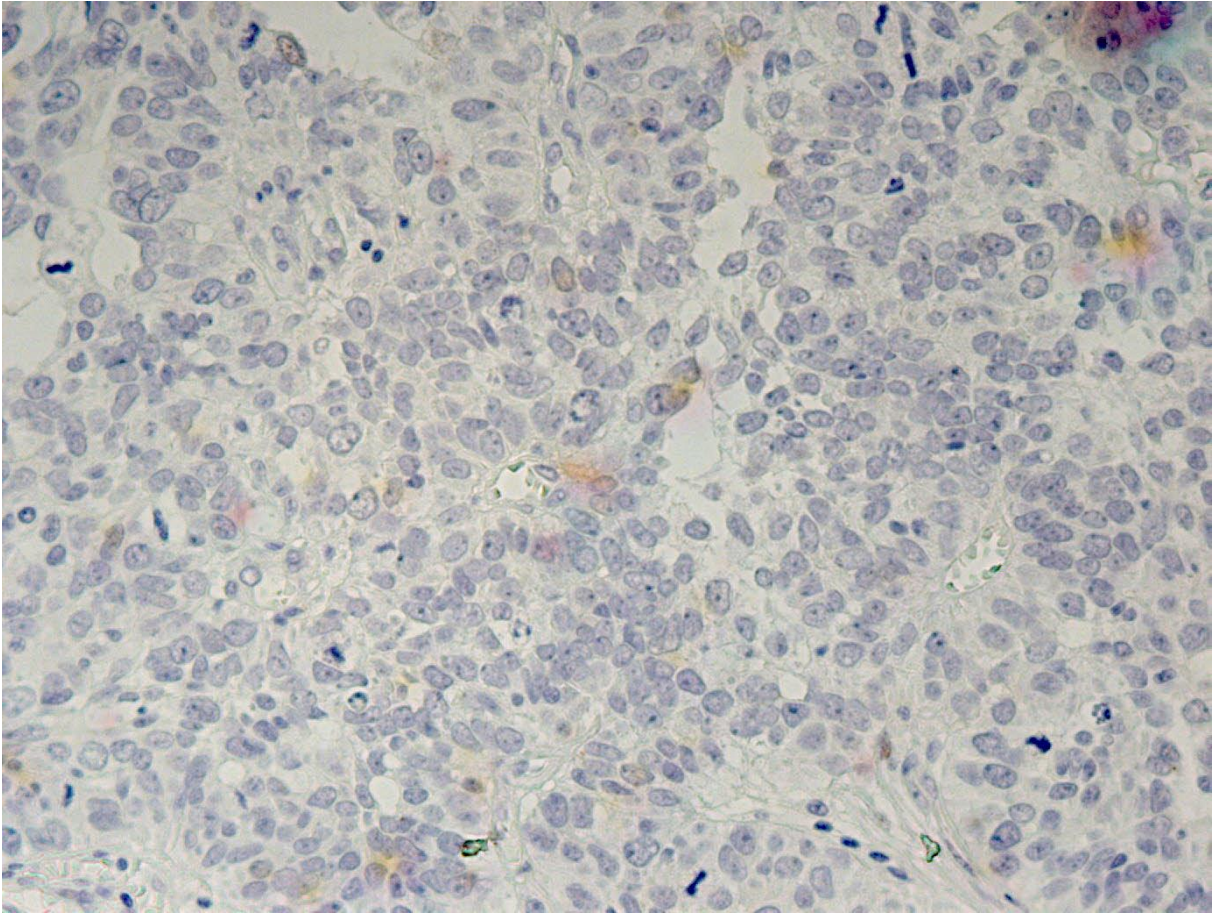
Anhang 1



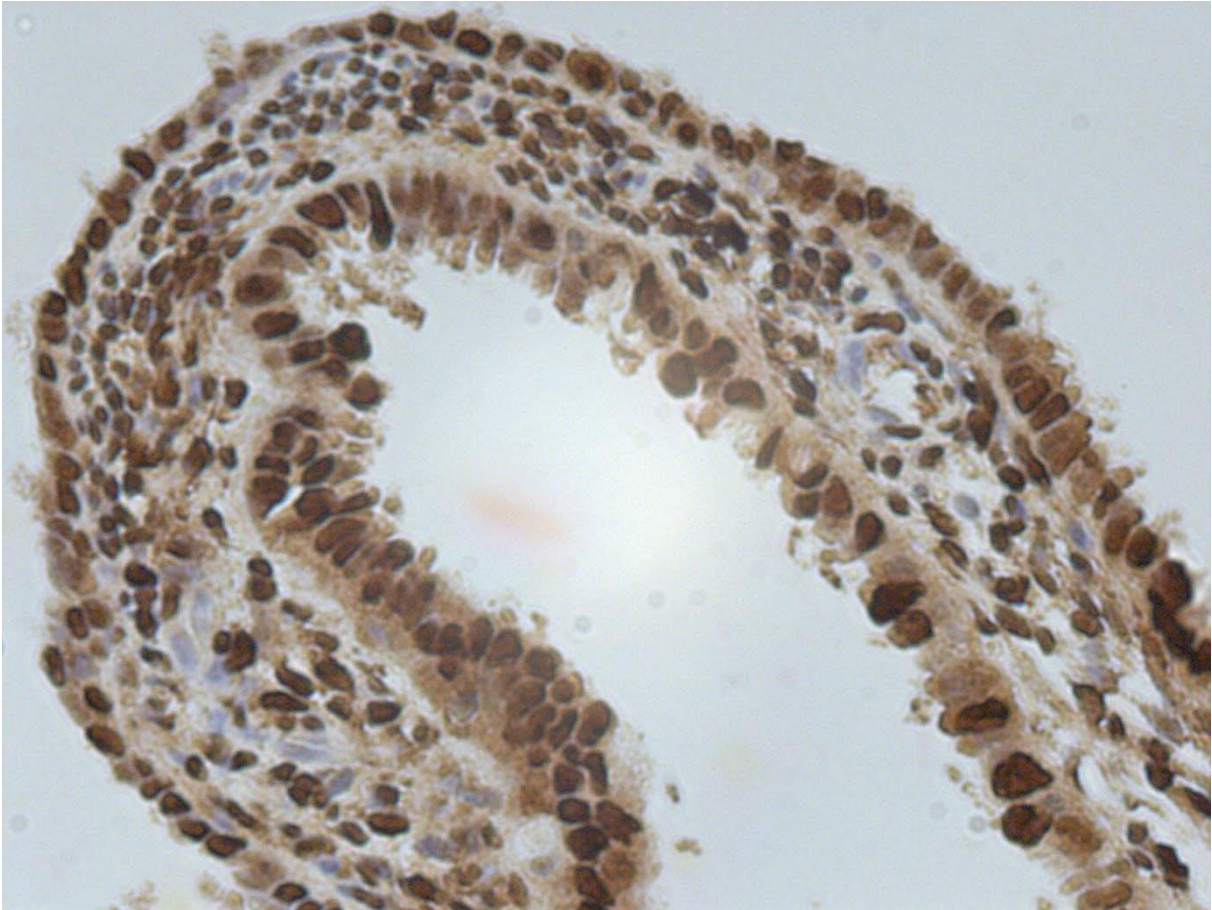
Anhang 2: Beispiel hoher CRABP2 Expression im Ovarialkarzinom



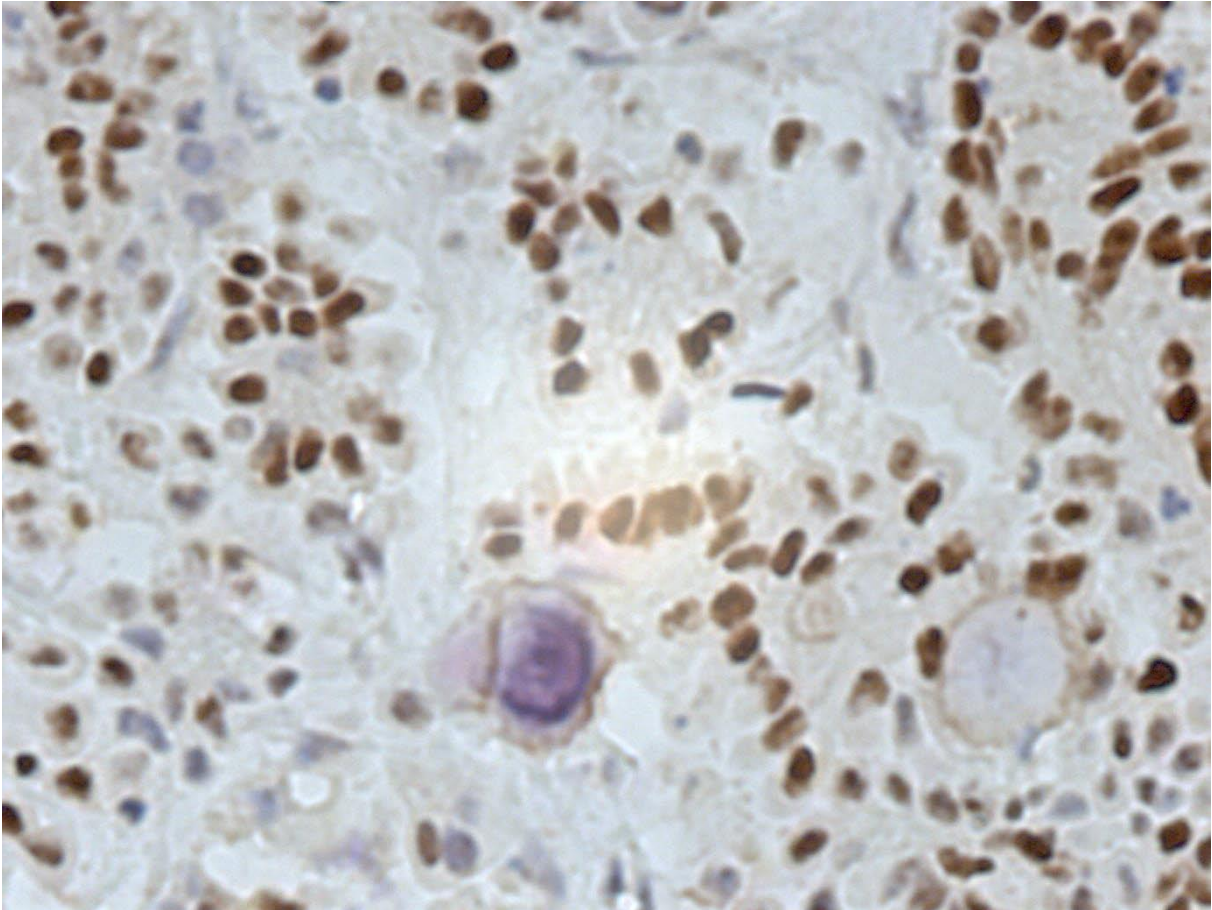
Anhang 3: Beispiel mittlerer CRABP2 Expression im Ovarialkarzinom



Anhang 3: Beispiel fehlender CRABP2 Expression im Ovarialkarzinom



Anhang 4: Beispiel hoher Progesteronrezeptorexpression von PR im BOT



Anhang 5: Psammomkörperchen im Ovarialkarzinom mit mittlerer Anfärbung von ER

Veröffentlichungen

Untersuchungen zur Expression und prognostischen Relevanz von Cellular retinoic acid-binding protein 2 (CRABP2) beim Ovarialkarzinom

NF Jüngling¹, S Limburg¹, I Meinhold-Heerlein², D Bauerschlag¹, N Maass¹, C Schem¹, MT van Mackelenbergh¹

- ¹UKSH, Campus Kiel, Gynäkologie und Geburtshilfe, Kiel, Deutschland
- ²Uniklinik Aachen, Gynäkologie und Geburtshilfe, Aachen, Deutschland

Immunhistochemische Analyse der LOXL-4 Expression und ihre klinisch-pathologische Relevanz bei Ovarialkarzinomen

V Serke¹, ES Quabius², C Kademann¹, I Alkatout³, N Jüngling³, M van Mackelenbergh³, W Klapper⁴, T Görögh¹

- ¹Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie/CAU, Kiel, Deutschland
- ²Institut für Immunologie/CAU, Kiel, Deutschland
- ³Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe/CAU, Kiel, Deutschland
- ⁴Institut für Pathologie/CAU, Kiel, Deutschland

Danksagung

Meiner Doktormutter PD. Dr. med Marion Tina van Mackelenbergh danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die vielen konstruktiven Hilfestellungen und die immer vorhandene Erreichbarkeit, die das Erstellen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Prof. em. Dr. med Walter Jonat und seinem Nachfolger, Prof. Dr. med Nicolai Maass sowie dem gesamten Team der Universitätsfrauenklinik des UKSH, Campus Kiel danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und der freundlichen Art, die jede Stunde im Labor unterhaltsam gemacht hat. Hier sind insbesondere Siegrid Hamann, die in akribischer Motivation und Ruhe mir bei der Etablierung der Färbeprotokolle geholfen hat und Frank Rösel, der immer mit einer lustigen Geschichte in Zeiten der Verzweiflung am Zellenzähler zur Seite stand, zu nennen. Andrea Voss-Werner danke ich für die Hilfe und Einweisung in die klinikinternen Datenbanken.

Frau Dipl-Math Ulrike von Hehn aus Kiel danke ich für die statistische Kontrolle und fachliche Unterstützung.

Zum Schluss danke ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben: Zum einen meiner Familie, die mich seit meiner Geburt begleitet. Danke Papa, danke Mama, danke Oma, danke Oma und Opa, und danke dir, lieber Opa Karl, ich weiß wie gerne du die Abgabe dieser Arbeit erlebt hättest. Dann meiner im Leben gewonnenen Familie, meiner ewig unterstützenden Frau Victoria, die mir den sonnigsten Tag und den sonnigsten Menschen geschenkt hat.

Danke Sebastian für viele Gespräche und meiner Kiel-Crew Lenny, Baschtl, Yannik und Jasper, im Wissen, dass es nichts wird.

Lebenslauf

EWALDISTRASSE 8 50670 KÖLN
015201910066 NJUENGLING@ICLOUD.COM

NIKLAS FRANK JÜNGLING

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 22. November 1990

Geburtsort: Bad Honnef

Nationalität: Deutsch

Eltern

Frank Jüngling (Lehrer)

Heike Jüngling (MTA)

Bildungsweg

2001-2010	Privates staatlich anerkanntes Gymnasium der Franziskanerinnen Nonnenwerth im Rhein Abitur (Notendurchschnitt: 1,7)
2011-2013	Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität in Budapest ab Wintersemester 2011/12 Physikum
2013-2016	Beginn des klinischen Teils des Studium an der Christian Albrecht Universität Kiel ab Wintersemester 2013/2014 Zweites Staatsexamen Medizin (schriftlicher Teil, Note: Gut)
11/ 2017	Approbation als Arzt Drittes Staatsexamen Medizin (mündlich-praktischer Teil, Note: Sehr gut)

Praktische Erfahrung

seit 06/2010	Minijob auf 400 Euro Basis als OP Assistent in den Chirurgischen und gynäkologischen Abteilungen des CURA Krankenhauses Bad Honnef
seit 07/2013	Studentische Aushilfe als OP Assistent in Form von 24 h Bereitschaftsdiensten in der Allgemein und Unfallchirurgie im CURA Krankenhaus Bad Honnef
seit 08/2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Frauenklinik des UKSH
2014-2015	jeweils einmonatige Famulaturen in der Gynäkologie, Allgemeinmedizin, Visceral-und Allgemein Chirurgie und Orthopädie/Unfallchirurgie
11/2016-01/2017	Auslandsaufenthalt im Kantonsspital Baden, Universität Zürich im Fach Chirurgie im Rahmen der Ausbildung des Praktischen Jahres
01/2017-03/2017	Auslandsaufenthalt am Tygerberg Hospital, Kapstadt im Fach Chirurgie im Rahmen der Ausbildung des Praktischen Jahres
03/2017-07/2017	Ausbildung in Urologie im Rahmen des Praktischen Jahres am UKSH, Campus Kiel
07/2017-10/2017	Ausbildung in Innere Medizin im Rahmen des Praktischen Jahres in Köln Merheim
Seit 15.01.2018	Assistenzarzt für Allgemein-, Viszeral-, und Unfallchirurgie am St Agatha Krankenhaus, Köln

Wissenschaftliche Aktivitäten

seit 06/2014	Klinisch-experimentelle Arbeit an der Frauenklinik des UKSH, Campus Kiel mit dem Thema: Untersuchung der Expression und prognostischen Relevanz von CRABP2, RAR α , ER α und PR in benignen und malignen Ovarialtumoren
--------------	---

Veröffentlichungen

Untersuchungen zur Expression und prognostischen Relevanz von Cellular retinoic acid-binding protein 2 (CRABP2) beim Ovarialkarzinom

NF Jüngling 1, S Limburg 1, I Meinhold-Heerlein 2, D Bauerschlag 1, N Maass 1, C Schem 1, MT van Mackelenbergh 1

- 1 UKSH, Campus Kiel, Gynäkologie und Geburtshilfe, Kiel, Deutschland
- 2 Uniklinik Aachen, Gynäkologie und Geburtshilfe, Aachen, Deutschland

Immunhistochemische Analyse der LOXL-4 Expression und ihre klinisch-pathologische Relevanz bei Ovarialkarzinomen

V Serke 1, ES Quabius 2, C Kademann 1, I Alkatout 3, NF Jüngling 3, M van Mackelenbergh 3, W Klapper 4, T Görögh 1

- 1Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie/CAU, Kiel
- 2Institut für Immunologie/CAU, Kiel, Deutschland
- 3Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe/CAU, Kiel, Deutschland
- 4Institut für Pathologie/CAU, Kiel, Deutschland

Zusätzliches

Sprachen	Englisch: sehr gute Kenntnisse Französisch: Grundkenntnisse Ungarisch: Grundkenntnisse
EDV	Microsoft Office: gute Kenntnisse