

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression der Hormonrezeptoren sowie von PARP-1 in
Desmoidfibromatosen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Konstantin Benno Bräutigam

aus Aachen

Datum der Promotion: 14.09.2018

Widmung

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Abstract	8
1 Einleitung.....	9
1.1 Desmoidfibromatosen.....	9
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik	9
1.1.2 Ätiologie	9
1.1.3 Diagnostik	10
1.1.4 Therapie.....	11
1.1.5 Prognose	13
1.1.6 Organisationen und Austausch	13
1.2 Östrogenrezeptoren.....	14
1.2.1 Aufbau und Funktion	14
1.2.2 Relevanz in der Humanmedizin	14
1.3 Progesteronrezeptor.....	15
1.3.1 Aufbau und Funktion	15
1.3.2 Relevanz in der Humanmedizin	15
1.4 Androgenrezeptor.....	15
1.4.1 Aufbau und Funktion	15
1.4.2 Relevanz in der Humanmedizin	16
1.5 Steroidhormonrezeptoren im Kontext der Desmoidfibromatose	16
1.5.1 Expression	16
1.5.2 Mögliche Pathomechanismen	16
1.5.3 Hormontherapeutische Strategien	17
1.6 Poly Adenosin Diphosphat Ribose Polymerase-1 (PARP-1).....	18
1.6.1 Funktion	18
1.6.2 Relevanz in der Humanmedizin	18
1.7 Fragestellung.....	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Patientenkollektiv.....	22
2.2 Material.....	26
2.2.1 Antikörper	26
2.2.2 Chemikalien und Enzyme	26

2.2.3	Geräte.....	27
2.2.4	Primer	28
2.2.5	Verbrauchsmaterial.....	29
2.3	Methoden	29
2.3.1	Histopathologische Untersuchung	29
2.3.2	Immunhistochemie (IHC)	29
2.3.3	PCR-Analyse	31
2.4	Statistische Analyse und Auswertung.....	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Expression von Steroidhormonrezeptoren in Desmoidtumoren	35
3.1.1	Östrogenrezeptor-Expression auf Proteinebene	35
3.1.2	Östrogenrezeptor-Expression auf mRNA-Ebene	37
3.1.3	Progesteronrezeptor-Expression auf Proteinebene	39
3.1.4	Progesteronrezeptor-Expression auf mRNA-Ebene	39
3.1.5	Androgenrezeptor-Expression auf Proteinebene	40
3.1.6	Androgenrezeptor-Expression auf mRNA-Ebene	40
3.2	Expression von PARP-1 in Desmoidtumoren	43
3.2.1	PARP-1-Expression auf Proteinebene.....	43
3.2.2	PARP-1- Expression auf mRNA-Ebene.....	45
3.3	Expression von Ki-67 in Desmoidtumoren.....	46
3.3.1	Ki-67-Expression auf Proteinebene	46
3.4	Uni- und multivariate Überlebensanalysen	47
3.4.1	Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern sowie Subgruppen.....	47
3.4.2	ESR	48
3.4.3	PgR.....	50
3.4.4	AR.....	51
3.4.5	PARP-1	51
4	Diskussion	54
4.1	Östrogenrezeptoren als prognoserelevante Überlebensparameter	54
4.2	Der Progesteronrezeptor als prognoserelevanter Überlebensparameter	56
4.3	Der Androgenrezeptor als prognoserelevanter Überlebensparameter	57
4.4	PARP-1 als prognoserelevanter Überlebensparameter.....	58
4.5	Ki-67	58

4.6	Limitationen	59
4.7	Ausblick.....	60
5	Abkürzungsverzeichnis.....	61
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang.....	75
7.1	Eidesstaatliche Versicherung	75
7.2	Lebenslauf.....	76
7.3	Publikationsliste.....	77
7.4	Danksagung	78

Zusammenfassung

Einleitung:

Aggressive Fibromatosen bzw. Desmoidtumoren sind gutartige, jedoch lokal invasive Tumoren. Aktuelle Therapiestandards beinhalten primär die radikale Exzision, wobei Resektionen in toto teilweise nur schwer zu erzielen sind. Inkomplette Resektionen führen oft zu Rezidivtumoren, welche nicht selten wiederholte Resektionen und adjuvante Radiotherapie erfordern. Hormonelle Therapien gelten teilweise als vielversprechend, bedürfen aber weiterer Evidenz. Das hier untersuchte DNA-Reparaturenzym Poly Adenosin Diphosphat Ribose Polymerase-1 (PARP-1) verfügt über therapeutisches Potential, wie bereits erste Therapierfolge mit PARP-Inhibition in anderen Entitäten, besonders Karzinomen und ausgewählten Sarkomen, erwiesen.

Methodik:

In dieser Studie, evaluierten wir retrospektiv die Expression von vier Hormonrezeptoren, Östrogenrezeptoren (ER) α und β (ESR1 und -2), Progesteronrezeptor (PR) sowie Androgenrezeptor (AR), als auch PARP-1, mittels Immunhistochemie und quantitativer RT-PCR in Gewebeproben ausgewählter Desmoidfibromatosen (n=69). Mittels Immunoreaktivitätsscore (IRS) determinierten wir die Färbereaktivität. Die Ergebnisse der PCR wurden numerisch als auch mit definierten Cutoffs analysiert. Die Expressionsmuster korrelierten wir hinsichtlich der Prognoserelevanz mit klinisch-pathologischen Parametern.

Ergebnisse:

Die analysierten Hormonrezeptoren zeigten nahezu keine Reaktivität in der Immunhistochemie. Einzig ER- β zeigt eine zytoplasmatische partiell positive Expression. PARP-1 zeigte variable nukleäre Positivität in allen gefärbten Proben mit IR-Werten von bis zu 6. Die RT-PCR zeigte signifikant höhere Expression von ESR2 ($p=0,035$) und AR ($p=0,005$) in mittelgroßen Tumoren (51-100 mm) verglichen mit kleineren Tumoren (< 51 mm). Primär- im Vergleich zu Rezidivtumoren zeigten stärkere AR-Expression in der RT-PCR ($p=0,01$). Dazu war die Expression des AR höher in intra- verglichen mit extraabdominellen Tumoren ($p=0,01$). Univariate Überlebensanalysen ergaben, dass höhere Expression von ESR1 mit kürzerem Gesamtüberleben verbunden ist ($p=0,005$). Multivariate Analysen zeigten, dass höhere PARP-1 Expression mit früheren Rezidiven assoziiert ist ($p=0,003$).

Schlussfolgerung:

Unsere Untersuchungen zeigen, dass eine höhere PARP-1-Expression in unserem Kollektiv mit einer schlechteren Prognose im Sinne eines verkürzten rezidivfreien Überlebens assoziiert ist. Die PARP-1 könnte daher ein interessantes Target einer neuen individualisierten Therapie sein. Der Hormonrezeptorstatus erscheint - nach den Ergebnissen unserer Arbeit - von geringer prognostischer Relevanz.

Abstract

Background:

Agressive Fibromatoses or desmoid tumors are benign, but locally invasive entities. State of the art therapy is mainly radical surgery, however incomplete resections are common. Incomplete surgery frequently results in recidive tumors, which request repeated resections and often adjuvant radiotherapy. Hormone modifying therapy needs further evidence, but seems to be promising. The investigated DNA repairing enzyme Poly Adenosine Diphosphate Ribose Polymerase-1 (PARP-1) might contain therapeutic potential, as shown in the successful treatment of several entities, e.g. selected carcinomas and sarcomas, by PARP-inhibition.

Methods:

In this study, we investigated the expression of four hormone receptors (estrogen receptors (ER) α and β (ESR1 and -2), progesterone receptor (PR), androgen receptor (AR)) as well as PARP-1 via immunohistochemistry and quantitative RT-PCR in tissue samples (n=69) of desmoid tumors. The results of the PCR were analysed numerically and with defined cutoffs. We determined the extent of immunohistochemical reactivity using the immunoreactivity score (IRS). Finally we correlated the expression patterns with clinical-pathologic parameters to determine prognostic factors.

Results:

The analysed hormone receptors showed almost no reactivity in immunohistochemistry. Solely ER- β showed partial cytoplasmic reactivity. PARP-1 revealed variable nuclear positivity with IRS ranging up to 6. PCR showed significantly higher expression of ER- β ($p=0,035$) and AR ($p=0,005$) in tumors with median tumor size (51-100 mm) compared to smaller tumors (< 51 mm). Primary tumors compared to relapse tumors showed stronger expression of AR in PCR ($p=0,01$). Moreover, expression of AR was higher in intra- compared to extraabdominal tumors ($p=0,01$). Univariate survival analysis showed higher expression of ER- α was associated with shorter survival ($p=0,005$). Multivariate analyses showed that higher PARP-1 expression was associated with earlier recurrence ($p=0,003$).

Conclusion:

According to this study PARP-1 expression is associated with poorer prognosis, i.e. faster recurrence. PARP-1 could be an interesting target for a personalized therapy. In this study the expression of hormone receptors was of minor prognostic relevance.

1 Einleitung

1.1 Desmoidfibromatosen

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik

Desmoidfibromatosen (DF), weiterhin „Aggressive Desmoidfibromatosen“, „Tiefe Fibromatosen“ oder „Desmoidtumoren“ genannt, gehören in die Gruppe der Weichgewebstumore, welche aus dem Binde- und Stützgewebe entstehen. DF sind nicht metastasierende Neoplasien, die lokal invasiv („aggressiv“) wachsen.

Diese Weichteiltumore sind selten, die Inzidenz beträgt circa zwei bis vier Betroffene auf eine Million Menschen der Bevölkerung pro Jahr [1]. Die Inzidenz wird aktuell (retrospektiv ermittelt aus den Jahren 1993 bis 2013) jedoch höher auf circa fünf Betroffene auf eine Million Menschen geschätzt [2]. Das kolorektale Karzinom zeigte - im Vergleich zu den Desmoidtumoren - in Deutschland im Jahre 2012 eine Inzidenz von 571 männlichen und 368 weiblichen Betroffenen auf eine Million Menschen [3]. Es sind meist jüngere Frauen von Desmoidtumoren betroffen [2]. Kinder und Jugendliche können ebenfalls Desmoide entwickeln. Bei diesen werden zudem verstärkt Rezidive beobachtet [4]. Des Weiteren sind es überwiegend Kinder, die DF im Kopf-Hals-Bereich aufweisen [5], eine Lokalisation, die bei Erwachsenen nur äußerst selten betroffen ist.

DF können sich an verschiedensten Lokalisationen entwickeln [6, 7]. In der Literatur hat sich eine Einteilung aufgrund drei typischer Lokalisationen als relevant herausgestellt. Diesbezüglich unterscheidet man Bauchwanddesmoide, die vor allem im Bereich der Faszie des Musculus rectus abdominis auftreten und meist jüngere Frauen betreffen. Des Weiteren werden intraabdominelle Desmoide beschrieben, welche sich charakteristischerweise im Mesenterium des Dünndarms bilden und oft mit dem Gardner-Syndrom (siehe Kapitel 1.1.2) assoziiert sind. Schließlich definiert man extraabdominelle Desmoidtumoren, die sich überwiegend an den vorrangig proximalen Extremitäten befinden.

1.1.2 Ätiologie

Während sich die Entstehung vieler Tumoren durch genetische Aberrationen, Karzinogene und bzw. oder andere Noxen erklären lässt, ist die exakte Ätiologie der DF bis dato ungeklärt. Desmoidtumoren treten sporadisch oder seltener im Rahmen der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) auf. Die FAP bzw. ihre Variante als „Gardner-Syndrom“ gehören zu den Polyposis-Syndromen mit einer typischen Mutation

im APC-Tumorsuppressor-Gen auf Chromosom 5q21. Sie mündet obligat in überwiegend kolorektalen Karzinomen, sodass meist präventiv eine totale Proktokolektomie vor definitiver Karzinomentstehung durchgeführt wird.

Sowohl sporadisch aufgetretene Desmoidtumoren als auch solche bei bekannter FAP involvieren wahrscheinlich einen aberranten Wnt-Signalweg, welcher physiologisch der Transkriptionsregulation dient.

Die abnorme Modifizierung dieses Signalwegs mündet in der nukleären Translokation des Proteins β -Catenin, was in der Pathologie zur Entitätszuordnung mittels Immunhistochemie verwandt wird [8]. Mutationen im β -Catenin-Gen (CTNNB1), Exon 3, eher typisch für das sporadische Desmoid, sind häufig [9]. β -Catenin ist unter anderem an der physiologischen Wundheilung beteiligt [5], was gut zu dem makroskopischen Bild der Desmoide passt. Weiterhin werden Zytokinen und Wachstumshormonen eine Rolle in der Pathogenese der DF zugeschrieben [10]. Insbesondere der auf Fibroblasten mitogen wirkende Platelet Derived Growth Factor (PDGF) scheint ätiologische Relevanz zu haben [10, 11].

Als Risikofaktoren der DF gelten Traumata, vor allem Monate bis Jahre postoperativ nach Abdominalchirurgie [12], und Geburten [13]. Die potentielle Implikation des Steroidhormons Östrogen in der Pathogenese der DF ist Gegenstand intensiver Forschung und ebenfalls ein Teilaspekt dieser Arbeit.

1.1.3 Diagnostik

Der Großteil der von einem Desmoidtumor Betroffenen bemerkt zunächst abhängig von der Lokalisation als oft einziges Symptom eine Schwellung [14]. Die Größe und Lokalisation der Schwellung determinieren letztlich das Ausmaß des klinischen Erscheinungsbilds. Im Weiteren erfolgt eine Probeentnahme aus der Raumforderung zur Diagnosestellung. Mikroskopisch stellen sich Desmoidtumoren meist als spindelförmige Proliferationen dar, häufig ohne deutliche Kernatypien und ohne vermehrte Mitosefiguren (siehe Abbildung 1.1). Typischerweise sind die fibroblastären Tumorzellverbände in Faszikeln organisiert, eingebettet im umliegenden kollagenen Stroma mit partiell eingestreuten Lymphozyten. Desmoide können sich jedoch in vielfältigen Wachstumsmustern manifestieren [15], was zu Fehldiagnosen verleiten kann.

Da die alleinige konventionelle Morphologie anhand eines Hämatoxylin-Eosin-Schnittpräparates zur sicheren Diagnosestellung einer spindelzelligen Neoplasie häufig nicht ausreicht, werden zusätzlich immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Der Nachweis einer nukleären β -Catenin-Expression unterstützt die Diagnose eines Desmoidtumors [8], ist jedoch nicht beweisend [16]. Weiterhin können DF eine positive Expression für das Intermediärfilament Vimentin und das muskelspezifische- sowie Glattmuskel-Aktin aufweisen. Eine Mutationsanalyse des CTNNB1-Gens kann ebenfalls diagnostisch richtungsweisend sein [17, 18]. Besonders das „Next Generation Sequencing“ (NGS) scheint sich hierfür als eine kostengünstige und effiziente Methode anzubieten [19]. Präoperativ und in der Tumornachsorge sollte eine großzügige Bildgebung, meist mittels MRT-Aufnahmen [20, 21], zur Einschätzung der kompletten Tumorgroße bzw. zum Ausschluss von Rezidiven erfolgen. Bei gesicherter Diagnose eines Desmoidtumors sollte auch ein Gardner-Syndrom ausgeschlossen bzw. bei entsprechendem Verdacht bestätigt werden [22].

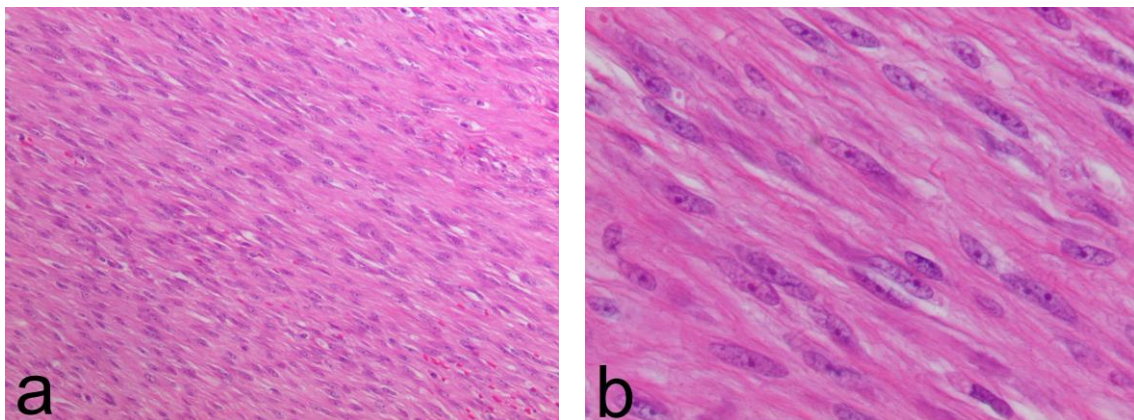


Abbildung 1.1: Typisches histologisches Bild einer Desmoidfibromatose bei einem männlichen Patienten, 41 Jahre (zum Zeitpunkt der Diagnosestellung), HE-Färbung, a) 100fache Vergrößerung, b) 400fache Vergrößerung. Aus vorliegendem Kollektiv.

1.1.4 Therapie

Es existieren multifaktorielle Therapieansätze bei Desmoidtumoren, wobei die radikale chirurgische Resektion mit ggf. adjuvanter Radiotherapie weiterhin die relevanteste Therapieoption darstellt. Ausgedehnte intraabdominelle Desmoidtumoren, häufig FAP-assoziiert, wurden mit teils kurativem Erfolg durch (Darm-)Transplantationen therapiert [23, 24].

Makroskopisch werden DF oftmals als weiß-graue, derbe Knoten ohne Kapsel beschrieben (siehe Abbildung 1.2). Aufgrund des infiltrierenden Wachstums ist das

Tumorgewebe intraoperativ teils schwer von nicht betroffenem Gewebe abzugrenzen, sodass Resektionen im Gesunden (in Analogie zur TNM-Klassifikation: R0) von Primarius und auch Rezidivtumoren schwer zu erzielen sind [25, 26]. Rezidive sind dazu nicht selten. Die Resektion von Rezidivtumoren gestaltet sich darüber hinaus komplex, da umliegendes Narbengewebe oft nicht sicher von dem eigentlichen Desmoid differenziert werden kann. Tiefe Fibromatosen in chirurgisch komplexen Regionen sind ebenfalls eine operative Herausforderung [27]. Eine prä-operative Biopsie scheint im Allgemeinen das Resektionsergebnis zu verbessern [2]. Die anatomischen Gegebenheiten sind jedoch letztlich entscheidend für die gewählte Therapieform [14].

Pharmakologisch reichen die Therapiekonzepte von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) über Interferone bis hin zu Hormontherapie und Chemotherapie [28]. Eingesetzt werden Anthrazykline, wie zum Beispiel Doxorubicin, Methotrexat, ein Folsäure-Antagonist, und Vincaalkaloide, als Beispiel der Mitosehemmstoff Vinblastin. Aufgrund der relevanten Nebenwirkungen einer Chemotherapie wie zum Beispiel Neutropenie, Nausea und Neuropathie [28], kommt diese nur bei wiederholten Rezidiven und erfolgloser Radiotherapie in Frage.

Desmoidtumoren können Östrogenrezeptoren exprimieren [29]. Tamoxifen, ein selektiver Östrogenrezeptormodulator, hat sich in einigen Studien als therapeutisch wirksam erweisen können [30]. In Kombination mit Sulindac, einem COX-Inhibitor, konnten Patienten ebenfalls von Tamoxifen profitieren. Es zeigte sich deutlich weniger bzw. teils sogar ein Stillstand des Tumorwachstums („stable disease“) [31]. Die Studienkollektive waren jedoch recht gering und daher in ihrer statistischen Aussagekraft eingeschränkt. Der Wirkmechanismus von COX-Inhibitoren im Kontext der DF ist noch unklar [32]. Tyrosinkinaseinhibitoren können ebenfalls therapeutische Effekte erzielen [33-35]. Eine pharmakologische Intervention zur Regulierung des Wnt-Signalwegs gilt als Schlüssel zum Therapieerfolg, jedoch fehlen aktuell anwendbare Substanzen [36].

Alleinige Radiotherapie kommt ebenso zur Anwendung [37] wie auch Beobachten und Abwarten („watchful waiting“) [38, 39]. Konsens ist, dass die therapeutische Strategie multidisziplinär diskutiert und durchgeführt werden sollte. Der therapeutische Durchbruch, auch als „magic bullet“ [40] beschrieben, ist bisher noch nicht erreicht.

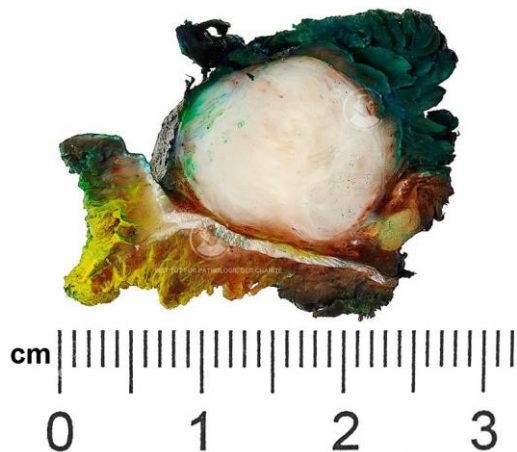


Abbildung 1.2: Makroskopisches Bild einer Aggressiven Desmoidfibromatose am lateralen, proximalen Oberarm, 73x34x27 mm. Patient männlich, 22 Jahre (zum Zeitpunkt der Diagnosestellung). Aus vorliegendem Kollektiv.

1.1.5 Prognose

Prognosebestimmende Faktoren der Desmoidtumoren sind vor allem die Beeinträchtigung lebensnotwendiger anatomischer Strukturen, bspw. der Atemwege, und die Invasion von Gefäßen bzw. Nerven [25]. Gerade die Beteiligung von Nerven und ihren Plexus kann in starken Schmerzen resultieren [41]. Ein inkompletter Resektionsstatus korreliert nicht obligat mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Tumorrezidiv [22, 42]. Extrem ausgedehnte Resektionen könnten hier sogar kontraproduktiv, da nur morbiditätsfördernd, sein [43]. Die Relevanz des Erkrankungsalters und des Geschlechts der Betroffenen für die Prognose wird ebenfalls kontrovers diskutiert [44, 45].

Trotz des fehlenden Metastasierungspotentials kann das Allgemeinbefinden der Patienten stark beeinträchtigt sein, bspw. im Rahmen von Knochenerosionen durch aggressives Tumorwachstum, Amputationen oder auch durch intraabdominelle Kompressionen von Darmanteilen, Gefäßen oder Harnwegen [46-48].

1.1.6 Organisationen und Austausch

Desmoidtumoren gehören zu den seltenen neoplastischen Erkrankungen und präsentieren sich klinisch äußerst heterogen. Es gibt bisher keine standardisierten Therapie-Algorithmen und Betroffenen droht häufig ein langer Leidensweg. Folglich sind Möglichkeiten des Austauschs untereinander und internationale Kooperationen sowohl für Forschende als auch für Patienten wichtig. An erster Stelle ist hier die europäische Organisation „SOS Desmoid“ [49] zu nennen. „SOS Desmoid“ vernetzt Patienten mit

Aggressiven Fibromatosen und bietet professionelle Unterstützung. Weiterhin ist die „Desmoid Tumor Research Foundation“ (DTRF) mit Sitz in New York, USA, zu erwähnen. Die Stiftung unterstützt Forschungsprojekte finanziell und bietet Betroffenen Informationen und Hilfe [50]. Die „Sarcoma Alliance for Research through Collaboration“ (SARC) [51] ist eine Assoziation von Wissenschaftlern, welche sich der Therapie von Desmoidtumoren widmet.

1.2 Östrogenrezeptoren

1.2.1 Aufbau und Funktion

Östrogenrezeptoren (ER) zählen zu den Steroidrezeptoren. Es gibt sowohl nukleäre als auch membrangebundene ER [52]. Man differenziert die beiden humanen Subtypen ER- α und ER- β , welche sich unter anderem in ihrer Affinität zu ihren Liganden unterscheiden. Zusätzlich sind beide Rezeptoren in verschiedenen Organen lokalisiert. Während der ER- α eher in der Mamma, im Knochen und im weiblichen Fortpflanzungstrakt vorgefunden wird, finden sich ER- β vorwiegend in Hoden, Lunge, Thymus, Milz und Ovar [53]. Biochemisch-strukturell bestehen ER aus sechs Domänen mit Wirkung als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren.

1.2.2 Relevanz in der Humanmedizin

Östrogene bzw. ihre Rezeptoren sind auf vielfältige Art und Weise in physiologische Prozesse des Körpers involviert. Neben ihrer bedeutenden Rolle im Menstruationszyklus wirken sie beispielsweise ebenfalls osteoanabol und vasoprotektiv [53]. Nichtsdestotrotz sind sie auch pathologisch und damit pharmakologisch relevant. Die Modulation der endogenen Östrogen-Spiegel findet Anwendung in der Kontrazeption sowie therapeutisch unter anderem bei der Osteoporose, bei klimakterischen Beschwerden und auch bei Tumoren, insbesondere dem Hormonrezeptor positivem Mammakarzinom [53]. Diese Pharmaka wirken über anti- oder pro-östrogene Effekte, Östrogenrezeptor-Modulation (SERM) und –Regulation (SERD) sowie Östrogensynthese-Inhibition (Aromatase-Inhibitoren). Relevante Risiken einer Hormontherapie im Östrogen-System sind unter anderem eine gesteigerte Inzidenz von Endometriumkarzinomen [54].

In der Pharmakotherapie des Hormonrezeptor positiven Mammakarzinoms zeigen der SERM Tamoxifen sowie sein pharmakologisches Analogon Toremifen therapeutische Effekte [55]. Des Weiteren scheint der SERD Fulvestrant in der Therapie des Tamoxifen-resistenten fortgeschrittenen Mammakarzinoms wirksam zu sein [56]. Schließlich sind auch Aromatase-Inhibitoren in therapeutischer Anwendung bei Mammakarzinom.

1.3 Progesteronrezeptor

1.3.1 Aufbau und Funktion

Progesteron gehört zu den Gestagenen, einer wichtigen Klasse der Geschlechtshormone, und gilt als klassisches „Schwangerschaftshormon“. Der Progesteron-Rezeptor (PR) ist ein weiterer nukleärer Steroidrezeptor mit den Isoformen A und B [57]. In den letzten Jahren wurden dazu auch membranäre PR entdeckt, die G-Protein-gesteuert wirken und schneller Signalkaskaden modulieren können [58].

1.3.2 Relevanz in der Humanmedizin

Progesteron ist hauptsächlich an der Regulation des Menstruationszyklus beteiligt. Folglich bietet sich die pharmakologische Intervention hier vor allem zur Kontrazeption an. Relevant sind die Selektiven Progesteron Rezeptor Modulatoren (SPRM, zum Beispiel Mifepriston). Mifepriston wird zur Einleitung eines medizinischen Aborts verwendet [53]. Ulipristal-Acetat, ein weiterer SPRM, kann zur Notfall-Kontrazeption verwendet werden [53]. Progesterone sind weiterhin wichtige Substanzen in der Hormonersatztherapie, speziell bei post-menopausalen Frauen. Das synthetische Gestagen Medroxyprogesteron(-acetat) wird partiell trotz unklarer Studienlage [59] in der palliativen Therapie des fortgeschrittenen Mamma-Karzinoms angewandt.

1.4 Androgenrezeptor

1.4.1 Aufbau und Funktion

Der Androgenrezeptor (AR) gehört ebenfalls zur Gruppe der als Transkriptionsfaktor wirkenden nukleären Steroidrezeptoren. Er dient primär der Ausprägung eines männlichen Phänotyps [60]. Liganden sind Testosteron und das etwas potentere Dihydrotestosteron [52]. Generell finden sich AR in verschiedensten Geweben. Die

Transkriptionsaktivität wird durch unterschiedliche Coaktivatoren und –repressoren moduliert.

1.4.2 Relevanz in der Humanmedizin

Androgene sind an verschiedenen Krankheitsprozessen beteiligt. Das Spektrum reicht von Androgen-bedingter Alopezie bis hin zu aggressiven Prostatakarzinomen. Da beispielsweise die Zellen der Prostata Androgen abhängig proliferieren [60], werden sogenannte „Antiandrogene“ in der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms eingesetzt (als Beispiel der Androgenbiosynthese-Inhibitor Abirateronacetat [61]). Sie finden ebenfalls bei übermäßigem Haarwuchs (Hirsutismus) und bei mittel- bis schwerer Akne Verwendung [62].

1.5 Steroidhormonrezeptoren im Kontext der Desmoidfibromatose

1.5.1 Expression

Desmoidtumoren können alle oben genannten Steroidhormonrezeptoren exprimieren. Die Assoziation von Schwangerschaften mit Desmoiden ist ein starker Hinweis auf eine mögliche Implikation von Geschlechtshormonen in der Pathogenese der DF [20]. Die Steroidhormonexpression in immunhistochemischen Untersuchungen ist in der Literatur heterogen [29, 63]. Insgesamt scheint eher der ER- β als $-\alpha$ exprimiert zu werden [63-65]. In der Arbeit von Mignemi et al. zeigte sich immunhistochemisch eine ER- β -Expression in allen der 27 untersuchten Patientenproben [65]. Mignemi et al. spezifizieren jedoch nicht, ob es sich um nukleäre oder zytoplasmatische Expression handelt. Die stärkere ER- β -Expression gilt laut Deyrup et al. besonders für extraabdominelle Tumore [66]. Die ER-Expression korreliert jedoch nicht obligat mit dem Ansprechen auf Anti-Östrogene gemäß einer Studie von Fong et al. [67].

1.5.2 Mögliche Pathomechanismen

Ein Zusammenhang zwischen Steroidhormonen bzw. deren Rezeptoren und der Pathogenese der DF ist bisher noch nicht sicher geklärt. Der (gestörte) Wnt-Signalweg ist bis dato als relevanteste molekularbiologische Quelle der DF zu betrachten. Steroidhormone scheinen diesen Signalweg beeinflussen zu können. Im Tierexperiment wurde in uterinen Stroma-Zellen nachgewiesen, dass Progesteron den Wnt-Signalweg verstärkt [68, 69]. Es scheint auch den Wnt-Signalweg-Inhibitor „DKK1“ regulieren zu

können [70, 71]. Eine direkte Übertragung bei humanen DF ist bisher nicht bekannt, jedoch scheint eine weitere Untersuchung des Progesteronrezeptors auf Basis dieser Ergebnisse interessant. Der Wnt-Signalweg mit seinem zentralen Akteur β -Catenin ist auch in die Aktivierung von Fibroblasten und die Produktion extrazellulärer Matrix involviert. Dies wurde für die Systemische Sklerose [72], die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD) [73] und die renale interstitielle Fibrose [74] postuliert. Eine Übertragung auf die Desmoidtumoren erscheint nicht abwegig [75].

Östrogene scheinen den Wnt-Signalweg ebenfalls modulieren zu können. Es wurde eine Wnt-Verstärkung durch ER- β in Osteoblasten beschrieben [76]. Im Tierversuch konnte weiterhin gezeigt werden, dass Testosteron den β -Catenin-Spiegel ansteigen lässt und der Wnt-Signalweg über eine Androgenrezeptor-Aktivierung verstärkt wird [77]. Der hochkomplexe Wnt-Signalweg, das Wechselspiel der einzelnen Faktoren und auch die Bedeutung anderer Signalwege, werden Gegenstand weiterer Forschungen sein.

1.5.3 Hormontherapeutische Strategien

Die Kenntnis der Expression von Steroidhormonrezeptoren in DF hat zur pharmakologischen Anwendung zielgerichteter Substanzen geführt. Der SERM Tamoxifen hat sich in einer Studie von Hansmann et al. als potentes Agens gegen weiteren Tumorprogress erweisen können [31]. Der Östrogenrezeptorstatus wurde prätherapeutisch nicht determiniert. Halevy et al. empfehlen den Einsatz bei positivem ER- α -Status [78]. Für PR-positive Desmoide könnte Mifepriston wirksam sein, was sich bisher jedoch nur in einem publizierten klinischen Fall zeigte [78]. Auch Testolacton, ein Progesteron-Derivat, konnte bei Anwendung über zwei bis 60 Monate (200 mg täglich, n = 10) eine Tumor-Regression bewirken [79]. Goserelin, ein Gonadorelin-Analogon, kam ebenfalls (in Kombination mit Tamoxifen) zur klinischen Anwendung [80, 81]. Goserelin in Kombination mit niedrigdosiertem Tamoxifen konnte eine Tumorregression mit deutlicher Symptomverbesserung erzielen. Eine antiandrogene bzw. Androgen-modulierende Therapie wurde bei Aggressiven Fibromatosen bisher noch nicht beschrieben.

Insgesamt ist die Studienlage zur Hormontherapie der DF sehr uneinheitlich. Bisher konnte keine antihormonelle Therapie als relevant identifiziert werden. Der Wnt-Signalweg und seine potentiellen Zielstrukturen erscheinen molekularbiologisch

interessant. Ob eine Inhibition oder eine Verstärkung dieses Signalwegs therapeutisch wirksamer ist, ist derzeit jedoch noch unklar [36].

1.6 Poly Adenosin Diphosphat Ribose Polymerase-1 (PARP-1)

1.6.1 Funktion

Zellen können endogenen und bzw. oder exogenen Noxen unterliegen. Diese können zu DNA-Schädigungen führen, die physiologisch behoben werden müssen. Dazu stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. PARP-1 ist ein nukleäres Protein, welches einer Proteinfamilie mit aktuell 17 strukturähnlichen Mitgliedern angehört [82]. PARP-1 ist vor allem in die Reparatur von Einzelstrangbrüchen mittels Basenexzision involviert [82].

Bei DNA-Strangbrüchen erfolgt initial durch PARP-1 die Poly-ADP-Ribosylierung von Histonen, Topoisomerasen, DNA-Polymerasen und teils auch PARP-1 selber. Die ribosylierten Proteine werden dadurch negativ geladen und verlieren ihre Affinität zur DNA, was die DNA zugänglich für Reparaturprozesse macht [83]. Zur Poly-ADP-Ribosylierung erfolgt die Konversion von Nicotinamidadeninukleotid (NAD⁺) zu Poly-ADP-Ribose-Ketten [84].

1.6.2 Relevanz in der Humanmedizin

Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 spielen vor allem in der Pathogenese von Mamma- und Ovarialkarzinomen eine Rolle [85]. BRCA-Mutationen führen zu fehlcodierten Proteinen, welche mit Störungen der DNA-Reparatur, vor allem der homologen Rekombination [82, 86, 87], verbunden sind. Tumorzellen von Tumorentitäten mit BRCA-Mutation, bspw. Mamma-, Ovarial- oder Pankreaskarzinom können ihre DNA-Schäden nicht über homologe Rekombination reparieren. Diese Tumorzellen sind folglich auf Enzyme wie die nukleäre PARP-1 angewiesen, welche ihnen über eine Nukleotidexzisionsreparatur ein weiteres Überleben ermöglichen kann [88]. Eine PARP-1-Inhibierung macht somit diesen Weg der DNA-Reparatur unmöglich und führt somit zur Apoptose (Mechanismus visualisiert in Abbildung 1.3).

Olaparib, ein in der EU zugelassener PARP-1-Inhibitor zur Behandlung des high-grade serösen Platin-sensitiven rezidivierenden BRCA-positiven Ovarialkarzinoms, kann dosisabhängig nach aktueller Studienlage eine Tumorregression dieser Entität induzieren [89]. Weitere Forschung bzw. Studien sind notwendig, um Tumoren mit

fehlerhafter homologer Rekombination zu detektieren und ggf. einer PARP-1-Inhibitionstherapie zugänglich zu machen. Auch Tumoren ohne nachgewiesene BRCA-Mutation können unter PARP-Inhibition eine Tumorregression zeigen [90]. Biomarker wie BRCA-Mutationen, Indikatoren für ein wahrscheinliches Ansprechen auf PARP-1-Inhibition, sind ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung [91]. PARP-1-Inhibitoren können darüber hinaus auch Chemo- (bei Alkylanzien, Platin-haltigen Substanzen und Topoisomerase-Inhibitoren [83]) und Radiotherapie verstärkend wirken [82]. Es gibt Hinweise, dass PARP-1 angiogen und pro-inflammatorisch wirkt [92]. Die Inhibierung von Neoangiogenese und Inflammation könnte ebenfalls anti-neoplastisch wirksam sein [92].

In der Therapie von Sarkomen besitzen PARP-1-Inhibitoren gegenwärtig noch keine definierte Therapieempfehlung. In einer Studie zum Ewing-Sarkom konnten sie jedoch auch hier ihre Chemo- und Radiotherapie-verstärkenden Effekte demonstrieren [93]. Eine Chemo- bzw. Radiotherapie greift Tumorzellen primär über DNA-Schädigungen an, folglich können PARP-Inhibitoren durch die Unterbindung der DNA-Reparatur therapeutisch verstärkend wirken [94]. DF wurden bis heute noch nicht auf eine Expression von PARP-1 untersucht.

Insgesamt ist die Therapie mit PARP-1-Inhibitoren noch nicht vollständig erklärt. Es gibt verschiedene Substanzen [95], welche in unterschiedlichen Stadien klinischer und präklinischer Studien evaluiert werden. PARP-Inhibitoren zeigen vor allem gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Übelkeit, und in höheren Dosen weiterhin Knochenmarkssuppression [96]. Die PARP-1 könnte zum Beispiel als Tumorsuppressorgen fungieren, was mit einem nicht unerheblichen Risiko für Zweitmalignome unter PARP-1-inhibitorischer Therapie assoziiert sein könnte [84].

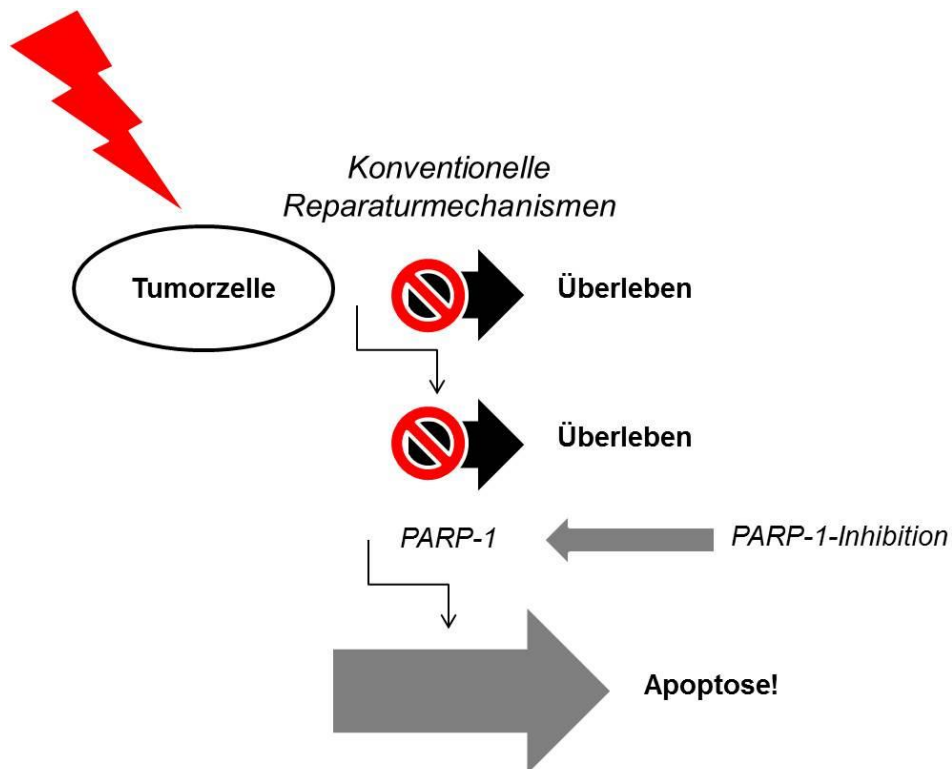


Abbildung 1.3 Prinzip der PARP-1-Inhibition. Tumorzellen unterliegen diversen Noxen (hier als roter Blitz visualisiert). BRCA-mutierte Tumorzellen können jedoch oft nicht auf konventionelle Reparaturmechanismen, wie auch die homologe Rekombination, zurückgreifen. Die PARP-1 ermöglicht über alternative Reparaturmechanismen potentiell ein Tumorzellüberleben. Folge einer PARP-1-Inhibition ist damit die Apoptose der Tumorzelle.

1.7 Fragestellung

In dieser Arbeit wurde retrospektiv Gewebe von 69 Patienten bzw. Patientinnen mit histologisch gesicherter Diagnose eines Desmoidtumors immunhistochemisch und mittels quantitativer Real-Time-PCR auf die Expression von ER- α /ESR1 und $-\beta$ /ESR2, AR, PR/PgR sowie der PARP-1 untersucht, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Gibt es eine differentielle Expression der Steroidhormonrezeptoren sowie der PARP-1 in Desmoidtumoren?
2. Zeigen sich Expressionsunterschiede zwischen Protein- (Immunhistochemie) und mRNA-Ebene?
3. Gibt es relevante Korrelationen in der Rezeptor- bzw. Enzym-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern (beispielsweise Resektionsstatus, Tumorgöße, Lokalisation, Erkrankungsalter, Geschlecht u.a.)?

4. Korreliert der Expressionsstatus mit dem therapeutischen Ansprechen, gemessen an der Zeit bis zu dem Auftreten eines Rezidivtumors? Zeigen sich Expressionsunterschiede im Rezidiv?
5. Zeigen sich durch unsere Arbeit Anhaltspunkte für eine potentielle „targeted therapy“?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die folgenden immunhistochemisch-molekularbiologischen Analysen wurden retrospektiv an Tumormaterial der Routinediagnostik erstellt. Das Material entstammt den Archiven des Instituts für Pathologie der Charité Berlin. Das hier verwendete Kollektiv wurde für die vorliegende Arbeit neu zusammengestellt.

Die Auswahl des Gewebes wurde auf Desmoidfibromatosen aus den Jahren zwischen 2005 und 2015 mit ausreichend archiviertem Tumormaterial begrenzt. Das Kollektiv umfasste insgesamt 69 verwertbare Desmoidfibromatosen. Die Patienten wurden an den Campus der Charité Berlin, überwiegend (n=47; 70,1%) am Campus Virchow Klinikum (CVK), behandelt.

Das Gesamtüberleben wurde definiert als Zeit zwischen Erstdiagnose und Tod, entsprechende Daten wurden eigenständig recherchiert und vom Charité Comprehensive Cancer Center (CCCC) in Kooperation mit dem Landesamt für Bürger- und Ordnungsangelegenheiten (LABO) unter Einhaltung der Richtlinien des Datenschutzes ergänzt. Das rezidivfreie Überleben wurde bestimmt als Zeit zwischen der Erstdiagnose und dem Auftreten von lokalen oder fernen Rezidiven, die klinisch oder pathologisch festgestellt wurden. Die Nachbeobachtungszeit belief sich auf im Median 40 Monate (0 bis 506 Monate).

Das Patientenkollektiv (n = 69) gliedert sich wie folgt auf (siehe Tabelle 2.1): Das durchschnittliche Alter der Patienten (n=27; 39,1%) bzw. Patientinnen (n=42; 60,9%) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug im Median 40 Jahre (Altersspanne von 2 Wochen bis 73 Jahre). Die prädominierende Altersgruppe betraf Patienten zwischen 21 und 50 Jahren (n=37; 53,6%). Der überwiegende Teil der Desmoidfibromatosen entwickelte sich aus der Thorax- bzw. Bauchwand (n=20; 29,0%), gefolgt von den Extremitäten (n=16; 23,2%) und intraabdominellen Tumoren (n=9; 13,0%). Fünf von sieben Patienten mit Gardner-Syndrom wiesen die Desmoidfibromatose wie oft bei diesem Syndrom beschrieben intraabdominell auf. Zwei von sechs Desmoiden in der Mamma traten bei männlichen Patienten auf. Bei den Kopf-Hals-Desmoiden war einer von vier Betroffenen (25,0%) unter 20 Jahren alt.

Die Tumorgroße betrug im Median 55 mm (Spannweite von 7 bis 300 mm). Der Großteil (n=32; 46,4%) der Desmoide lag in der Größenordnung von 7 bis 50 mm.

Unter den 69 analysierten Tumorproben befanden sich 19 Proben (27,5%) aus Rezidivtumoren (siehe Tabelle 2.2). Ein Rezidivtumor wurde hier als Nicht-Primarius und mindestens erstes Tumorrezidiv definiert.

Tabelle 2.1: Patientenkollektiv

Merkmal	Anzahl (Prozent)
Gesamtkollektiv	69 (100%)
Geschlecht	
Männlich	42 (60,9%)
Weiblich	27 (39,1%)
Alter bei Erstdiagnose einer Desmoidfibromatose	
Zwischen 0 und 20 Jahren	13 (18,8%)
Zwischen 21 und 50 Jahren	37 (53,6%)
>50 Jahre	19 (27,5%)
Tumorlokalisation	
Bauch- oder Thoraxwand	20 (29,0%)
Extremität	16 (23,2%)
- Obere Extremität	- 10 (14,5%)
- Untere Extremität	- 6 (8,7%)
Intraabdominell	9 (13,0%)
Mamma	6 (8,7%)
Kopf-Hals	4 (5,8%)
Andere Lokalisation (u.a. Uterus, Scapula, paravertebral)	14 (20,3%)
Tumorgröße (mm)	
Bis 50	32 (46,4%)
51-100	23 (33,3%)
>100	14 (20,3%)

Gardner-Syndrom

Bekannt	7 (10,1%)
Nicht bekannt	62 (89,9%)

Die Desmoide wurden – sowohl Primarien (n=50; 72,5%) als auch Rezidivtumoren (n=19; 27,5%) - überwiegend (siehe Tabelle 2.2) reseziert (n=60; 87,0%). Es erfolgte meist eine adjuvante Radiotherapie (n=32; 46,4%) bzw. eine Resektion mit klinischer Nachkontrolle (n=34; 34,8%). In fast der Hälfte (n=31; 44,9%) der Fälle war histologisch noch Tumor im Resektionsrand nachweisbar. Ebenfalls kam es in etwa 30 Prozent der Fälle zu mindestens einem Rezidiv. Radio-, Chemo- und Immuntherapien kamen als alleinige Therapie in unserem Kollektiv selten zur Anwendung.

Tabelle 2.2: Therapie

Therapieform	Primarius	Rezidivtumor
	Anzahl (%)	Anzahl (%)
Resektion mit adjuvanter Radiotherapie	23 (46,0%)	9 (47,4%)
Alleinige Resektion	20 (40,0%)	4 (21,1%)
Resektion plus Radiochemotherapie	1 (2,0%)	1 (5,3%)
Resektion plus Tyrosinkinase-Inhibitor	0	1 (5,3%)
Resektion plus Chemotherapie	0	1 (5,3%)
Alleinige Radiotherapie	1 (2,0%)	0
Hormon- und Chemotherapie	1 (2,0%)	0
Therapieform nicht bekannt oder unklar	4 (8,0%)	3 (15,8%)

Resektionsränder (Primarien und Rezidivtumoren)

Inadäquate Resektion mit Erreichen der Resektionsränder (R1)	31 (44,9%)
Freie Resektionsränder (R0)	26 (37,7%)
Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden (RX)	5 (7,2%)
Keine Resektion durchgeführt	3 (4,3%)
Nicht bekannt/evtl. nicht bzw. extern reseziert	3 (4,3%)
Extern reseziert	1 (1,4%)

Tabelle 2.3: Vergleich Primarien vs. Rezidivtumoren

	Primarien	Rezidivtumoren
	Anzahl (Intervall bzw. %)	Anzahl (Intervall bzw. %)
Alter bei (Erst-)Diagnose (Median in Jahren)	41 (0;73)	35
Lokalisation		
Intra-,	33 (66,0%)	13 (68,4%)
Extraabdominell	17 (34,0%)	6 (31,6%)
Tumorgröße (mm)		
Bis 50	22 (44,0%)	10 (52,6%)
51 bis 100	15 (30,0%)	8 (42,1%)
>100	13 (26,0%)	1 (5,3%)
Median (mm)	55,8 (11;264)	50,0 (7;300)
Empfehlung Tumorkonferenz		
Alleinige Resektion	20 (40,0%)	9 (47,4%)
Resektion plus adjuvante Radiotherapie	23 (46,0%)	4 (21,1%)
Andere	7 (14,0%)	6 (31,5%)
Resektion		
R0	22 (44,0%)	4 (21,1%)
R1	21 (42,0%)	10 (52,6%)
Andere	7 (14%)	5 (26,3%)

Betroffene mit Rezidivtumor wiesen ein früheres Erkrankungsalter auf (Patienten mit Primarius im Median 41 Jahre; Patienten mit Rezidivtumor im Median 35 Jahre, siehe Tabelle 2.3). Die Lokalisation von Rezidivtumoren im Vergleich zu Primarien blieb jedoch nahezu gleich. Sie waren zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnosestellung kleiner. Bei Rezidivtumoren wurde in vorliegendem Kollektiv vermehrt die alleinige Resektion empfohlen. Eine vollständige Resektion gestaltete sich jedoch häufiger schwierig (R1 der Rezidivtumoren mit 52,6% gegenüber den Primarien mit 42,0%).

2.2 Material

2.2.1 Antikörper

Name mit Klon	Typ und Verdünnung	Hersteller
Androgenrezeptor (AR) Clone F 39.4.1; #MU256-UC	Monoclonal mouse, 1:250	BioGenex, Kalifornien, USA
Ki-67 Clone MIB-1; #M7240	Monoclonal mouse, 1:100	DAKO, Hamburg
Östrogenrezeptor 1 (ER-α) Clone SP1; #RM9101	Monoclonal rabbit, 1:50	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Östrogenrezeptor 2 (ER-β) Clone 14C8; #GTX70174-100	Monoclonal mouse, 1:50	Genetex/biozol, Kalifornien, USA
PARP-1 Clone F-2; #sc-8007	Monoclonal mouse, 1:50	Santa Cruz, Texas, USA
Progesteronrezeptor (PR) Clone PgR 636; #M3569	Monoclonal mouse, 1:50	DAKO, Hamburg

2.2.2 Chemikalien und Enzyme

	Hersteller
Antibody-Diluent #ZUC025-500	Zytomed, Berlin
CC1 (Cell Conditioning Solution 1) #950-124	Ventana, Arizona, USA
DNase-Puffer Versant 1ml #1506013	Siemens, Berlin
DNase-I Versant 0,2ml #1506014	Siemens, Berlin
Ethanol 70% #T913.3	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 80% #9474.3I	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 96% #603-002-00-5	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH, Berlin
Ethanol 100% #K928.4	Carl Roth, Karlsruhe
EZ Prep #950-102	Ventana, Arizona, USA
Färbekits <ul style="list-style-type: none"> DISCOVERY DAB Map Kit (Inhibitor D, Blocker D, SA-HRP D, DAB D, DAB H₂O₂ D, Copper D) #760-124 	Ventana, Arizona, USA

<ul style="list-style-type: none"> • Hematoxylin II #790-2208 • Bluing Reagent #760-2037 • Discovery Universal Secondary Antibody #760-4205 	
LCS (Liquid Coverslip) #650-010	Ventana, Arizona, USA
Nuklease-freies Wasser #603-1102-01	ion torrent, Massachusetts, USA
Proteinkinase K Versant	Siemens, Berlin
Reaction Buffer #950-300	Ventana, Arizona, USA
RiboCC #760-107	Ventana, Arizona, USA
RNA-Isolierung, Set: Versant Tissue Preparation Reagents #H017XA1 <ul style="list-style-type: none"> • MAG-Beads • Pufferlösung • Puffer-Elute • Waschlösungen • FFPE-Puffer 	Siemens, Berlin
RNA-Positiv-Kontrolle "qPCR Human Reference Total RNA"	Clontech, Kalifornien, USA
ROX	Invitrogen, Kalifornien, USA
Spülmittel "zack"	August Wencke, Bremen
Taq-Mix "SuperScript III Platinum"	Invitrogen, Kalifornien, USA
Vitro-Clud	R. Langenbrinck, Emmendingen
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande

2.2.3 Geräte

	Hersteller
Abzug	Captair Filtersystem GmbH, Düsseldorf
Etikettendrucker USA „Ebar II“	Ventana, Arizona, USA
Färbemodul „Ventana Discovery XT“	Ventana, Arizona, USA
Inkubator „Thermomixer 5436“	Eppendorf AG, Hamburg
Real-Time PCR System mit Software:	ThermoScientific, Massachusetts, USA

“Viia7”	
Pipetten (verschiedene Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (elektronisch) “MATRIX” 125µl	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Qubit Fluorometer 2.0	ThermoScientific, Massachusetts, USA
RNA-Extraktionseinheit “Versant kPCR”	Siemens, Berlin
Scanner (Objekträger) “Nanozoomer Digital Pathology”	Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan
Vortexer „MS2 Minishaker“	IKA, Staufen
Zentrifuge „Heraeus BIOFUGE pico“	ThermoScientific, Massachusetts, USA

2.2.4 Primer

Für die quantitative real-time-PCR wurden Primer-und Sondenoligonukleotide verschiedener Firmen verwendet:

Bezeichnung	Sequenz	Firma
ESR1 forward	5'-GCC AAA TTG TGT TTG ATG GAT TAA-3'	Eurogentec, Lüttich, Belgien
ESR1 reverse	5'-GAC AAA ACC GAG TCA CAT CAG TAA TAG-3'	
ESR1 probe	5'-ATG CCC TTT TGC CGA TGC A-3'	
ESR2 forward	5'-GAC CAC AAG CCC AAA TGT GTT-3'	TIB MOLBIOL, Berlin
ESR2 reverse	5'-AAC TGG CGA TGG ACC ACT AAA-3'	
ESR2 probe	5'-TGG CCA ACA CCT GGG CAC CTT T-3'	
PgR forward	5'-AGC TCA TCA AGG CAA TTG GTT T-3'	Eurogentec, Lüttich, Belgien
PgR reverse	5'-ACA AGA TCA TGC AAG TTA TCA AGA AGT T-3'	
PgR probe	5'-TTG ATA GAA ACG CTG TGA GCT CGA-3'	
AR forward	5'-TGT CAA CTC CAG GAT GCT CTA CTT-3'	TIB MOLBIOL, Berlin
AR reverse	5'-ATT CGG ACA CAC TGG CTG TAC A-3'	
AR probe	5'-CTG GTT TTC AAT GAG TAC CGC ATG CAC AAG-3'	
PARP-1 forward	5'-AAG ACC TCC CTG TGG TAA TTG G-3'	Microsynth, Wolfurt- Bahnhof, Österreich
PARP-1 reverse	5'-GCG CTT CGG GTG AAT TCA TA-3'	
PARP-1 probe	5'-TAG CCG AGT CAC ACC CGG TGG C-3'	

RPL37A forward	5'-TGT GGT TCC TGC ATG AAG ACA-3'	TIB MOLBIOL, Berlin
RPL37A reverse	5'-GTG ACA GCG GAA GTG GTA TTG TAC-3'	
RPL37A probe	5'-TGG CTG GCG GTG CCT GGA-3'	
HBB forward	5'- CAG GTA CGG CTG TCA TCA CTT AGA-3'	Microsynth, Wolfurt- Bahnhof, Österreich
HBB reverse	5'-CAT GGT GTC TGT TTG AGG TTG CTA-3'	
HBB probe	5'-CTG CCC TCC CTG CTC CT-3'	

2.2.5 Verbrauchsmaterial

	Hersteller
96-Well-, 384-Well-Platte	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Deckgläser 24x50 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Eppendorfgefäß 0,5 ml #022431064	Eppendorf AG, Hamburg
Objektträger "Superfrost"	ThermoScientific, Massachusetts, USA
PCR-Well-Abdeckfolien	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Reagiergefäß 2,0 ml #72.691	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal-Gefäß 1,5 ml #72.706	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Methoden

2.3.1 Histopathologische Untersuchung

Die gesammelten Gewebelöcke wurden in 5 µm bzw. für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 2 µm dünne Leerschnittpräparate geschnitten. Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnittpräparate wurden lichtmikroskopisch auf die Korrektheit der Diagnose sowie auf ihren ausreichenden prozentualen Tumoranteil evaluiert. Ein Tumoranteil von mindestens 30 Prozent des enthaltenen Gesamtgewebes wurde für den Einschluss in die PCR-Analyse vorausgesetzt.

2.3.2 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Als Antigen fungiert ein Epitop des jeweiligen Zielproteins. Der synthetische Antikörper bindet an

das spezifische Epitop. Ein an den Zweitantikörper gekoppelter Farbstoff verfärbt sich bei Bindung des Primärantikörpers, sodass die Gesamtfärbung lichtmikroskopisch semiquantitativ beurteilt werden kann.

Die zu färbenden Leerschnitte wurden mindestens 12 Stunden bei 60°C im Trockenschrank gelagert. Nach Etikettierung erfolgte die immunhistochemische Färbung mittels des Discovery-XT-Färbemoduls von Ventana. Die Färbung erfolgte analog eines intern etablierten Testprotokolls und (soweit möglich) unter Mitfärbung von Kontrollgewebe. Ein Mammakarzinom-Präparat diente als Positivkontrolle für die ER- α -, AR- und PR-Färbungen. Interne Positivkontrolle für PARP-1 waren die positiv gefärbten Lymphozyten.

Die Primärantikörper wurden jeweils manuell in einem mit „Antibody diluent“ verdünnten Volumen von 200 μ l hinzu pipettiert. Anschließend erfolgten die maschinelle Hinzugabe des Sekundärantikörpers sowie die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin. Nach erfolgreichem Durchlauf des Färbevorgangs wurden Reagensrückstände vorsichtig mittels lauwarmem, mit Spülmittel versetzten, Wassers abgetragen. Daraufhin durchliefen die Objektträger eine aufsteigende Alkoholreihe, das heißt sie wurden nacheinander zweifach in 70%-iges, einfach in 80%- und 90%-iges, sowie dreifach in 100%-iges Ethanol getaucht. Anschließend erfolgte dreifaches Waschen in Xylol-Wannen und das Eindecken der Objektträger mittels ein bis zwei Tropfen Vitro-Clud und einem Deckglas.

Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung erfolgte gemeinsam mit Frau Privatdozentin Dr. med. Berit Pfitzner, Fachärztin für Pathologie, ohne vorherige Kenntnis der Ergebnisse der PCR-Analyse. Ki-67 wurde digital mittels der *Cognition Master Professional Suite* (VMscope GmbH, Berlin), einer Software zur histologischen Bildanalyse, für den Anteil positiver Tumorzellen ausgewertet [97, 98]. Zur Berechnung des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner erfolgte die Evaluierung der Färbeintensität und des prozentualen Anteils der positiv gefärbten Zellen [99]. Der IRS berechnet sich dann aus dem Produkt der Färbeintensität und dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Zellen. Es werden Werte zwischen 0 und 12 erreicht.

Prozentualer Anteil positiv gefärbter Zellen (Faktor a)	Intensität der Färbung (Faktor b)	IRS-Score (Produkt aus a und b)
Keine (0)	Keine Reaktion (0)	Negativ (0-2)
<10% (1)	Schwach (1)	Schwach positiv (3-4)
≥10% und ≤ 50% (2)	Mäßig (2)	Mäßig positiv (6-8)
>50% und ≤ 80% (3)	Stark (3)	Stark positiv (9-12)
>80% (4)		

Abbildung 2.1: IRS-Score nach Remmele und Stegner [99]

2.3.3 PCR-Analyse

RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus jeweils zweimal 5 µm dünnen Schnittpräparaten FFPE-Gewebes mit mindestens 30-prozentigem Tumoranteil erfolgte maschinell mittels des „Versant kPCR“-RNA-Extraktionssystems von Siemens [100]. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich in vorherigen Studien angewandt [101].

Die am Ende vorliegenden, RNA enthaltenden Proben wurden in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße abgefüllt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

RNA-Konzentrationsbestimmungen

Zur Überprüfung des Erfolgs der RNA-Isolierung erfolgte eine fluorometrische RNA-Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Qubit-2.0-Fluorometers. Die mitgelieferten Standards dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

DNA-Kontamination und manueller Nachverdau

In einer von 68 Proben-RNA erfolgte ein manueller Nachverdau aufgrund einer nachgewiesenen DNA-Kontamination. Nach Bestimmung des Volumens der Proben-RNA erfolgte die Ermittlung der erforderlichen DNase-Puffermenge wie folgt: *Puffermenge = Volumen der Proben-RNA x 1,11 – Volumen der Proben-RNA*. Anschließend wurden die errechnete Puffermenge und 1µl DNase I zur Proben-RNA gegeben. Nach initialem Mischen und kurzem Abzentrifugieren erfolgte die Inkubation bei 37 Grad Celsius für 30 Minuten. Dann wurde die DNase I durch zehnminütige Inkubation bei 80 Grad Celsius inaktiviert.

Quantitative Real Time-PCR

Mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden ausgewählte Genabschnitte exponentiell amplifiziert. Durch Bindung hergestellter Primer mittels spezifischer Sonden können selektiv Zielgene, hier die Steroidhormonrezeptoren und die PARP-1, amplifiziert und quantifiziert werden.

Die folgenden Arbeiten wurden auf intensiv gereinigten Arbeitsplätzen durchgeführt. Zunächst wurden Primer mit Sonden zusammengefügt, und anschließend bei -20°C gelagert (siehe Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Erstellung der Primer und Sonden

Komponente	Volumen (μl) (gültig für alle obigen Primer)
Primer forward	50
Primer reverse	50
Primer probe	25
Aqua	875
Gesamt	1000

Die PCR erfolgte auf 384-Well-Platten mit jeweils bis zu 16 RNA-Proben und sieben Primern bzw. Ziel-Genen. Die Proben und Primer wurden vorsichtig aufgetaut. Anschließend erfolgte die sorgfältige Präparation der jeweiligen $10\mu\text{l}$ -Reaktionsansätze (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Ansatz für eine Reaktion

Reagenz	Volumen (μl)
Nuklease-freies Wasser	3,35
RT qPCR MM (INV) & Rox	5,2
RT/Taq Mix	0,2
Jeweilige extrahierte RNA	0,25
Jeweiliger Primer-Sonden-Mix	1
Gesamt	10

Alle Ansätze wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und als Dreifachwerte zusammen mit einer mRNA- und einer Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser) auf eine 384-Well-Platte pipettiert. Diese wurde mit einer transparenten Klebefolie verschlossen, kurz bei 2000 U/min zentrifugiert und in das „Vii7“-PCR-System zur Analyse überführt.

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte über 30 Minuten bei 50°C, wonach 2 Minuten bei 95 °C zur Aktivierung der Taq-Polymerase folgten. Im Anschluss folgten 40 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95° zur Denaturierung, sowie 30 Sekunden bei 60°C zum Annealing der Primer und Elongation des neuen Stranges. Am Ende jedes Zyklus wurde bei 60°C das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Resultate konnten nach Abschluss der PCR mit dem Programm „Quant Studio Real Time PCR“ (Version 1.2, ThermoFisher) evaluiert werden.

Berechnung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte

Zur Evaluation wurden die Resultate der quantitativen RT-PCR in $\Delta\Delta Ct$ -Werte verrechnet. Dies erfolgte mit folgender Gleichung:

$$\Delta\Delta Ct\text{-Wert}_{Gen} = 20 - (Ct\text{-Wert}_{Gen} - Ct\text{-Wert}_{RPL37A}), \text{ mit RPL37A als Housekeeper-Gen.}$$

Damit korreliert der $\Delta\Delta Ct$ -Wert mit der Stärke der Expression des jeweiligen Gens.

Cutoff-Bestimmung für die Analyse der PCR

Als expressionsdeterminierende Cutoffs wurden jeweils zwei Werte aus dem „Cutoff-Finder“ (<http://molpath.charite.de/cutoff/> [102]) gewählt. Einer dieser Cutoffs basiert auf der Analyse zweier die Daten beschreibender Gauß'scher Verteilungen; er wird als der Schnittpunkt der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen dieser Mischverteilung festgelegt („fit of mixture“-Modell). Der zweite Cutoff entstammt einer Überlebensanalyse („survival significance“-Modell). Als Ereignis wurde das Auftreten eines Rezidivs, als Zeit die Zeitspanne zwischen Erstdiagnose bis zum Auftreten des möglichen Rezidivs definiert. Die Berechnungen des Cutoff-Finders belaufen sich in diesem Falle auf einen log-rank test.

Für den ESR1 und den PgR wurden zusätzlich die Cutoff-Werte des Mammakarzinoms verwendet, da diese in bereits vorherigen Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe mehrfach angewandt wurden [101].

Gewebeproben mit einem Tumoranteil von unter 30 Prozent wurden für die statistische Analyse der Resultate der PCR (wie auch im Cutoff-Finder) nicht berücksichtigt. Damit standen letztlich 60 PCR-analytische Probenwerte zur Verfügung (davon 41 Primär- und 19 Rezidivtumoren).

2.4 Statistische Analyse und Auswertung

Die statistischen Analysen sowie die graphische Auswertung erfolgten unter Anwendung der Software „IBM SPSS Statistics“ (Version 22, IBM, Armonk, NY, USA). p-Werte wurden zweiseitig bestimmt (etwaige einseitige Signifikanz wurde angegeben) und p-Werte $< 0,05$ als signifikant betrachtet.

Mögliche Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern auf mRNA-Ebene wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft. Zur Überprüfung einer potentiellen Korrelation von mRNA- und Protein-Daten wurde der Spearman-Rho-Test angewendet. Mögliche Zusammenhänge zwischen Primarius bzw. Rezidivtumor und IRS wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests für unverbundene Stichproben untersucht. Überlebensanalysen erfolgten univariat mit Kaplan-Meier-Kurven und multivariat mittels Cox-Regressions-Modellen.

Das Patientenalter wurde in Subgruppen analysiert (< 40 bzw. ≥ 40 Jahren bei Erstdiagnose). Ebenso wurde die Tumorgroße in drei Subgruppen analysiert (0 bis 50 mm, 51 bis 100 mm und >100 mm).

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Steroidhormonrezeptoren in Desmoidtumoren

3.1.1 Östrogenrezeptor-Expression auf Proteinebene

Von 42 angefärbten Tumorgewebeproben wiesen alle (n=42; 100%) eine fehlende nukleäre Expression des Östrogenrezeptor- α in den Tumorzellen auf (IRS=0).

Die nukleäre Expression von Östrogenrezeptor- β zeigte sich in 36 von 37 gefärbten Tumorgewebeproben ebenfalls komplett negativ. Eine Probe wies einen IRS von „1“ (schwache Färbeintensität, <10% positive Zellen) auf. Korrelationsanalysen wurden aufgrund der Homogenität des Färberesultats nicht durchgeführt.

Die zytoplasmatische Expression des ER- β zeigte sich deutlich heterogener (siehe Abbildung 3.1, 3.3 und 3.4). Die Färbeintensität war schwach bis komplett negativ (siehe Abbildung 3.2).

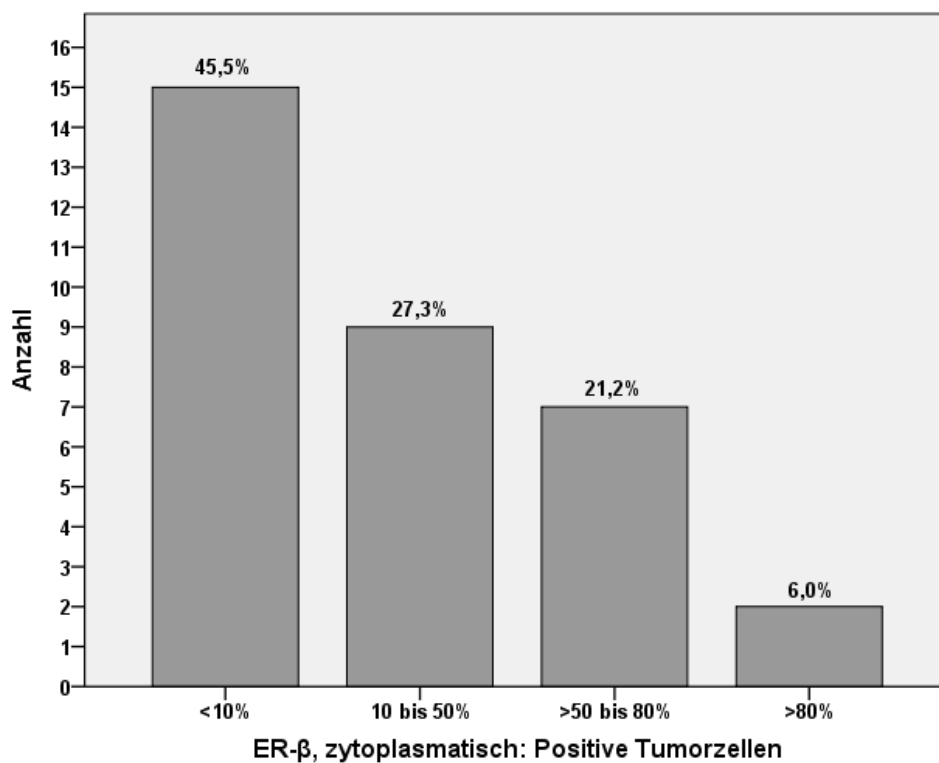


Abbildung 3.1: Prozentualer Anteil ER- β -positiv gefärbter Zellen, zytoplasmatisch (n=33)

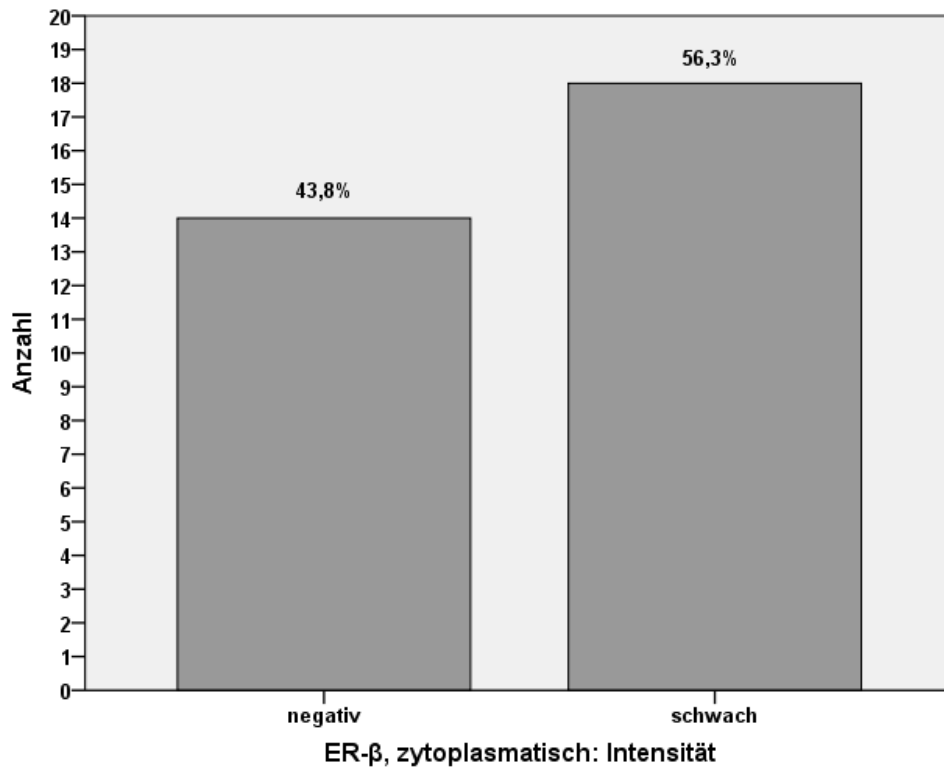


Abbildung 3.2: Intensität ER- β , zytoplasmatisch (n=32)

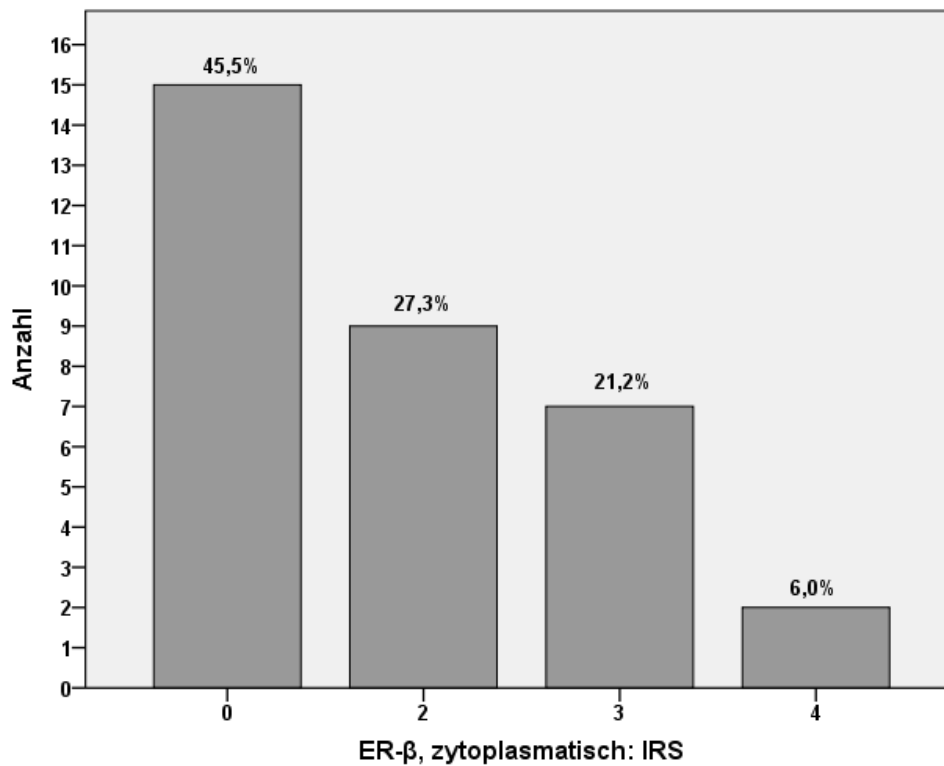


Abbildung 3.3: IRS ER- β , zytoplasmatisch (n=33)

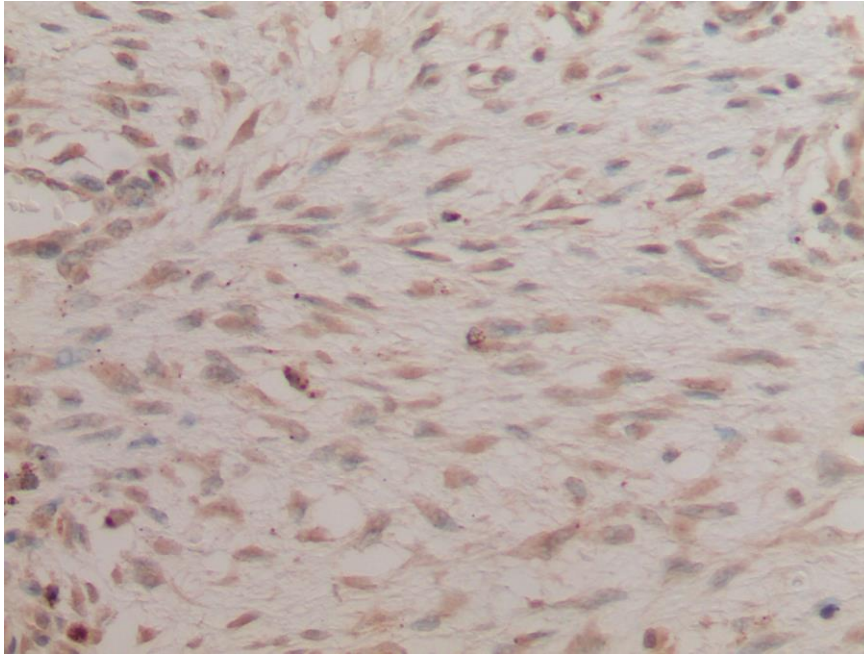


Abbildung 3.4: Expression von zytoplasmatischem ER-β mit IRS=3 bei schwacher Intensität und 60% positiven Tumorzellen. Rezidierte Desmoidfibromatose der Thoraxwand, weiblich, 49 Jahre. Aus vorliegendem Kollektiv.

Aufgrund der heterogenen Verteilung der zytoplasmatischen IRS-Resultate wurden Korrelationsanalysen für den ER-β in zwei Gruppen (IRS > 2 und IRS ≤ 2) durchgeführt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Expression im Vergleich der Subgruppen (Primarius vs. Rezidivtumor, p=0,431, Fischer-Exakt-Test).

Es gab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der nukleären Protein-Expression (anhand des IRS) der beiden Östrogenrezeptoren im Hinblick auf Primarius oder Rezidivtumor (Whitney-Mann-U-Test, ER-α: p=1,000; ER-β: p=0,333).

3.1.2 Östrogenrezeptor-Expression auf mRNA-Ebene

Eine positive Expression wurde für den ESR1 ab einem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert von >13,392 (survival significance); >11,049 (fit of mixture); und >14,5 (Referenz-Cutoff des Mammakarzinoms) definiert (siehe 2.3.3.6), für den ER-β hingegen ab einem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert von >7,72 (survival significance) und >7,33 (fit of mixture). Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Intervalle sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben.

Tabelle 3.1 $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Intervalle und Mediane für ESR

Gen (n=60)	$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Intervall	Median
ESR1	7,665 bis 15,196	11,131
ESR2	0 bis 12,710	9,539

Die Expression des ESR1 zeigte sich teils heterogen mit einer offensichtlichen Diskrepanz im Fit-of-mixture-Modell. Für den ESR2 hingegen wiesen beide Cutoffs ähnliche Ergebnisse auf (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 mRNA-Expression der ESR

Gen	Fit-of-mixture	Survival	Referenz Mammakarzinom
ESR1 positiv	n=31 (51,7%)	n=56 (93,3%)	n=58 (96,7%)
ESR1 negativ	n=29 (48,3%)	n=4 (6,7%)	n=2 (3,3%)
ESR2 positiv	n=46 (76,7%)	n=44 (72,1%)	-
ESR2 negativ	n=14 (23,3%)	n=16 (27,9%)	-

Daten zur ESR-mRNA- und Proteinexpression lagen für 38 Patienten vor. Es erfolgte bei fehlender Expression auf Proteinebene keine Korrelationsanalyse mit der mRNA-Expression.

Daten zur ESR2-mRNA- und Proteinexpression lagen für 33 Patienten vergleichend vor. Im Gesamtkollektiv korrelierten gemessene mRNA- ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -) und Proteinwerte (IRS, nukleär; jeweils kontinuierliche Daten) nicht signifikant miteinander (Korrelationskoeffizient $r=0,279$; $p=0,116$; Spearman-Rho-Test). Auch die zytoplasmatische Proteinexpression korrelierte nicht mit der mRNA-Expression (Korrelationskoeffizient $r=-0,168$; $p=0,366$; Spearman-Rho-Test).

Es zeigten sich auf mRNA-Ebene keine Unterschiede der ESR1-Expression im Vergleich zwischen Primär- und Rezidivtumoren ($p=0,468$). Des Weiteren wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede bei Patienten mit Gardner-Syndrom ($p=0,434$), im Geschlechter- ($p=0,486$) und Tumorgrößenvergleich ($p=0,526$), im Vorhandensein von Residualtumor ($p=0,530$) sowie in Lokalisation ($p=0,659$) und Alter bei Erstdiagnose ($p=0,849$) festgestellt.

Die Expression des ESR2 zeigte sich auf mRNA-Ebene bei den mittelgroßen Desmoidtumoren (zwischen 51 und 100 mm) signifikant erhöht ($p=0,035$, siehe Abbildung 3.5). Die Expression ergab in Hinblick auf das Geschlecht keine signifikanten Unterschiede ($p=0,062$).

Keine statistisch als signifikant betrachteten Unterschiede konnten für den ESR2 im Vergleich zwischen Primär- und Rezidivtumoren ($p=0,737$), bei Gardner-Patienten ($p=0,641$), in der Lokalisation ($p=0,494$), bei dem Vorhandensein von Residualtumor ($p=0,650$) und bei dem Alter bei Erstdiagnose ($p=0,117$) ausgemacht werden.

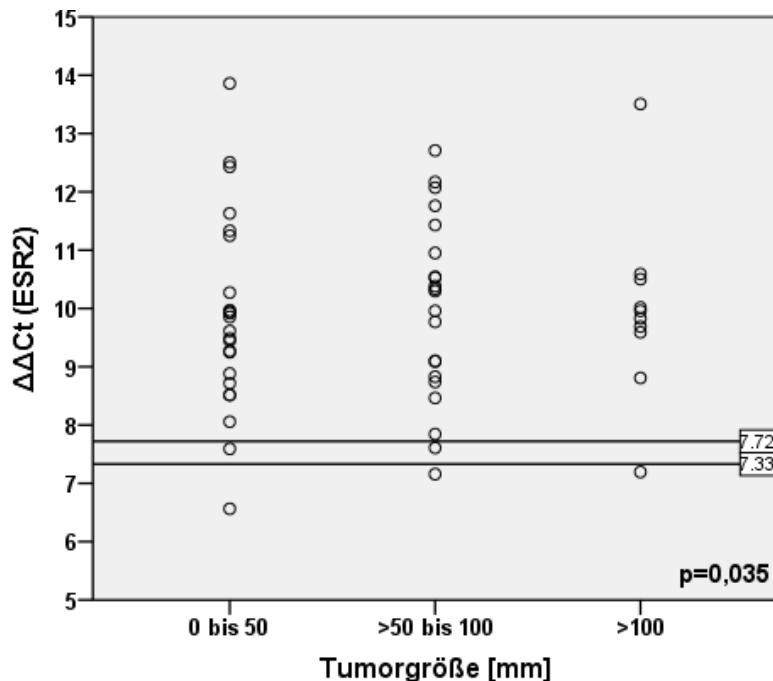


Abbildung 3.5: Korrelation von Tumorgroße und $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert für den ESR2 mit den beiden optimalen Cutoffs (7,72 und 7,33) als horizontale Linien. Mittelgroße Tumoren (>50 bis 100 mm) zeigten im Vergleich signifikant ($p=0,035$) erhöhte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte.

3.1.3 Progesteronrezeptor-Expression auf Proteinebene

Von 41 gefärbten Tumorgewebeproben zeigten alle (100%) Tumore eine fehlende nukleäre Expression des Progesteronrezeptors. Der IRS beträgt damit für alle Proben Null. Korrelationsanalysen sind daher nicht zielführend.

3.1.4 Progesteronrezeptor-Expression auf mRNA-Ebene

Der Progesteronrezeptor zeigte in 60 Proben $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von 0 bis 12,643 mit einem Median von 9,635. Für den PgR wurde eine positive Expression ab einem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert von >8,93 (survival significance); >6,31 (fit of mixture); und >12 (Referenz-Cutoff des Mammakarzinoms) definiert (siehe Tabelle 3.3). Es zeigt sich eine starke Diskrepanz zwischen den verschiedenen Cutoff-Modellen.

Tabelle 3.3 mRNA-Expression PgR

Gen	Fit-of-mixture	Survival	Referenz Mammakarzinom
PgR positiv	n=51 (85,0%)	n=41 (68,3%)	n=4 (6,7%)
PgR negativ	n=9 (15,0%)	n=19 (32,7%)	n=56 (93,3%)

Es ergab sich keine Signifikanz für eine stärkere abdominelle Expression ($p=0,067$) und eine stärkere Expression in Tumoren weiblicher Patientinnen ($p=0,087$).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der PgR-Expression im Vergleich zwischen Primarien und Rezidivtumoren ($p=0,707$). Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit Gardner-Syndrom ($p=0,589$), im Tumorgößenvergleich ($p=0,433$), im Vorhandensein von Residualtumor ($p=1,000$) sowie bei dem Alter bei Erstdiagnose ($p=0,190$) festgestellt werden.

Korrelation mRNA- vs. Protein-Expression

Daten zur Progesteronrezeptor-mRNA- und Proteinexpression lagen für 38 Patienten vor. Es erfolgte bei fehlender Expression auf Proteinebene keine Korrelationsanalyse mit der mRNA-Expression.

3.1.5 Androgenrezeptor-Expression auf Proteinebene

Von 33 gefärbten Tumorgewebeproben zeigten 32 (97,0%) eine fehlende Androgenrezeptor-Expression. Eine Probe wies eine Färbung von zehn Prozent der Zellen bei mäßiger Färbeintensität auf, was einem IRS von 2 entspricht. Aufgrund der hohen Zahl fehlender AR-Expression sind Korrelationsanalysen nicht sinnvoll.

3.1.6 Androgenrezeptor-Expression auf mRNA-Ebene

Der Androgenrezeptor zeigte in 60 Proben $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von 0 bis 12,710 mit einem Median von 9,539. Für den AR wurde positive Expression ab einem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert von $>12,573$ (survival significance) und $>12,237$ (fit of mixture) definiert (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 mRNA-Expression AR

Gen	Fit-of-mixture	Survival
AR positiv	n=35 (58,3%)	n=26 (43,3%)
AR negativ	n=25 (41,7%)	n=34 (56,7%)

Es zeigte sich statistisch signifikant, dass Tumoren zwischen 51 und 100 mm ($p=0,005$) stärker den AR exprimieren. Des Weiteren weisen Primärtumoren ($p=0,011$) und abdominelle Tumore ($p=0,01$) eine stärkere Expression von AR auf (siehe Abbildungen 3.6 bis 3.8).

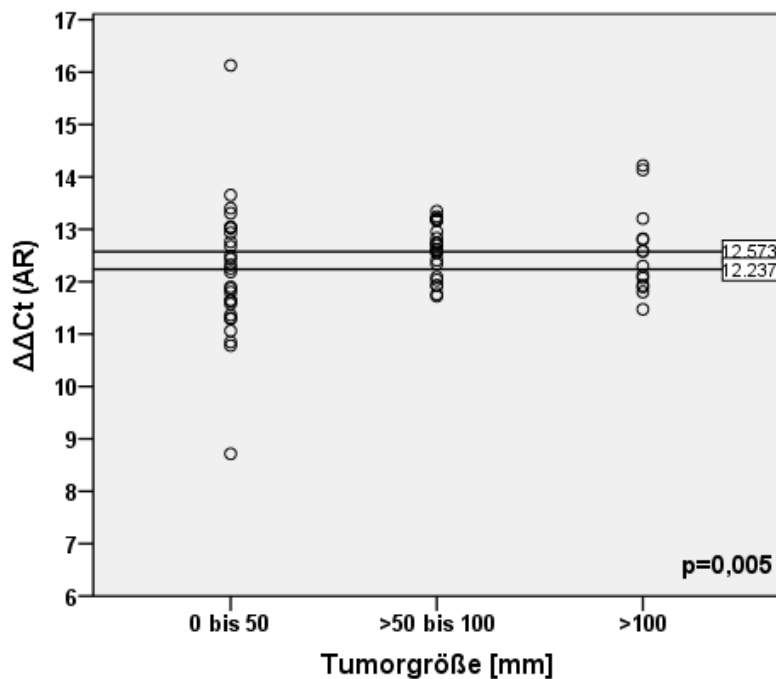


Abbildung 3.6: Korrelation von Tumorgroße und $\Delta\Delta Ct$ -Wert für den AR mit den beiden optimalen Cutoffs (12,573 und 12,237) als horizontale Linien. Mittelgroße Tumoren (51 bis 100 mm) zeigten im Vergleich signifikant ($p=0,005$) erhöhte $\Delta\Delta Ct$ -Werte.

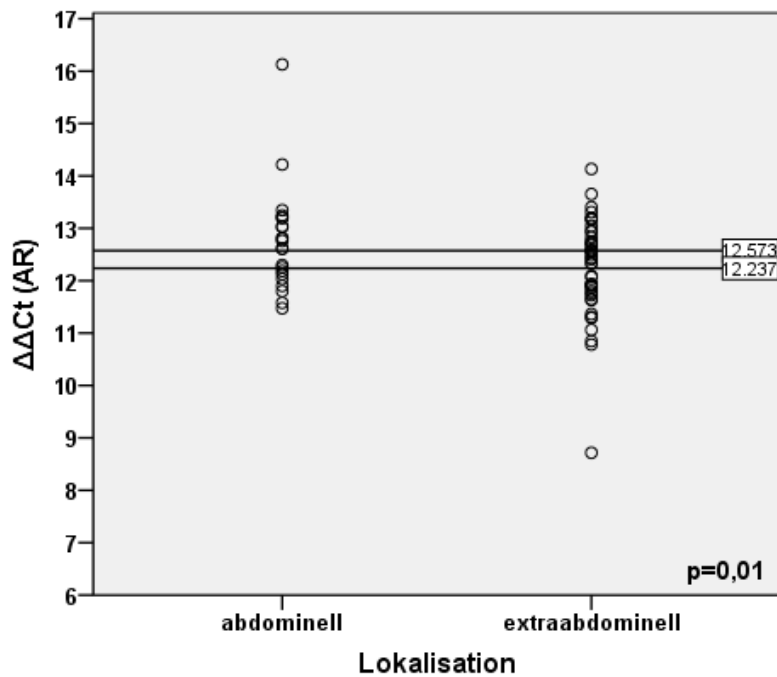


Abbildung 3.7: Korrelation von Tumorlokalisierung und $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert für den AR mit den beiden optimalen Cutoffs (12,573 und 12,237) als horizontale Linien. Extraabdominelle Tumoren zeigten im Vergleich signifikant ($p=0,1$) erhöhte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte.

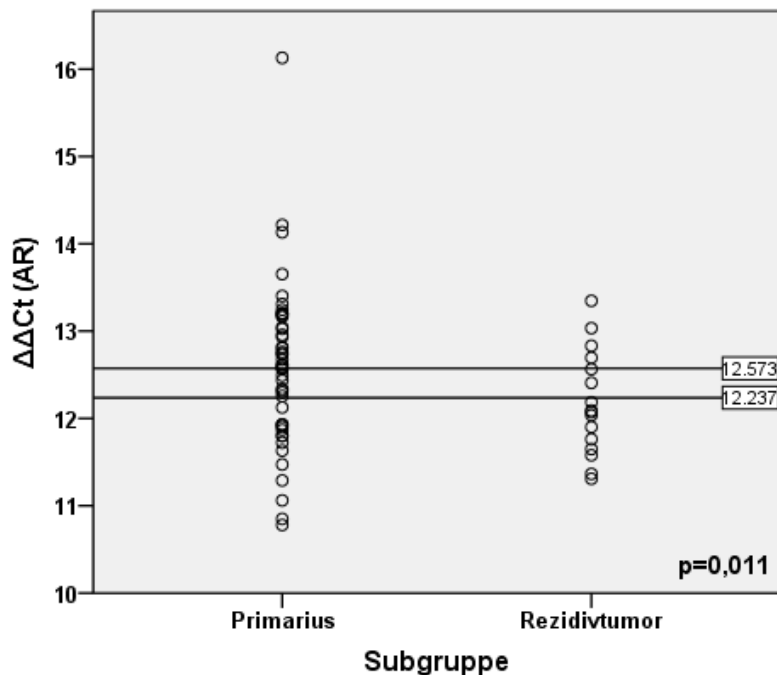


Abbildung 3.8: Korrelation von Subgruppe und $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert für den AR mit den beiden optimalen Cutoffs (12,573 und 12,237) als horizontale Linien. Primarien zeigten im Vergleich signifikant ($p=0,011$) erhöhte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte.

Es gab in unserem Kollektiv keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Geschlecht ($p=0,187$), bei Patienten mit Gardner-Syndrom ($p=0,481$) und dem Alter bei Erstdiagnose ($p=0,829$).

Korrelation mRNA- vs. Protein-Expression

Daten zur Androgenrezeptor-mRNA- und Proteinexpression lagen für 31 Patienten vor. Im Gesamtkollektiv korrelierten gemessene mRNA- ($\Delta\Delta C_t$ -) und Proteinwerte (IRS, nukleär; jeweils kontinuierliche Daten) nicht signifikant miteinander (Korrelationskoeffizient $r=-0,061$; $p=0,743$; Spearman-Rho-Test).

3.2 Expression von PARP-1 in Desmoidtumoren

3.2.1 PARP-1-Expression auf Proteinebene

Von 58 angefärbten Tumorgewebeproben wiesen alle (100%) eine fehlende zytoplasmatische Expression der PARP-1 auf. Die nukleäre Expression zeigte sich in 46 Fällen schwach, in 11 Fällen mäßig positiv und in nur einem Fall negativ (siehe Abbildung 3.10). Es zeigte sich somit ein heterogenes Expressionsprofil (siehe Abbildungen 3.9, 3.11 und 3.12).

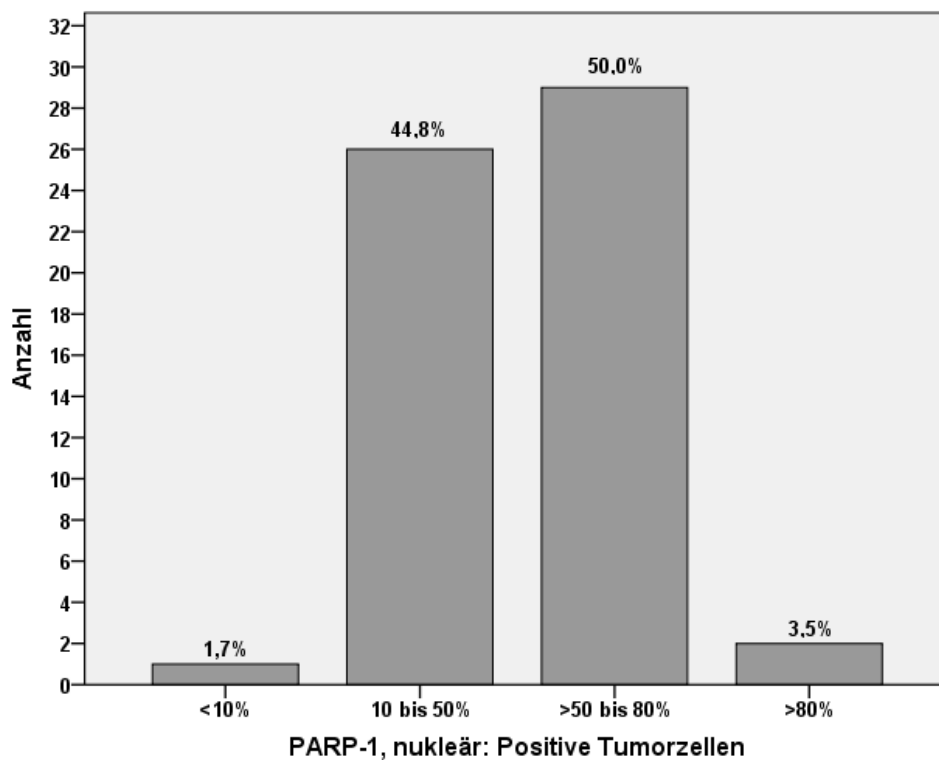


Abbildung 3.9: Prozentualer Anteil PARP-1-positiv gefärbter Zellen nukleär (n=58)

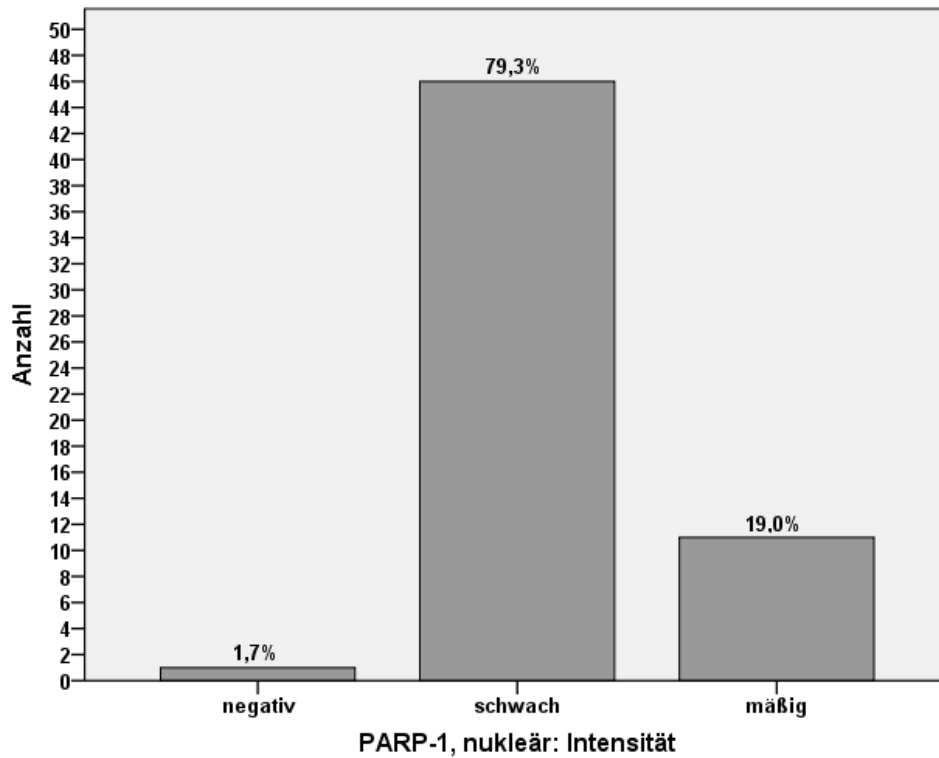


Abbildung 3.10: Intensität PARP-1, nukleär (n=58)

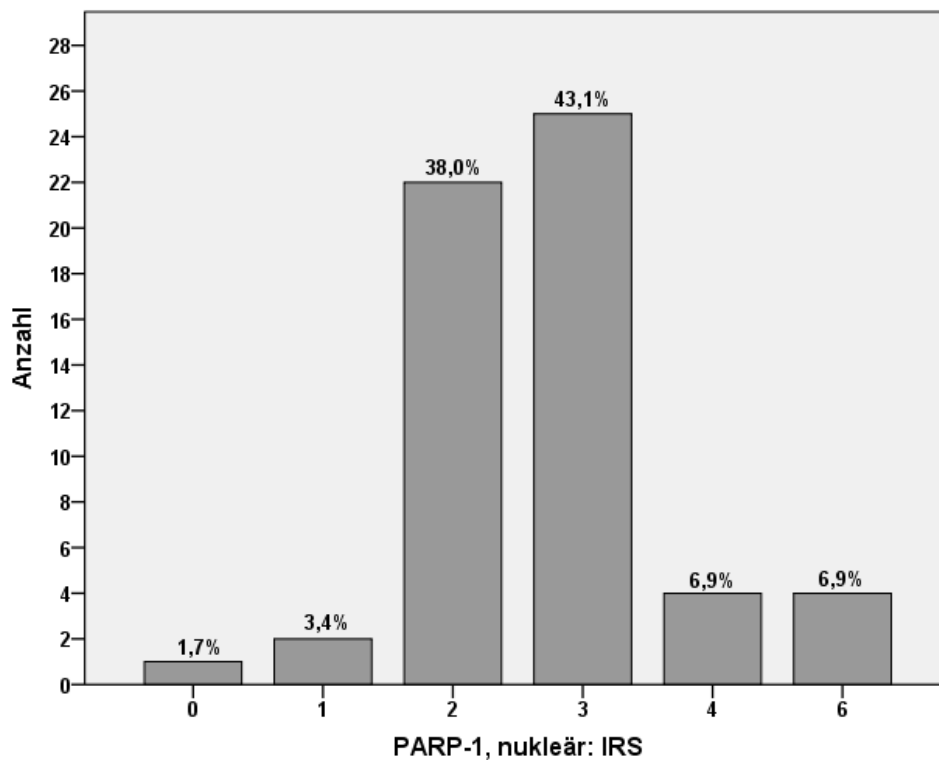


Abbildung 3.11: IRS PARP-1, nukleär (n=58)

Aufgrund unterschiedlicher IRS-Resultate wurden statistische Analysen bezüglich des nukleären IRS von PARP-1 in zwei numerisch ähnlichen Gruppen (IRS > 3 und IRS ≤ 3)

durchgeführt. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Subgruppen (Primarius vs. Rezidiv, $p=0,558$, Fischer-Exakt-Test).

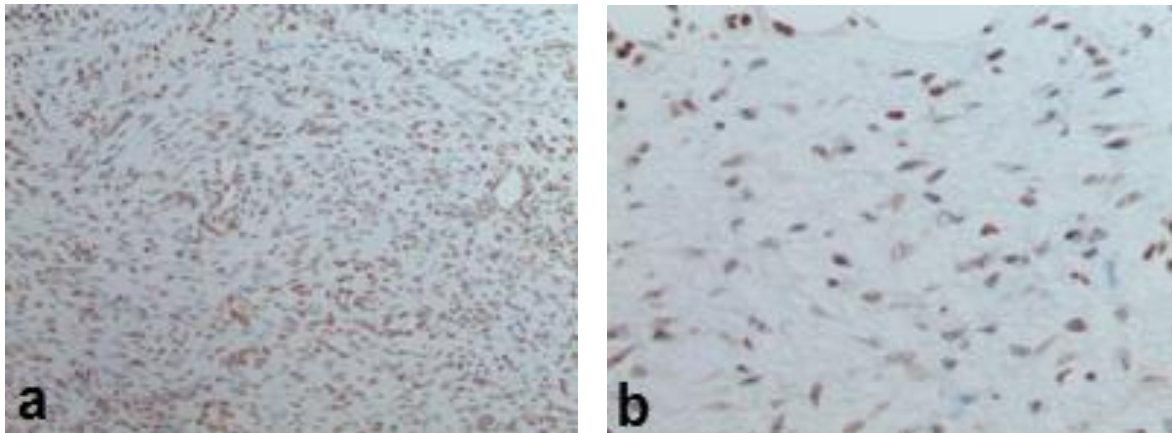


Abbildung 3.12: Nukleäre PARP-1-Expression mäßiger Intensität (IRS=6) zweier Desmoidfibromatosen, a) 100fache Vergrößerung, b) 400fache Vergrößerung. Aus vorliegendem Kollektiv.

Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der nukleären Protein-Expression (anhand des IRS) des PARP-1-Enzyms im Vergleich der Primär- mit den Rezidivtumoren (Whitney-Mann-U-Test, $p=0,333$).

3.2.2 PARP-1- Expression auf mRNA-Ebene

Die PARP-1 zeigte in 60 untersuchten Proben $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von 11,665 bis 15,843 mit einem Median von 14,685. Für die PARP-1 wurde positive Expression ab einem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert von $>15,487$ (survival significance) und $>14,015$ (fit of mixture) definiert.

Im Fit-of-mixture-Modell zeigten 41 von 60 (68,3%) Desmoidtumoren eine positive Expression über dem Cutoff. Das aus den Überlebensdaten abgeleitete Modell zeigte hingegen positive Expression in nur 11 (18,3%) von 60 Fällen.

Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede bei Patienten mit Gardner-Syndrom ($p=0,175$), im Geschlecht ($p=0,074$), in der Subgruppe ($p=0,052$), in der Tumorgroße ($p=0,609$) und –lokalisierung ($p=0,581$) sowie bei dem Alter der Erstdiagnose ($p=0,194$).

Korrelation mRNA- vs. Protein-Expression

Daten zur PARP-1-mRNA- und Proteinexpression lagen für 60 Patienten vor. Im Gesamtkollektiv korrelierten gemessene mRNA- ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -) und Proteinwerte (IRS, nukleär; jeweils kontinuierliche Daten) nicht signifikant miteinander (Korrelationskoeffizient $r=0,021$; $p=0,871$; Spearman-Rho-Test). Es erfolgte bei

fehlender zytoplasmatischer Expression auf Proteinebene keine Korrelationsanalyse mit der mRNA-Expression.

3.3 Expression von Ki-67 in Desmoidtumoren

In vorliegender Arbeit wurde ebenfalls die immunhistochemische Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht.

3.3.1 Ki-67-Expression auf Proteinebene

Von 36 gefärbten Proben zeigten 35 positive Expression (siehe Beispiel einer Histologie in Abbildung 3.14). Prozentwerte zwischen eins und fünf Prozent überwogen (siehe Abbildung 3.13) im Vergleich mit den beiden anderen Subgruppen (bis ein Prozent, sowie mehr als fünf Prozent Expression). Der Median prozentual positiver Zellen lag bei 2,49% (Range 0 bis 15,49%).

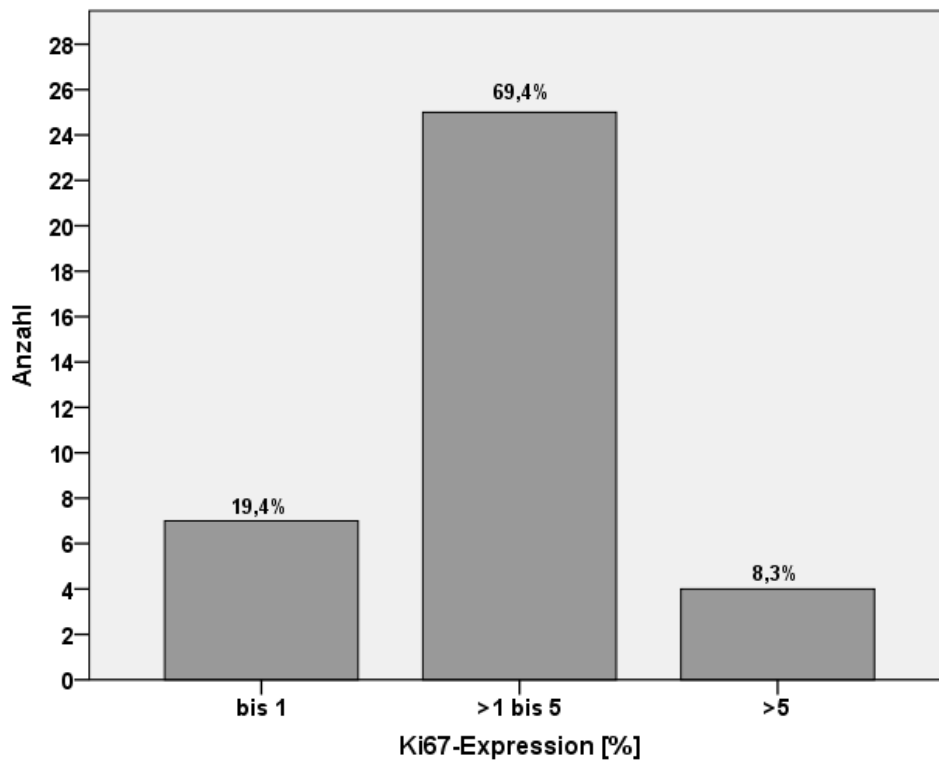


Abbildung 3.13: Verteilung der Ki67-Expression in Gruppen (n=36)

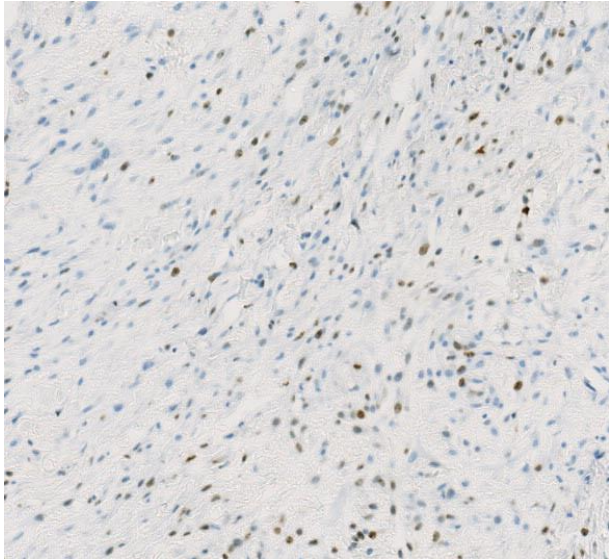


Abbildung 3.14: Histologisches Präparat mit 15 Prozent Ki-67-positivem Tumorzellanteil. Aus vorliegendem Kollektiv.

Bezüglich der untersuchten klinisch-pathologischen Faktoren wie Subgruppe ($p=0,587$), Geschlecht ($p=0,50$), Lokalisation ($p=0,543$), bekanntes Gardner-Syndrom ($p=0,792$) und Tumorgröße ($p=1,0$) konnten mittels Fischer-Exakt-Test keine signifikanten Korrelationen ausgemacht werden.

Der Anteil Ki-67-positiver Zellen korrelierte invers signifikant mit dem IRS-Wert nukleärer PARP-1-Expression (Korrelationskoeffizient $r=-0,375$; $p=0,041$; Spearman-Rho-Test).

Korrelationsanalysen von Ki-67- und der mRNA-Expression (anhand der $\Delta\Delta Ct$ -Werte und dem Spearman-Rho-Test) der in unserem Kollektiv untersuchten Gene zeigten eine signifikante inverse Korrelation zwischen Ki-67- und der mRNA-Expression des PgR (Korrelationskoeffizient $r=-0,389$; $p=0,019$). Für die ESR-1 ($p=0,416$) und -2 ($p=0,187$), sowie den AR ($p=0,910$) und PARP-1 ($p=0,965$) konnten wir keine signifikanten Korrelationen mit der Ki67-Expression herausstellen.

3.4 Uni- und multivariate Überlebensanalysen

3.4.1 Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern sowie Subgruppen

Die Überlebensanalyse bezieht sich auf das rezidivfreie Überleben in Monaten. Die dazu nötigen Angaben konnten in 47 von 60 Fällen (78,3%) erhoben werden. Ein Rezidiv ist in 15 von 60 Fällen (25,0%) aufgetreten.

Zunächst wurde das rezidivfreie Überleben univariat mittels Kaplan-Meier-Analysen mit den relevanten klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das Alter (≤ 40 Jahren) bei Erstdiagnose ($p=0,458$; log-rank-Test), auf die Therapie ($p=0,343$; log-rank-Test), auf die Lokalisation des Desmoids ($p=0,212$; log-rank-Test), auf den Residualtumor ($p=0,335$; log-rank-Test), auf die in Gruppen eingeteilte TumorgroÙe ($p=0,248$; log-rank-Test) und auf das Geschlecht ($p=0,481$; log-rank-Test).

Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen Primär- und Rezidivtumoren ($p<0,001$; log-rank-Test). Rezidivtumoren scheinen signifikant früher erneut zu rezidivieren (siehe Abbildung 3.15).

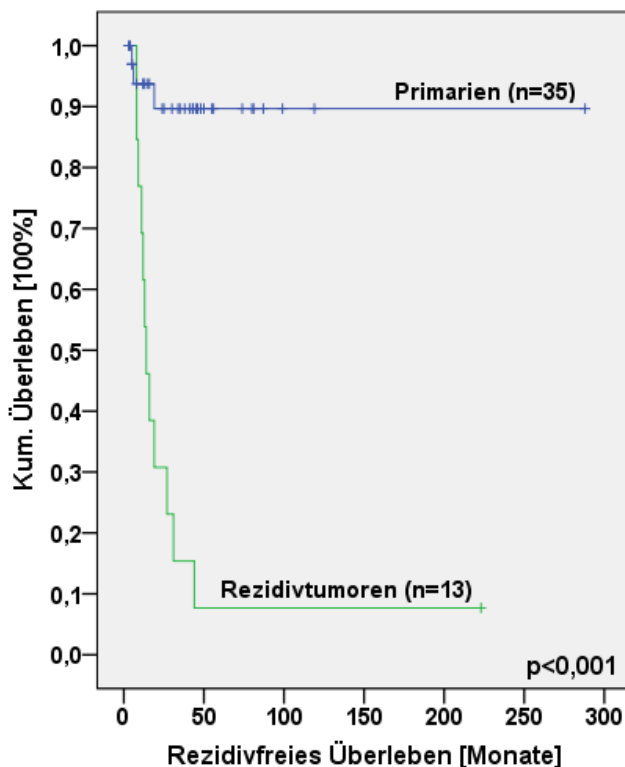


Abbildung 3.15: Rezidivtumoren rezidivieren signifikant früher.

3.4.2 ESR

Aufgrund der überwiegend fehlenden immunhistochemischen Expression der untersuchten Rezeptoren wurden die Werte der qRT-PCR zur Korrelationsanalyse verwendet. In der univariaten Überlebensanalyse der kontinuierlichen mRNA-Daten mit dem Cox-Regressionsmodell zeigten sich keine signifikanten Korrelationen der ESR1- und ESR2-mRNA-Expression mit dem rezidivfreien Überleben (ESR1: $p=0,835$; HR=1,05; 95% CI: 0,663-1,662; ESR2: $p=0,228$; HR=1,117; 95% CI: 0,936-1,332).

Die Kaplan-Meier-Überlebensanalysen zeigten unter Verwendung des Cutoffs für das Mammakarzinom (hochexprimierend ab einem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert von 14,5) einen Trend zu signifikant längerem rezidivfreiem Überleben für schwächer ESR1 exprimierende Tumoren ($p=0,003$; Log-Rank-Test). Dies galt auch ($p=0,005$; Log-Rank-Test) für den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Cutoff aus der Überlebensanalyse des Cutoff-Finders ($\Delta\Delta\text{Ct}=13,392$, siehe Abbildung 3.16).

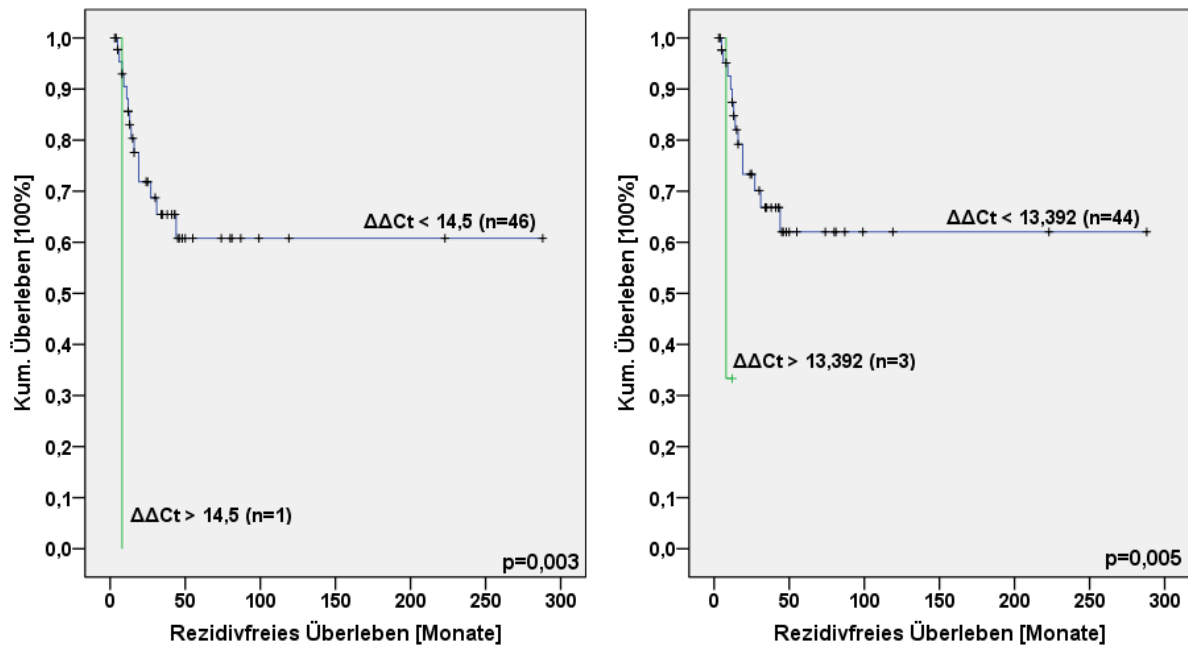


Abbildung 3.16: Beide Kaplan-Meier-Kurven sprechen für ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben bei fehlender bzw. schwacher Expression des ESR1.

Es wurde eine Cox-Regressions-Analyse durchgeführt, um das univariat signifikant höhere Überleben bei ESR1-geringerexprimierenden Tumoren im multivariaten Kontext zu überprüfen. In diese wurde die Subgruppe Primärtumor versus Rezidivtumor einbezogen, da diese univariat Unterschiede zeigte. Hier konnten sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen lassen ($\Delta\Delta\text{Ct} < 14,5$: $p=0,18$; $\Delta\Delta\text{Ct} < 13,392$: $p=0,142$). Als unabhängiger prognostischer Parameter gilt jedoch nach wie vor die Subgruppe, d.h. Rezidivtumoren rezidivieren früher ($p<0,001$; 95%-CI 3,456-45,892; HR 12,594).

In Verwendung des aus Gauß'schen Verteilungen ermittelten Cutoffs ($\Delta\Delta\text{Ct}=11,049$) zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede im rezidivfreien Überleben ($p=0,24$; Log-Rank-Test).

Für den ESR2 ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Überleben. Sowohl der aus Überlebensdaten-ermittelte ($p=0,085$; Log-Rank-Test), als auch der aus Gauß'schen Verteilungen ermittelte Cutoff ($p=0,085$; Log-Rank-Test) zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Die immunhistochemischen Daten für die zytoplasmatische ER- β -Expression zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p=0,397$; log-rank-Test) im rezidivfreien Überleben aufgeteilt nach Subgruppe (Primär- bzw. Rezidivtumor) und Expression (IRS > 2 bzw. ≤ 2 , siehe Abbildung 3.17).

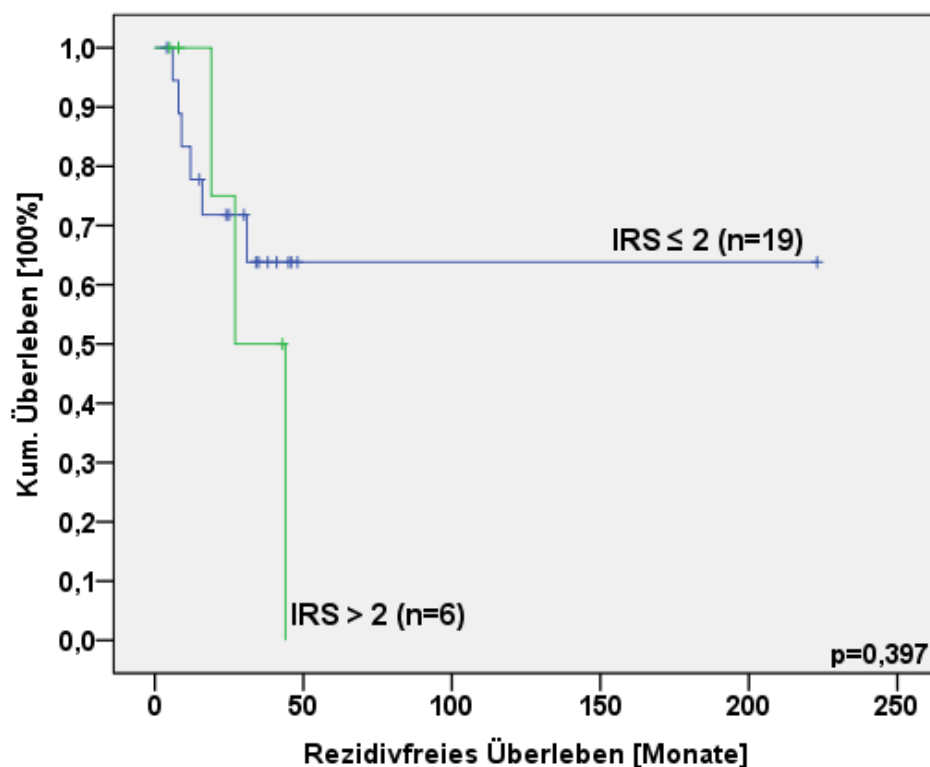


Abbildung 3.17: Die Kaplan-Meier-Analyse ergab für die zytoplasmatische ER- β -Expression keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben.

3.4.3 PgR

In der univariaten Überlebensanalyse der kontinuierlichen mRNA-Daten mit dem Cox-Regressionsmodell zeigten sich keine signifikanten Korrelationen der PgR-mRNA-Expression mit dem rezidivfreien Überleben ($p=0,954$; HR=1,006; 95% CI: 0,671-2,127).

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich für die mRNA-Expression des PgR kein signifikanter Unterschied im Überleben. Sowohl unter Verwendung des aus

Überlebensdaten-ermittelten ($p=0,535$; Log-Rank-Test), als auch aus Gauß'schen Verteilungen ermittelte Cutoff ($p=0,564$; Log-Rank-Test) fanden sich keine statistisch signifikante Ergebnisse. Die Anwendung des Referenz-Cutoff des Mammakarzinoms konnte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied aufweisen ($p=0,51$; Log-Rank-Test).

3.4.4 AR

In der univariaten Überlebensanalyse der kontinuierlichen mRNA-Daten mit dem Cox-Regressionsmodell zeigten sich keine signifikanten Korrelationen der AR-mRNA-Expression mit dem rezidivfreien Überleben ($p=0,27$; HR=0,583; 95% CI: 0,224-1,52).

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich für die mRNA-Expression des AR kein Unterschied im Überleben. Es ergaben sich signifikanten Unterschiede in Hinblick auf den aus Überlebensdaten-ermittelten ($p=0,290$; Log-Rank-Test), als auch den aus Gauß'schen Verteilungen ermittelten Cutoff ($p=0,314$; Log-Rank-Test).

3.4.5 PARP-1

In der univariaten Überlebensanalyse der kontinuierlichen mRNA-Daten mit dem Cox-Regressionsmodell zeigten sich keine signifikanten Korrelationen der PARP-1-mRNA-Expression mit dem rezidivfreien Überleben ($p=0,564$; HR=1,194; 95% CI: 0,833-1,214).

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich bei Verwendung des aus den Gauß'schen Verteilungen ermittelten Cutoffs ($p=0,746$; Log-Rank-Test) kein signifikanter Unterschied.

Es bestand jedoch ein signifikanter Unterschied bei Verwendung des Cutoff-Werts ($\Delta\Delta C_t$ von $<$ bzw. $>15,487$) aus den Überlebensdaten ($p=0,03$; Log-Rank-Test). Niedrige PARP-1-Expression ist mit einem verlängerten rezidivfreien Überleben assoziiert (siehe Abbildung 3.18).

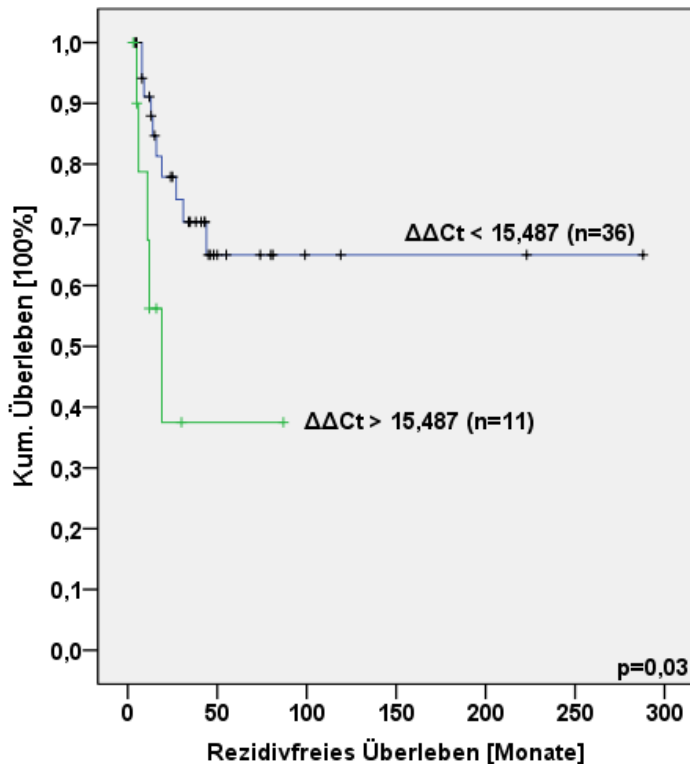


Abbildung 3.18: Niedrige PARP-1-Expression ist signifikant ($p=0,03$) mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert.

Der signifikante Unterschied im Überleben wurde multivariat im Rahmen einer Cox-Regressions-Analyse überprüft und bestätigt sich darin als unabhängiger Parameter ($p=0,003$; 95%-CI 1,878-24,573; HR 6,793). Als weiterer unabhängiger prognostischer Parameter bestätigte sich auch hier erneut die Subgruppe, das heißt Rezidivtumoren rezidivieren früher als Primären ($p=0,000$; 95%-CI 5,183-79,793; HR 20,337).

Die immunhistochemischen Daten für die nukleäre PARP-1-Expression zeigten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,426$; log-rank-Test) im rezidivfreien Überleben aufgeteilt nach Subgruppe (Primär- bzw. Rezidivtumor) und immunhistochemischem Expressionsprofil (IRS > 3 bzw. ≤ 3 , siehe Abbildung 3.19).

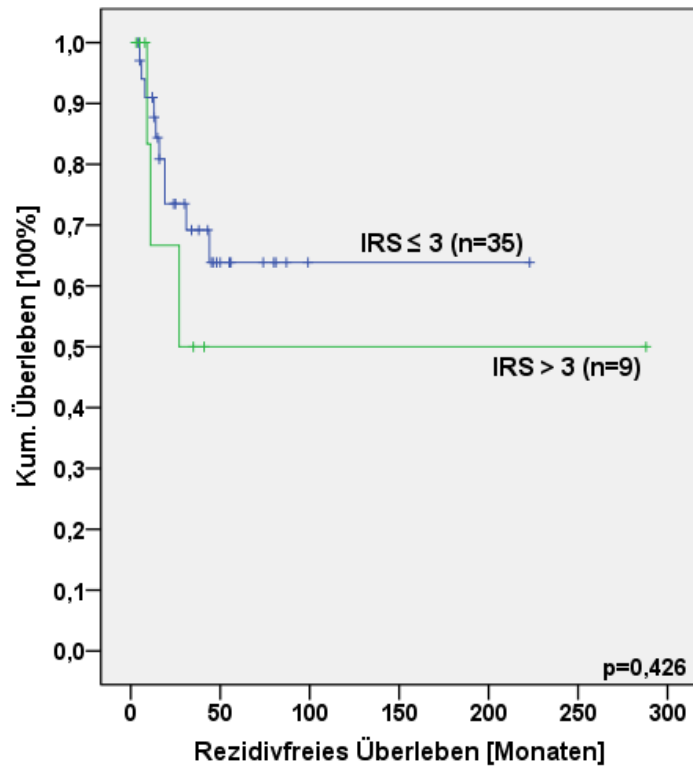


Abbildung 3.19: Die Kaplan-Meier-Analyse kann für nukleäre Expression von PARP-1 keinen signifikanten Unterschied im rezidivfreien Überleben nachweisen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Expression der Steroidhormonrezeptoren sowie der PARP-1 auf Protein- und RNA-Ebene sowie deren Einfluss auf die Prognose von Desmoidfibromatosen untersucht. Unterschiede im rezidivfreien Überleben ließen sich vor allem im Hinblick auf die Expression der PARP-1 sowie im direkten Vergleich zwischen Primär- und Rezidivtumor nachweisen. Die PARP-1 erwies sich in unserem Kollektiv als unabhängiger Prognosefaktor, wohingegen die Expression der Steroidhormonrezeptoren keine signifikanten Einflüsse auf das rezidivfreie Überleben zeigen konnten.

4.1 Östrogenrezeptoren als prognoserelevante Überlebensparameter

Auf Proteinebene wurde in dieser Arbeit keine nukleäre Expression des Östrogenrezeptor- α nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch eine zytoplasmatische Expression des Östrogenrezeptor- β , wenn auch nur in schwacher Ausprägung, bis zu einem maximalen IRS von 4. Eine nukleäre Expression des ER- β konnte nur in einem von 37 Fällen nachgewiesen werden (2,7%).

Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit denen anderer Arbeitsgruppen. Deyrup et al. [66] konnten in ihrer Untersuchung von 40 extraabdominellen Desmoidtumoren keine Expression des ER- α , jedoch zumindest eine „fokale“ nukleäre Expression des ER- β ausmachen. Die Arbeitsgruppe um Santos et al. [64] zeigte in 59 Desmoidtumoren ebenso keinerlei ER- α -Expression auf Proteinebene. Eine Untersuchung von sieben Desmoidtumoren durch Picariello et al. [103], 29 Desmoidtumoren durch Ishizuka et al. [29] und 80 Desmoidtumoren von Leithner et al. [63] brachte immunhistochemisch keinerlei ER- α -, jedoch erneut partielle nukleäre ER- β -Expression hervor.

Zusammenfassend erscheint eine Untersuchung des ER- α im Rahmen der diagnostischen Routine auf immunhistochemischer Ebene daher nicht sinnvoll. Kritisch muss die in dieser Arbeit fehlende nukleäre Expression des ER- β , welche zu erwarten gewesen wäre, eingeordnet werden. Des Weiteren erwies sich die - überwiegend schwache - zytoplasmatische Expression des ER- β als sehr heterogen und damit als eher unspezifisch. Andere Autoren (als Beispiel [29, 64]) benennen in ihren Publikationen die Lokalisation der ER- β -Färbung nicht, sodass Vergleiche zu vorliegender Arbeit schwierig sind.

Die Expression der beiden ER auf mRNA-Ebene korrelierte in dieser Arbeit statistisch nicht mit der Expression auf Protein-Ebene. Je nach gewähltem Cutoff zeigte sich entweder eine stärkere Expression von ER- α in etwa der Hälfte (51,7%) der untersuchten Proben oder aber eine nahezu komplette schwache bis fehlende Expression (93,3% bzw. 96,7%). Die Diskrepanz zwischen Protein- und mRNA-Ebene wurde ebenfalls in anderen Arbeiten beschrieben. Picariello et al. [103] wiesen in ihrem Kollektiv (n=7) bei fehlender immunhistochemischer Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR eine Expression der beiden ER nach, wobei das untersuchte Kollektiv eine geringe Stichprobenzahl aufwies. Andererseits konnten Ishizuka et al. [29] in ihrem Kollektiv keine Expression der beiden ER auf mRNA-Ebene zeigen (n=8). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich jedoch der ESR2 auf mRNA-Ebene in etwa 75% der Proben für beide Cutoffs (survival- und fit-of-mixture-Modell) positiv.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Untersuchung auf mRNA-Ebene eher, aber nicht obligat, eine positive Expression der ER zeigt. Dies kann einerseits an der Sensitivität und Spezifität der verfügbaren immunhistochemischen Antikörper für den ER- α liegen. Weiterhin könnten die teils positiven mRNA-Expressionen (insbesondere im geringen Expressionsbereich) Messartefakte sein, bspw. im Sinne von einer Messung der Expression von Nicht-Tumorzellen. In DF wird jedoch, im Vergleich mit bspw. dem Mammakarzinom, kein ER-exprimierendes Normalgewebe untersucht. Des Weiteren ist die reale Expression aufgrund der unterschiedlichen Cutoffs letzten Endes schwer vergleichbar.

Für Tumorgrößen im mittleren Größenbereich (hier definiert als Größe zwischen >50 und 100 mm) ließ sich eine signifikant stärkere Expression des ESR2 auf mRNA-Ebene nachweisen. Damit erscheint zumindest bei Patienten mit einer entsprechenden Tumorgröße eine Determinierung des ESR2-Rezeptorstatus auf Protein- oder mRNA-Ebene empfehlenswert. Möglicherweise könnten diese Patienten von einer antiöstrogenen Therapie profitieren. Unter antiöstrogener Therapie wurden sowohl verlängertes rezidivfreies Überleben, als auch Komplettremissionen beobachtet [30, 31].

In der Überlebensanalyse zeigte sich univariat, nicht aber multivariat, für zwei der drei definierten Cutoffs, dass Desmoidtumoren mit starker bzw. stärkerer Expression des ESR1 ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben aufweisen. Dies würde ebenfalls

den Einsatz antiöstrogener Therapieformen unterstützen, wobei hier die entsprechenden randomisierten, prospektiven klinischen Studien bisher noch ausstehen. Im multivariaten Cox-Regressionsmodell erwiesen sich Rezidivtumore als unabhängiger Parameter, welche signifikant früher erneut rezidivieren. Folglich empfehlen sich häufigere klinische Kontrollen bei Rezidivtumoren sowie die Überlegung eines individualisierten Therapieansatzes je nach Rezeptorexpression.

4.2 Der Progesteronrezeptor als prognoserelevanter Überlebensparameter

Auf Proteinebene konnte in dieser Arbeit keine nukleäre Expression des Progesteronrezeptors nachgewiesen werden. Andere Studien bestätigen das [63, 64], während Ishizuka et al. [29] in ihrem Kollektiv aus 27 Patienten jedoch zu etwa 25% mittels Immunhistochemie eine nukleäre Progesteron-Expression nachweisen konnten. Ishizuka et al. nutzten jedoch zwei, von der vorliegenden Arbeit abweichende, Antikörper (monoklonale Antikörper zweier PR-Isoformen (hPRa 2 und 7), NeoMarkers, Fremont, USA) [29]).

Es bestand keine Korrelation zwischen Protein- bzw. mRNA-Expression des PR. Die drei definierten mRNA-Cutoffs waren sehr heterogen. Folglich ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse in der Expression auf mRNA-Ebene. Die beiden Cutoffs aus dem Cutoff-Finder zeigten eine positive Expression von 85,0% bzw. 68,3% der untersuchten Proben unseres Kollektivs. Dahingegen waren bei Anwendung des Referenzcutoffs des Mammakarzinoms nur 6,6% der Desmoide PgR-positiv. Der Referenzcutoff des Mammakarzinoms ist numerisch jedoch deutlich höher. Die Anwendung von Cutoffs anderer Tumorentitäten kann hier kritisch diskutiert werden. Ishizuka et al. [29] zeigten in acht von acht (100%) Desmoiden mittels konventioneller PCR mit anschließender Gelelektrophorese die Expression des PgR. Acht Desmoidtumoren sind jedoch eine kleine Anzahl. Des Weiteren war die Methodik rein qualitativ ohne definierten Cutoff. Die Expression des PgR auf mRNA-Ebene ist widersprüchlich. Weitere Studien sind erforderlich.

In unserer Arbeit konnten wir keine signifikante Korrelation zwischen der PR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern feststellen. Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Überlebensanalysen, auch nicht im direkten Vergleich zwischen Primarius und Rezidivtumor. Aufgrund der Ergebnisse in unserem Kollektiv

erscheint eine Bestimmung der Expression des PR weder auf Protein-, noch auf mRNA-Ebene derzeit diagnostisch empfehlenswert.

4.3 Der Androgenrezeptor als prognoserelevanter Überlebensparameter

In vorliegender Arbeit ergab sich auf Protein-Ebene immunhistochemisch nahezu (97,0%) keine Expression des Androgenrezeptors. Dies ist tendenziell vergleichbar mit den Ergebnissen von Leithner et al. [63], in welchen 7,5% der Desmoide (n=80) den AR exprimieren. Das Kollektiv von Ishizuka et al. [29] hingegen zeigte bei 14 von 27 Proben (51,9%) eine positive Expression des AR. Dieser deutliche Unterschied ist möglicherweise auf eine stärkere Spezifität des jeweils verwendeten Antikörpers zurückzuführen.

Die Expression des AR auf Protein- und mRNA-Ebene korrelierte in dieser Arbeit nicht miteinander. Auf mRNA-Ebene zeigte sich in Verwendung der beiden Cutoffs aus dem Cutoff-Finder eine positive Expression des AR (58,3% im survival- bzw. 43,3% im fit-of-mixture-Modell). In vorliegender Arbeit wurde in nahezu allen Proben AR-mRNA nachgewiesen. Erneut ergibt sich also eine Diskrepanz zwischen Protein- und mRNA-Expression.

In einer mRNA-Untersuchung von Hong et al. [77] zeigte sich eine Expression des AR in 24 von 24 Proben. Ein Cutoff wurde jedoch nicht definiert. Der Expressionsunterschied im Vergleich zu vorliegender Arbeit könnte am verwendeten RNA-Primer liegen.

Die Höhe der mRNA-Expression des AR korrelierte in vorliegender Arbeit signifikant mit einzelnen klinisch-pathologischen Faktoren. Tumoren mit einer Größe von 51 bis 100 mm, Primärtumore und intraabdominelle Desmoide zeigten eine signifikant höhere Expression.

In unserem Kollektiv konnten keine signifikanten Einflüsse des Androgenrezeptors auf das rezidivfreie Überleben in der Kaplan-Meier-Analyse (log-rank-Test) festgestellt werden.

4.4 PARP-1 als prognoserelevanter Überlebensparameter

In dieser Arbeit konnte auf Protein-Ebene keine zytoplasmatische PARP-1-Expression nachgewiesen werden. Nukleär zeigten jedoch 57 von 58 (98,3%) Proben eine positive Expression mit einem IRS von 1 bis maximal 6.

Die Expression der PARP-1 auf Protein- und mRNA-Ebene korrelierte erneut nicht. Die beiden sehr unterschiedlichen Cutoffs aus dem Cutoff-Finder zeigten eine höhergradige Expression in 68,3% bzw. 18,3% der Fälle. Es wiesen jedoch alle Proben eine positive mRNA-Expression auf. Vergleichsarbeiten existieren bisher weder für die Protein- noch für die mRNA-Expression dieser histologischen Tumorentität.

In der uni- und multivariaten Überlebensanalyse zeigte sich, dass eine geringere bzw. fehlende PARP-1-Expression mit einem signifikant ($p=0,03$; $p=0,003$) längeren rezidivfreien Überleben assoziiert ist. Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse könnten randomisierte klinische Studien mit PARP-Inhibitoren auch bei dieser histologischen Entität mögliche neue therapeutische Indikationen aufzeigen.

Des Weiteren zeigte sich erneut im multivariaten Cox-Regressionsmodell, dass Rezidivtumoren früher als Primarien wiederholt rezidivieren, was die Notwendigkeit von häufigeren Nachkontrollen verdeutlicht.

4.5 Ki-67

Die in dieser Arbeit digital ermittelten Expressionswerte für Ki-67 ähneln weitgehend den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen. Leithner et al. beschrieben in ihrem Kollektiv mittels lichtmikroskopischer Auswertung Expressionswerte von fünf bis zehn Prozent ($n=80$) [63]. Lin et al. nennen einen lichtmikroskopisch ermittelten Expressionsmittelwert von $3,2 \pm 1,26\%$ ($n=20$) [104], was nahe dem Mittelwert dieser Arbeit liegt. Andere Arbeiten zeigen deutlich geringere Expressionswerte [42, 105]. Ferenc et al. zeigen beispielsweise einen ebenfalls lichtmikroskopisch evaluierten Expressionsmittelwert von nur $0,82\%$ ($n=15$) [106]. Ki-67 ist schwer präzise quantifizierbar. Die heterogenen Expressionswerte lassen sich möglicherweise durch unterschiedliche Auswertungsmethoden erklären. In Tumoren wie beispielsweise dem Mammakarzinom [107] oder auch in Neuroendokrinen Tumoren [108] zeigen sich Ki-67 „hot spots“, Areale verstärkter Proliferation, welche genaues Auszählen erschweren können.

Die Bedeutung von Ki-67 im Kontext der Desmoidfibromatose ist weiterhin unklar. Brueckl et al. konnten jedoch in ihrer Arbeit zeigen, dass eine geringe Ki-67-Proliferationsrate mit einem längerem krankheitsfreien Überleben einhergeht [109].

4.6 Limitationen

Aggressive Desmoidfibromatosen sind seltene Tumorentitäten. Die hier untersuchte Anzahl von 69 Aggressiven Desmoidfibromatosen stellt im Vergleich zu anderen Untersuchungen dieser Entität ein größeres Kollektiv dar. Es wurden Gewebeblöcke von Tumoren untersucht, welche innerhalb einer Zeitspanne von zehn Jahren (2005 bis 2015) in einem pathologischen Institut diagnostiziert wurden. Todesdaten und Angaben zu Rezidiven waren häufig nicht vorhanden, was unter anderem an dem meist benignen Verlauf der Desmoidtumoren liegt. Rezidive führen nicht obligat zu einer Wiedervorstellung von Patientenseite aus. Weiterhin ist das Einzugsgebiet der Patienten für entsprechende Tumore sehr groß, so dass eine Nachbeobachtung im Rahmen einer Tumornachsorge oft außerhalb der Charité in Wohnortnähe stattfindet. Aus diesen Gründen entfallen einzelne Rezidivtumoren aus der Nachbeobachtungszeit.

Das vorliegende Patientenkollektiv von 69 Patienten und -innen reichte aufgrund der Fallzahl teilweise nicht für ein adäquates Signifikanzniveau in statistischen Auswertungen aus. Tumorproben mit einem Tumoranteil von unter 30 Prozent wurden nicht in die mRNA-Analyse eingeschlossen, was zu einer weiteren Minimierung der zur Verfügung stehenden Proben beitrug.

Bzgl. der Analyse der mRNA-Daten wurde auf den Cutoff-Finder [102] zurückgegriffen, da bisher keine etablierten Cutoffs für Desmoidtumoren existieren. Der Cutoff-Finder ist eine hilfreiche Methode, welche mittels statistischen Analysen Cutoffs generiert. Diese Cutoffs haben jedoch nur explorativen Charakter. Des Weiteren benötigt der Cutoff-Finder eine ausreichend hohe Anzahl an Daten, um präzise Cutoffs angeben zu können. Ein Kollektiv von 69 Patienten führt aufgrund der zugrundeliegenden Methode zu teils stark divergenten Cutoffs. Heterogene Cutoffs führen zu variabler Bewertung der tatsächlichen Expression, was die Verlässlichkeit der Auswertung einschränkt. Da die Cutoffs für den ESR1 und PgR in unserer Arbeitsgruppe bereits für das Mammakarzinom angewandt wurden [101], wurden sie auf die vorliegende Arbeit übertragen.

Für alle untersuchten Gene fehlte die Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression. Dieses Phänomen ist bekannt, muss jedoch in weiteren Arbeiten untersucht werden. Die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper könnten nicht spezifisch genug sein. Auf der anderen Seite ist die PCR ein störanfälliges System, was bereits auf kleinste Kontaminationen empfindlich reagiert. So bestanden die verwendeten mRNA-Proben (wie in den meisten molekularpathologischen Untersuchungen) nicht ausschließlich aus Tumorzellen. Eingeschlossen wurden Proben ab einen Tumorgehalt von mindestens 30 Prozent. Es befanden sich folglich ebenfalls nicht-tumoröse (Stroma, Entzündungszellen, u.a.) Zellen in den zu analysierenden Proben. Dies könnte die mRNA-Ergebnisse mit beeinflusst haben. Letztlich ist die PCR auch von den verwendeten Primern abhängig. Andere Primer führen möglicherweise zu abweichenden Resultaten.

4.7 Ausblick

Um weiterhin Fortschritte in der Therapie von Desmoidfibromatosen zu erzielen, sind größer angelegte Studien erforderlich. Das vorliegende Kollektiv könnte für weitere retrospektive Analysen im Laufe der nächsten Jahre um weitere DF erweitert werden, um die statistische Aussagefähigkeit zu erhöhen. Dies würde die Möglichkeit bieten, weitere Forschungen mit dem Ziel validerer Cutoffs für mRNA-Analysen von Desmoidtumoren durchzuführen. Darüber hinaus könnte ein erweitertes Kollektiv zusätzliche neue therapierelevante Marker herausstellen.

Der PARP-Inhibitor Olaparib zeigte in experimentellen [110] und klinischen [111] Studien Wirkung bei Ewing-Sarkomen. Ewing-Sarkome gelten jedoch im Vergleich zu Desmoidfibromatosen als genetisch deutlich instabiler. Die charakteristischen EWSR1-FLI1 und –ERG-Fusionsgene zeigen Wechselwirkung mit der PARP-1 [112]. In Desmoidfibromatosen wurden experimentell noch keine Interaktionen mit der PARP-1 untersucht.

Die chirurgische Therapie ist und bleibt nach wie vor der relevanteste Teil innerhalb der Behandlung von Desmoidfibromatosen. Weitere personalisierte Therapien sind insbesondere in der Behandlung von Rezidivtumoren erstrebenswert. Der in ersten Untersuchungen vielversprechende β -Catenin-Signalweg bedarf der weiteren Abklärung von Zielstrukturen. Die in dieser Arbeit nachgewiesene prognostische Relevanz der PARP-1 sollte in weiteren, vorrangig prospektiven Studien mit größeren Patientenkollektiven weiter untersucht werden.

5 Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous polyposis coli (Adenomatöse Polyposis des Colons)
AR	Androgenrezeptor(en)
BRCA	BReast CAncer (Brustkrebs)
CC1	Cell Conditioning Solution 1
COX-1, -2	Cyclooxygenase-1, -2
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung)
CCCC	Charité Comprehensive Cancer Center
CTNNB1	Beta-Catenin 1
C _T	Cycle of threshold (Schwellen-Zyklus)
DF	Desmoidfibromatose(n)
DKK1	Dickkopf 1
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonucleinsäure(n)
DTRF	Desmoid Tumor Research Foundation
ERG	Erythroblast transformation-specific related gene
ER	Östrogen-Rezeptor(en)
ER- α , - β	Östrogen-Rezeptor(en) α bzw. β (bzgl. der immunhistochemischen Analyse)
ESR1, ESR2	Östrogen-Rezeptor(en) 1 bzw. 2 (bzgl. der mRNA-Analyse)
EWSR 1	Ewing sarcoma breakpoint region 1
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FLI1	Friend leukemia integration 1 transcription factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
Ki-67	Kiel-67
LABO	Landesamt für Bürger- und Ordnungsangelegenheiten
LCS	Liquid Coverslip
M.	Musculus (Muskel)
MRT	Magnetresonanztomographie
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PARP	Poly Adenosindiphosphat Ribose Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PgR	Progesteronrezeptor(en) (bzgl. der mRNA-Analyse)
PR	Progesteronrezeptor(en) (bzgl. der immunhistochemischen Analyse)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
R	Resektion(ssstatus)
(m)RNA	(messenger)Ribonukleinsäure
SARC	Sarcoma Alliance for Research through Collaboration
SERD	Selektive(r)- Östrogen-Rezeptor-Downregulator(en)
SERM	Selektive(r)- Östrogen-Rezeptor-Modulator(en)
SPRM	Selektive(r)- Progesteron-Rezeptor-Modulator(en)
TNM	Tumor Nodes Metastasis
U/min	Umdrehung(en)/Minute
vs.	versus, gegenüber
Wnt	Wingless integration site family member 1

6 Literaturverzeichnis

[1] Reitamo J. J., Hayry P., Nykyri E. and Saxen E. The desmoid tumor. I. Incidence, sex-, age- and anatomical distribution in the Finnish population. *Am J Clin Pathol.* 1982: 665-673.

[2] van Broekhoven D. L., Grunhagen D. J., den Bakker M. A., van Dalen T. and Verhoef C. Time trends in the incidence and treatment of extra-abdominal and abdominal aggressive fibromatosis: a population-based study. *Ann Surg Oncol.* 2015: 2817-2823.

[3] Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. (Letzter Zugang am 10. April 2017 über http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html).

[4] Lopez R., Kemalyan N., Moseley H. S., Dennis D. and Vetto R. M. Problems in diagnosis and management of desmoid tumors. *Am J Surg.* 1990: 450-453.

[5] C. Litchman. *Desmoid tumors.* New York. Springer. 2012: p. 10, 34.

[6] Lacayo E. A., Glastonbury C. M., Hoang J. K., Magliocca K. R., Hill K. L. and Hudgins P. A. Deep Neck Fibromatosis After Discectomy and Cervical Fusion: Case Series and Review of the Literature. *AJR Am J Roentgenol.* 2016: 1-5.

[7] Ali R., Parthiban N. and O'Dwyer T. Desmoid fibromatosis of submandibular region. *J Surg Tech Case Rep.* 2014: 21-25.

[8] Bhattacharya B., Dilworth H. P., Iacobuzio-Donahue C., Ricci F., Weber K., Furlong M. A., Fisher C. and Montgomery E. Nuclear beta-catenin expression distinguishes deep fibromatosis from other benign and malignant fibroblastic and myofibroblastic lesions. *Am J Surg Pathol.* 2005: 653-659.

[9] Lazar A. J., Tuvín D., Hajibashi S., Habeeb S., Bolshakov S., Mayordomo-Aranda E., Warneke C. L., Lopez-Terrada D., Pollock R. E. and Lev D. Specific mutations in the

beta-catenin gene (CTNNB1) correlate with local recurrence in sporadic desmoid tumors. *Am J Pathol.* 2008: 1518-1527.

[10] Mills B. G., Frausto A. and Brien E. Cytokines associated with the pathophysiology of aggressive fibromatosis. *J Orthop Res.* 2000: 655-662.

[11] Kulaylat M. N., Karakousis C. P., Keaney C. M., McCorvey D., Bem J. and Ambrus Sr J. L. Desmoid tumour: a pleomorphic lesion. *Eur J Surg Oncol.* 1999: 487-497.

[12] Clark S. K. and Phillips R. K. Desmoids in familial adenomatous polyposis. *Br J Surg.* 1996: 1494-1504.

[13] Posner M. C., Shiu M. H., Newsome J. L., Hajdu S. I., Gaynor J. J. and Brennan M. F. The desmoid tumor. Not a benign disease. *Arch Surg.* 1989: 191-196.

[14] Shinagare A. B., Ramaiya N. H., Jagannathan J. P., Krajewski K. M., Giardino A. A., Butrynski J. E. and Raut C. P. A to Z of desmoid tumors. *AJR Am J Roentgenol.* 2011: W1008-1014.

[15] Zreik R. T. and Fritchie K. J. Morphologic Spectrum of Desmoid-Type Fibromatosis. *Am J Clin Pathol.* 2016: 332-340.

[16] Carlson J. W. and Fletcher C. D. Immunohistochemistry for beta-catenin in the differential diagnosis of spindle cell lesions: analysis of a series and review of the literature. *Histopathology.* 2007: 509-514.

[17] Le Guellec S., Soubeyran I., Rochaix P., Filleron T., Neuville A., Hostein I. and Coindre J. M. CTNNB1 mutation analysis is a useful tool for the diagnosis of desmoid tumors: a study of 260 desmoid tumors and 191 potential morphologic mimics. *Mod Pathol.* 2012: 1551-1558.

[18] Schmitz K. and Schildhaus H. U. [Molecular pathology of soft tissue tumors: Contribution to diagnosis and therapy prediction]. *Pathologe.* 2015: 126-136.

- [19] Aitken S. J., Presneau N., Kalimuthu S., Dileo P., Berisha F., Tirabosco R., Amary M. F. and Flanagan A. M. Next-generation sequencing is highly sensitive for the detection of beta-catenin mutations in desmoid-type fibromatoses. *Virchows Arch.* 2015: 203-210.
- [20] Otero S., Moskovic E. C., Strauss D. C., Benson C., Miah A. B., Thway K. and Messiou C. Desmoid-type fibromatosis. *Clin Radiol.* 2015: 1038-1045.
- [21] Lee J. C., Thomas J. M., Phillips S., Fisher C. and Moskovic E. Aggressive fibromatosis: MRI features with pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol.* 2006: 247-254.
- [22] Shields C. J., Winter D. C., Kirwan W. O. and Redmond H. P. Desmoid tumours. *Eur J Surg Oncol.* 2001: 701-706.
- [23] Tryphonopoulos P., Wepler D., Levi D. M., Nishida S., Madariaga J. R., Kato T., Mittal N., Moon J., Selvaggi G., Esquenazi V., Cantwell P., Ruiz P., Miller J. and Tzakis A. G. Transplantation for the treatment of intra-abdominal fibromatosis. *Transplant Proc.* 2005: 1379-1380.
- [24] Chatzipetrou M. A., Tzakis A. G., Pinna A. D., Kato T., Misiakos E. P., Tsaroucha A. K., Wepler D., Ruiz P., Berho M., Fishbein T., Conn H. O. and Ricordi C. Intestinal transplantation for the treatment of desmoid tumors associated with familial adenomatous polyposis. *Surgery.* 2001: 277-281.
- [25] Wang Y. F., Guo W., Sun K. K., Yang R. L., Tang X. D., Ji T. and Tang S. Postoperative recurrence of desmoid tumors: clinical and pathological perspectives. *World J Surg Oncol.* 2015: 26.
- [26] Mueller C., Croner R., Klein P., Grutzmann R. and Vassos N. Primary and recurrent sporadic desmoids: Prognostic factors influencing recurrence-free survival after complete gross resection. *Int J Surg.* 2016: 63-70.
- [27] Duteille F., Dautel G. and Sommelet D. Desmoid tumours of the hand. *J Hand Surg Br.* 1999: 628-630.

- [28] Constantinidou A., Jones R. L., Scurr M., Al-Muderis O. and Judson I. Advanced aggressive fibromatosis: Effective palliation with chemotherapy. *Acta Oncol.* 2011: 455-461.
- [29] Ishizuka M., Hatori M., Dohi O., Suzuki T., Miki Y., Tazawa C., Sasano H. and Kokubun S. Expression profiles of sex steroid receptors in desmoid tumors. *Tohoku J Exp Med.* 2006: 189-198.
- [30] Brooks M. D., Ebbs S. R., Colletta A. A. and Baum M. Desmoid tumours treated with triphenylethylenes. *Eur J Cancer.* 1992: 1014-1018.
- [31] Hansmann A., Adolph C., Vogel T., Unger A. and Moeslein G. High-dose tamoxifen and sulindac as first-line treatment for desmoid tumors. *Cancer.* 2004: 612-620.
- [32] Janinis J., Patriki M., Vini L., Aravantinos G. and Whelan J. S. The pharmacological treatment of aggressive fibromatosis: a systematic review. *Ann Oncol.* 2003: 181-190.
- [33] Heinrich M. C., McArthur G. A., Demetri G. D., Joensuu H., Bono P., Herrmann R., Hirte H., Cresta S., Koslin D. B., Corless C. L., Dirnhofer S., van Oosterom A. T., Nikolova Z., Dimitrijevic S. and Fletcher J. A. Clinical and molecular studies of the effect of imatinib on advanced aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *J Clin Oncol.* 2006: 1195-1203.
- [34] Kasper B., Gruenwald V., Reichardt P., Bauer S., Rauch G., Limprecht R., Sommer M., Dimitrakopoulou-Strauss A., Pilz L., Haller F. and Hohenberger P. Imatinib induces sustained progression arrest in RECIST progressive desmoid tumours: Final results of a phase II study of the German Interdisciplinary Sarcoma Group (GISG). *Eur J Cancer.* 2017: 60-67.
- [35] Szucs Z., Messiou C., Wong H. H., Hatcher H., Miah A., Zaidi S., van der Graaf W. T., Judson I., Jones R. L. and Benson C. Pazopanib, a promising option for the treatment of aggressive fibromatosis. *Anticancer Drugs.* 2017: 421-426.
- [36] Anastas J. N. and Moon R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013: 11-26.

- [37] Guadagnolo B. A., Zagars G. K. and Ballo M. T. Long-term outcomes for desmoid tumors treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008: 441-447.
- [38] Zippel D. B. and Temple W. J. When is a neoplasm not a neoplasm? When it is a desmoid. *J Surg Oncol.* 2007: 190-191.
- [39] Park J. S., Nakache Y. P., Katz J., Boutin R. D., Steffner R. J., Monjazeb A. M. and Canter R. J. Conservative management of desmoid tumors is safe and effective. *J Surg Res.* 2016: 115-120.
- [40] Mezhir J. J. The desmoid tumor: still an enigma. *J Surg Res.* 2012: 46-48.
- [41] Weiss A. J. and Lackman R. D. Low-dose chemotherapy of desmoid tumors. *Cancer.* 1989: 1192-1194.
- [42] Woltsche N., Gilg M. M., Fraissler L., Liegl-Atzwanger B., Beham A., Lackner H., Benesch M. and Leithner A. Is wide resection obsolete for desmoid tumors in children and adolescents? Evaluation of histological margins, immunohistochemical markers, and review of literature. *Pediatr Hematol Oncol.* 2015: 60-69.
- [43] Merchant N. B., Lewis J. J., Woodruff J. M., Leung D. H. and Brennan M. F. Extremity and trunk desmoid tumors: a multifactorial analysis of outcome. *Cancer.* 1999: 2045-2052.
- [44] Pignatti G., Barbanti-Brodano G., Ferrari D., Gherlinzoni F., Bertoni F., Bacchini P., Barbieri E., Giunti A. and Campanacci M. Extraabdominal desmoid tumor. A study of 83 cases. *Clin Orthop Relat Res.* 2000: 207-213.
- [45] Sorensen A., Keller J., Nielsen O. S. and Jensen O. M. Treatment of aggressive fibromatosis: a retrospective study of 72 patients followed for 1-27 years. *Acta Orthop Scand.* 2002: 213-219.
- [46] Corbel L., Souissi M., Chretien Y. and Dufour B. [Desmoid tumor of the mesentery. An uncommon cause of ureteral obstruction]. *J Radiol.* 1992: 669-672.

- [47] Yoon P. D., Ahmadi N., Strahan S. and Wang A. Spontaneous ureteric rupture secondary to an invasive desmoid tumour. *Int J Surg Case Rep.* 2014: 944-947.
- [48] Kersting S., Herbst H., Senninger N. and Mittelkötter U. [Intra-abdominal fibromatosis after appendectomy as cause for ileus]. *Zentralbl Chir.* 2004: 317-320.
- [49] SOS Desmoid. (Letzter Zugang am 19. März 2016 über www.sos-desmoid.de).
- [50] Desmoid Tumor Research Foundation. (Letzter Zugang am 19. März 2016 über <http://www.dtrf.org/index.php/about-us/about-the-foundation.html>).
- [51] Sarcoma Alliance for Research through Collaboration. (Letzter Zugang am 19. März 2016 über <http://www.sarctrials.org/>).
- [52] Püschel G.P. Kühn H., Kietzmann T., Höhne W. Taschenlehrbuch Biochemie. Stuttgart. Thieme. 2011: p. 607-609.
- [53] Aktories K. Förstermann U., Hofmann F.B., Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. 2013: p. 673-674.
- [54] Razavi P., Pike M. C., Horn-Ross P. L., Templeman C., Bernstein L. and Ursin G. Long-term postmenopausal hormone therapy and endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010: 475-483.
- [55] Sunderland M. C. and Osborne C. K. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol.* 1991: 1283-1297.
- [56] Robertson J. F., Llombart-Cussac A., Rolski J., Feltl D., Dewar J., Macpherson E., Lindemann J. and Ellis M. J. Activity of fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg as first-line treatment for advanced breast cancer: results from the FIRST study. *J Clin Oncol.* 2009: 4530-4535.
- [57] Jacobsen B. M. and Horwitz K. B. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol.* 2012: 18-29.

[58] Petersen S. L., Intlekofer K. A., Moura-Conlon P. J., Brewer D. N., Del Pino Sans J. and Lopez J. A. Novel progesterone receptors: neural localization and possible functions. *Front Neurosci.* 2013: 164.

[59] Miller K. D., Althouse S. K., Nabell L., Rugo H., Carey L., Kimmick G., Jones D. R., Merino M. J. and Steeg P. S. A phase II study of medroxyprogesterone acetate in patients with hormone receptor negative metastatic breast cancer: translational breast cancer research consortium trial 007. *Breast Cancer Res Treat.* 2014: 99-106.

[60] Tan M. H., Li J., Xu H. E., Melcher K. and Yong E. L. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015: 3-23.

[61] de Bono J. S., Logothetis C. J., Molina A., Fizazi K., North S., Chu L., Chi K. N., Jones R. J., Goodman O. B., Jr., Saad F., Staffurth J. N., Mainwaring P., Harland S., Flaig T. W., Hutson T. E., Cheng T., Patterson H., Hainsworth J. D., Ryan C. J., Sternberg C. N., Ellard S. L., Flechon A., Saleh M., Scholz M., Efstathiou E., Zivi A., Bianchini D., Loriot Y., Chieffo N., Kheoh T., Haqq C. M., Scher H. I. and Investigators Cou-Aa-. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2011: 1995-2005.

[62] Zouboulis C. C. and Rabe T. [Hormonal antiandrogens in acne treatment]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010: S60-74.

[63] Leithner A., Gapp M., Radl R., Pascher A., Krippel P., Leithner K., Windhager R. and Beham A. Immunohistochemical analysis of desmoid tumours. *J Clin Pathol.* 2005: 1152-1156.

[64] Santos G. A., Cunha I. W., Rocha R. M., Mello C. A., Guimaraes G. C., Fregnani J. H. and Lopes A. Evaluation of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, progesterone receptor, and cKIT expression in desmoids tumors and their role in determining treatment options. *Biosci Trends.* 2010: 25-30.

[65] Mignemi N. A., Itani D. M., Fasig J. H., Keedy V. L., Hande K. R., Whited B. W., Homlar K. C., Correa H., Coffin C. M., Black J. O., Yi Y., Halpern J. L., Holt G. E., Schwartz H. S., Schoenecker J. G. and Cates J. M. Signal transduction pathway

analysis in desmoid-type fibromatosis: transforming growth factor-beta, COX2 and sex steroid receptors. *Cancer Sci.* 2012: 2173-2180.

[66] Deyrup A. T., Tretiakova M. and Montag A. G. Estrogen receptor-beta expression in extraabdominal fibromatoses: an analysis of 40 cases. *Cancer.* 2006: 208-213.

[67] Fong Y., Rosen P. P. and Brennan M. F. Multifocal desmoids. *Surgery.* 1993: 902-906.

[68] Rider V., Isuzugawa K., Twarog M., Jones S., Cameron B., Imakawa K. and Fang J. Progesterone initiates Wnt-beta-catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal cells. *J Endocrinol.* 2006: 537-548.

[69] Rider V., Talbott A., Bhusri A., Krumsich Z., Foster S., Wormington J. and Kimler B. Wingless (WNT) signaling is a progesterone target for rat uterine stromal cell proliferation. *J Endocrinol.* 2016:

[70] Tulac S., Overgaard M. T., Hamilton A. E., Jumbe N. L., Suchanek E. and Giudice L. C. Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006: 1453-1461.

[71] Wang Y., Hanifi-Moghaddam P., Hanekamp E. E., Kloosterboer H. J., Franken P., Veldscholte J., van Doorn H. C., Ewing P. C., Kim J. J., Grootegoed J. A., Burger C. W., Fodde R. and Blok L. J. Progesterone inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2009: 5784-5793.

[72] Beyer C., Schramm A., Akhmetshina A., Dees C., Kireva T., Gelse K., Sonnylal S., de Crombrughe B., Taketo M. M., Distler O., Schett G. and Distler J. H. beta-catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2012: 761-767.

[73] Baarsma H. A., Spanjer A. I., Haitsma G., Engelbertink L. H., Meurs H., Jonker M. R., Timens W., Postma D. S., Kerstjens H. A. and Gosens R. Activation of WNT/beta-

catenin signaling in pulmonary fibroblasts by TGF-beta(1) is increased in chronic obstructive pulmonary disease. PLoS One. 2011: e25450.

[74] He W., Dai C., Li Y., Zeng G., Monga S. P. and Liu Y. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2009: 765-776.

[75] Lips D. J., Barker N., Clevers H. and Hennipman A. The role of APC and beta-catenin in the aetiology of aggressive fibromatosis (desmoid tumors). Eur J Surg Oncol. 2009: 3-10.

[76] Yin X., Wang X., Hu X., Chen Y., Zeng K. and Zhang H. ERbeta induces the differentiation of cultured osteoblasts by both Wnt/beta-catenin signaling pathway and estrogen signaling pathways. Exp Cell Res. 2015: 107-114.

[77] Hong H., Nadesan P., Poon R. and Alman B. A. Testosterone regulates cell proliferation in aggressive fibromatosis (desmoid tumour). Br J Cancer. 2011: 1452-1458.

[78] Halevy A., Samuk I., Halpern Z., Copel L., Sandbank J. and Ziv Y. Mifepristone (RU486), a pure antiprogestosterone drug, in combination with vinblastine for the treatment of progesterone receptor-positive desmoid tumor. Tech Coloproctol. 2010: 265-267.

[79] Waddell W. R. and Kirsch W. M. Testolactone, sulindac, warfarin, and vitamin K1 for unresectable desmoid tumors. Am J Surg. 1991: 416-421.

[80] Bauernhofer T., Stoger H., Schmid M., Smola M., Gurtl-Lackner B., Hofler G., Ranner G., Reisinger E. and Samonigg H. Sequential treatment of recurrent mesenteric desmoid tumor. Cancer. 1996: 1061-1065.

[81] Wilcken N. and Tattersall M. H. Endocrine therapy for desmoid tumors. Cancer. 1991: 1384-1388.

[82] Javle M. and Curtin N. J. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. Br J Cancer. 2011: 1114-1122.

- [83] Ratnam K. and Low J. A. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res.* 2007: 1383-1388.
- [84] Patel A. and Kaufmann S. H. Development of PARP inhibitors: an unfinished story. *Oncology (Williston Park).* 2010: 66, 68.
- [85] Wooster R. and Weber B. L. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003: 2339-2347.
- [86] Lord C. J. and Ashworth A. Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2008: 363-369.
- [87] Bryant H. E., Schultz N., Thomas H. D., Parker K. M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N. J. and Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* 2005: 913-917.
- [88] PARP-Inhibitoren als neue Option. (Letzter Zugang am 11. April 2017 über <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=55260>).
- [89] Audeh M. W., Carmichael J., Penson R. T., Friedlander M., Powell B., Bell-McGuinn K. M., Scott C., Weitzel J. N., Oaknin A., Loman N., Lu K., Schmutzler R. K., Matulonis U., Wickens M. and Tutt A. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010: 245-251.
- [90] Swisher E. M., Lin K. K., Oza A. M., Scott C. L., Giordano H., Sun J., Konecny G. E., Coleman R. L., Tinker A. V., O'Malley D. M., Kristeleit R. S., Ma L., Bell-McGuinn K. M., Brenton J. D., Cragun J. M., Oaknin A., Ray-Coquard I., Harrell M. I., Mann E., Kaufmann S. H., Floquet A., Leary A., Harding T. C., Goble S., Maloney L., Isaacson J., Allen A. R., Rolfe L., Yelensky R., Raponi M. and McNeish I. A. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017: 75-87.
- [91] Scott C. L., Swisher E. M. and Kaufmann S. H. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development. *J Clin Oncol.* 2015: 1397-1406.

- [92] Martin-Oliva D., Aguilar-Quesada R., O'Valle F., Munoz-Gamez J. A., Martinez-Romero R., Garcia Del Moral R., Ruiz de Almodovar J. M., Villuendas R., Piris M. A. and Oliver F. J. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2006: 5744-5756.
- [93] Vormoor B. and Curtin N. J. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in Ewing sarcoma. *Curr Opin Oncol.* 2014: 428-433.
- [94] Lee H. J., Yoon C., Schmidt B., Park D. J., Zhang A. Y., Erkizan H. V., Toretzky J. A., Kirsch D. G. and Yoon S. S. Combining PARP-1 inhibition and radiation in Ewing sarcoma results in lethal DNA damage. *Mol Cancer Ther.* 2013: 2591-2600.
- [95] Irshad S., Ashworth A. and Tutt A. Therapeutic potential of PARP inhibitors for metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011: 1243-1251.
- [96] Chen A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chin J Cancer.* 2011: 463-471.
- [97] Wienert S., Heim D., Kotani M., Lindequist B., Stenzinger A., Ishii M., Hufnagl P., Beil M., Dietel M., Denkert C. and Klauschen F. CognitionMaster: an object-based image analysis framework. *Diagn Pathol.* 2013: 34.
- [98] Klauschen F., Wienert S., Schmitt W. D., Loibl S., Gerber B., Blohmer J. U., Huober J., Rudiger T., Erbstosser E., Mehta K., Lederer B., Dietel M., Denkert C. and von Minckwitz G. Standardized Ki67 Diagnostics Using Automated Scoring--Clinical Validation in the GeparTrio Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res.* 2015: 3651-3657.
- [99] Remmele W. and Stegner H. E. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe.* 1987: 138-140.
- [100] Bohmann K., Hennig G., Rogel U., Poremba C., Mueller B. M., Fritz P., Stoerckel S. and Schaefer K. L. RNA extraction from archival formalin-fixed paraffin-embedded

tissue: a comparison of manual, semiautomated, and fully automated purification methods. *Clin Chem*. 2009: 1719-1727.

[101] Muller B. M., Kronenwett R., Hennig G., Euting H., Weber K., Bohmann K., Weichert W., Altmann G., Roth C., Winzer K. J., Kristiansen G., Petry C., Dietel M. and Denkert C. Quantitative determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 mRNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue--a new option for predictive biomarker assessment in breast cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2011: 1-10.

[102] Budczies J., Klauschen F., Sinn B. V., Gyorffy B., Schmitt W. D., Darb-Esfahani S. and Denkert C. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One*. 2012: e51862.

[103] Picariello L., Carbonell Sala S., Martinetti V., Gozzini A., Aragona P., Tognarini I., Paglierani M., Nesi G., Brandi M. L. and Tonelli F. A comparison of methods for the analysis of low abundance proteins in desmoid tumor cells. *Anal Biochem*. 2006: 205-212.

[104] Lin X. Y., Wang L., Zhang Y., Dai S. D. and Wang E. H. Variable Ki67 proliferative index in 65 cases of nodular fasciitis, compared with fibrosarcoma and fibromatosis. *Diagn Pathol*. 2013: 50.

[105] Gebert C., Harges J., Kersting C., August C., Supper H., Winkelmann W., Buerger H. and Gosheger G. Expression of beta-catenin and p53 are prognostic factors in deep aggressive fibromatosis. *Histopathology*. 2007: 491-497.

[106] Ferenc T., Kopczynski J., Stalinska L., Tosik D., Sidor M., Lopaczynska D., Kulig A., Dziki A. and Sygut J. Minichromosome maintenance (MCM) and AgNOR proteins expression in desmoid tumours: a tissue microarray analysis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010: 581-588.

[107] Jang M. H., Kim H. J., Chung Y. R., Lee Y. and Park S. Y. A comparison of Ki-67 counting methods in luminal Breast Cancer: The Average Method vs. the Hot Spot Method. *PLoS One*. 2017: e0172031.

[108] Reid M. D., Bagci P., Ohike N., Saka B., Erbarut Seven I., Dursun N., Balci S., Gucer H., Jang K. T., Tajiri T., Basturk O., Kong S. Y., Goodman M., Akkas G. and Adsay V. Calculation of the Ki67 index in pancreatic neuroendocrine tumors: a comparative analysis of four counting methodologies. *Mod Pathol.* 2015: 686-694.

[109] Brueckl W. M., Preuss J. M., Wein A., Jung A., Brabletz T., Pfluger R., Wiest G. H., Wolf C., Kirchner T., Hahn E. G., Hohenberger W. and Gunther K. Ki-67 expression and residual tumour (R) classification are associated with disease-free survival in desmoid tumour patients. *Anticancer Res.* 2001: 3615-3620.

[110] Brenner J. C., Feng F. Y., Han S., Patel S., Goyal S. V., Bou-Maroun L. M., Liu M., Lonigro R., Prensner J. R., Tomlins S. A. and Chinnaiyan A. M. PARP-1 inhibition as a targeted strategy to treat Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 2012: 1608-1613.

[111] Choy E., Butrynski J. E., Harmon D. C., Morgan J. A., George S., Wagner A. J., D'Adamo D., Cote G. M., Flamand Y., Benes C. H., Haber D. A., Baselga J. M. and Demetri G. D. Phase II study of olaparib in patients with refractory Ewing sarcoma following failure of standard chemotherapy. *BMC Cancer.* 2014: 813.

[112] van Maldegem A. M., Bovee J. V., Peterse E. F., Hogendoorn P. C. and Gelderblom H. Ewing sarcoma: The clinical relevance of the insulin-like growth factor 1 and the poly-ADP-ribose-polymerase pathway. *Eur J Cancer.* 2016: 171-180.

7 Anhang

7.1 Eidesstaatliche Versicherung

Ich, Konstantin Benno Bräutigam, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Expression der Hormonrezeptoren sowie von PARP-1 in Desmoidfibromatosen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

7.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.3 Publikationsliste

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Originalarbeit

Braeutigam KB et al. Hormone receptor and PARP-1 expression in Aggressive Fibromatosis. (Manuskript zum Zeitpunkt der Eröffnung des Promotionsverfahrens noch in Überarbeitung.)

Kongressbeitrag (Vortrag)

K. Bräutigam, C. Denkert, J. Lindner, S. Pahl, I. Melcher, A. Kunitz, P. Wust, M. Nebrig, A. Baur, B.M. Pfitzner, J. Budczies. Expression der Hormonrezeptoren und PARP-1 in Aggressiven Fibromatosen. 101. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Erlangen, 22.-24. Juni 2017.

7.4 Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Betreuerin, Frau PD Dr. med. Berit Pfitzner, danken, welche mir das vorliegende Thema anvertraut hat und welche mir stets mit kompetentem und hilfreichem Rat zur Seite stand. Mit ihrem Engagement und ihrer unerschöpflichen Hilfsbereitschaft gelang eine reibungslose Abwicklung dieses Forschungsprojekts.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Carsten Denkert, Arbeitsgruppenleiter, und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, hier insbesondere Frau Ines Koch, welche mich in herausragender Art und Weise in die Methodik dieser Arbeit einführte, bedanken. Dazu möchte ich mich bei Frau Dr. rer. medic. Dipl.-Biologin Judith Lindner für ihre Unterstützung bzgl. guter wissenschaftlicher Praxis, sowie bei Herrn Dr. rer. nat. Jan Budczies für seine Anmerkungen zu meinen statistischen Analysen bedanken.

Mein unermesslicher Dank gilt ebenso meiner Familie, die mich in jeder Lebenslage tatkräftig und mit Freude unterstützt.

Letztlich möchte ich mich auch bei meinen Freunden und Kommilitonen bedanken, die mich stets inspirierten und mir viele wunderbare Momente während meines Studiums ermöglichten.