

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

DISSERTATION

Evaluation der Expression und Interaktion von Hormonrezeptoren
und Zellzyklusproteinen in High-grade serösen Karzinomen
im Vergleich zu Endometriose-assoziierten Neoplasien des Ovars
sowie Evaluation neuer diagnostischer Marker für diese

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antonia Elsner, geb. Gahler
aus Neuruppin

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Klinik der Ovarialkarzinome	1
1.2 Morphologie und Molekularbiologie der Ovarialkarzinome	2
1.2.1 Das High-grade seröse Karzinom (HGSC).....	3
1.2.2 Endometriose-assoziierte Ovarialkarzinome	4
1.3 Rolle der Hormonrezeptoren in Ovarialkarzinomen	9
1.4 Rolle der Zellzyklusproteine in Ovarialkarzinomen.....	10
1.5 Hormon-Zellzyklus-Interaktionen und neue therapeutische Ansätze	11
1.6 Zielstellung der Arbeit.....	11
2 Material	13
2.1 Patientinnen.....	13
2.2 Materialien für die Untersuchung.....	13
2.2.1 Geräte, Laborhilfen und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.2.2 Reagenzien und Puffer für die immunhistochemische Färbung.....	14
2.2.3 Zusammensetzung der Puffer	14
2.2.4 Primärantikörper für die immunhistochemische Färbung	14
2.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	15
3 Methoden	16
3.1 Auswahl und Validierung der drei Kollektive	16
3.2 Erstellung einer Datenbank	16
3.3 Manuelle Immunhistochemie.....	16
3.3.1 Herstellung der Tissue Micro Arrays (TMA-Schnitte)	16
3.3.2 Ermittlung der geeigneten Verdünnung und Einwirkdauer der Färbung	17
3.3.3 Durchführung der manuellen immunhistochemischen Färbung	18

3.3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	19
3.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	20
3.4.1 Das Verfahren	20
3.4.2 Das qRT-PCR-Protokoll	21
3.4.3 Berechnung des Δ CT-Wertes.....	21
3.5 Statistische Analyse	22
4 Ergebnisse	23
4.1 Überblick über das Kollektiv	23
4.1.1 HGSC	23
4.1.2 EC.....	24
4.1.3 CCC	25
4.1.4 Übersicht über informative Fälle.....	26
4.2 Die Expression der Hormonrezeptoren	27
4.2.1 Verteilung der HR-Expression auf Proteinebene	27
4.2.2 Expression von ESR1 und PGR auf mRNA-Ebene in HGSC	32
4.2.3 Vergleich der HR-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene	33
4.2.4 Hormonrezeptoren und Prognose in HGSC.....	34
4.3 Die Zellzyklusproteine Cyclin D1 und pRb	35
4.3.1 Cutoff-Bestimmung.....	35
4.3.2 Verteilung der Zellzyklusproteinexpression.....	37
4.3.3 Korrelationen der ZZP mit klinisch-pathologischen Parametern	38
4.4 ARID1A in den Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen	40
4.4.1 Verteilung der ARID1A-Expression	40
4.4.2 Korrelation von ARID1A mit klinisch-pathologischen Parametern	41
4.5 HNF-1 β in den Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen	42
4.5.1 Verteilung der HNF-1 β -Expression	42
4.5.2 Korrelationen des HNF-1 β mit klinisch-pathologischen Parametern.....	45
4.6 Korrelationen der Biomarker untereinander	45
4.6.1 HGSC	45
4.6.2 EC.....	47
4.6.3 CCC.....	50
5 Diskussion	54

5.1 Zellzyklusprotein- und Hormonrezeptorinteraktion in Ovarialkarzinomen	54
5.1.1 Die Zellzyklusproteine Cyclin D1 und pRb in Ovarialkarzinomen.....	54
5.1.2 Hormonrezeptoren als diagnostische, prognostische und therapeutische Marker....	57
5.2 ARID1A in Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen	59
5.3 HNF-1 β in Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen	60
5.4 Limitationen der Arbeit.....	61
5.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	62
5.6 Eigenanteil der Arbeit	63
Literaturverzeichnis	64
Eidesstattliche Erklärung	79
Lebenslauf.....	80
Danksagung	81

Zusammenfassung

Morphologie, Biologie, Ansprechen auf Chemotherapie sowie Prognose unterscheiden sich stark zwischen den histologischen Ovarialkarzinomsubtypen. Unser Ziel bestand darin, ein Kollektiv der seltenen EC und CCC zu etablieren und diese im Hinblick auf die Expression und Interaktion von Zellzyklusproteinen (pRb, Cyclin D1) sowie von Hormonrezeptorklassen zu untersuchen. Die Analysen erfolgten im Vergleich mit dem häufigsten Ovarialkarzinomsubtyp, dem HGSC.

Wir untersuchten Proben von 234 Patientinnen aus den Jahren von 1991 bis 2013 mit Erstdiagnose eines Ovarialkarzinoms (nach WHO-Klassifikation von 2014): 168 High-grade seröse (HGSC), 35 endometrioiden (EC) und 31 klarzellige Karzinome (CCC). Alle Patientinnen hatten sich einer radikalen Operation unterzogen. Sämtliche Proben wurden manuell immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Östrogenrezeptor α (ER α), Progesteronrezeptor (PR), phosphoryliertes Retinoblastomprotein (pRb), Cyclin D1 und, im Falle der EC und CCC, zusätzlich mit Antikörpern gegen Östrogenrezeptor β (ER β), ARID1A und den Hepatozyten-nukleären-Faktor 1 β (HNF-1 β) gefärbt. Am HGSC-Kollektiv wurde weiterhin die mögliche prognostische Bedeutung der Hormonrezeptoren und der Zellzyklusproteine untersucht.

In unserer Studie waren die HGSC positiv für ER α (67,5 %), kaum für PR (14,6 %) und überexprimierten selten Cyclin D1 (4,7 %) und pRb (10,6 %). Die EC waren überwiegend Hormonrezeptor-positiv: ER α 57,1 %, PR 79,4 %, ER β 82,9 % (nukleär) respektive 60 % (zytoplasmatisch). Nur 25,7 % zeigten eine Überexpression von Cyclin D1 und 31,4 % eine Überexpression von pRb. ARID1A wurde nukleär von 46,9 %, zytoplasmatisch von 21,9 % exprimiert. Nukleär waren 14,7 % der EC, zytoplasmatisch 50 % HNF-1 β -positiv. Die CCC waren größtenteils negativ für ER α und PR (12,9 bzw. 9,7 %), aber zu 90,3 bis 93,5 % positiv für ER β . Rund 35 % überexprimierten Cyclin D1 oder pRb. 74,2 % der Fälle wiesen ARID1A im Kern auf, nur 29 % im Zytoplasma. Den HNF-1 β exprimierten in diesem Kollektiv 79,3 % der Fälle nukleär und keiner zytoplasmatisch. Statistisch signifikant waren die aufgeführten Unterschiede zwischen den Subtypen bei ER α , PR, Cyclin D1, pRb, HNF-1 β (jeweils $p < 0,001$), zytoplasmatischem ER β ($p = 0,006$) und nukleärem ARID1A ($p = 0,039$). Die insgesamt seltene Expression der ZCP war in keinem histologischen Subtyp mit der Expression der Hormonrezeptoren assoziiert und zeigte keinen Einfluss auf die Prognose im HGSC.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass in HGSC, EC und CCC keine relevanten Interaktionen zwischen ZZP und Hormonrezeptoren bestehen.

Abstract

Morphology, biology, response to chemotherapy and therefore the resulting prognosis differ strongly between the histological subtypes of ovarian carcinomas. Our goal was to examine the expression and interaction of cell cycle proteins and hormone receptors in a collective of the rare EC and CCC. The results were compared with those in the most frequent subtype, the HGSC.

We analyzed samples of 234 patients, collected between 1991 and 2013, with the diagnosis of a carcinoma of the ovary: according to the WHO-classification of 2014 168 High-grade Serous Carcinomas (HGSC), 35 Endometrioid Carcinomas (EC), 31 Clear Cell Carcinomas (CCC). All patients had been treated by tumour debulking operation. The samples were manually stained with antibodies against estrogen receptor α (ER α), progesterone receptor (PR), Cyclin D1 and hyperphosphorylated retinoblastoma protein (pRb). The EC and CCC were additionally stained with antibodies against estrogen receptor β (ER β), ARID1A and hepatocyte nuclear factor 1 β (HNF-1 β). We evaluated the potential prognostic relevance of hormone receptors and cell cycle proteins in HGSC.

The HGSC were especially positive for ER α (67.5 %), less so for PR (14.6 %), and seldom showed an overexpression of Cyclin D1 (4.7 %) and pRb (10.6 %). The EC were primarily positive for hormone receptors: ER α 57.1 %, PR 79.4 %, ER β 82.9 and 60 % respectively (nuclear versus cytoplasmatic). Only 25.7 % respectively 31.4 % showed an overexpression of Cyclin D1 or pRb. EC expressed ARID1A in 46.9 % nuclear and in 21.9 % cytoplasmatic. Only 14.7 % showed a nuclear but 50 % a cytoplasmatic staining against HNF-1 β . The CCC were tested mostly negative for ER α and PR (12.9 % and 9.7 %). Approximately 90 to 93 % expressed ER β . Approximately 35 % showed Cyclin D1 and pRb overexpression. Of all CCC, 74.2 % expressed ARID1A nuclear versus 29 % cytoplasmatic. HNF-1 β was expressed in 79.3 % nuclear and not at all cytoplasmatic. Differences for the described subtypes were statistically significant for ER α , PR, Cyclin D1, pRb, HNF-1 β (all $p < 0.001$), cytoplasmatic ER β ($p = 0.006$) and nuclear ARID1A ($p = 0.039$). The overall rare expression of cell cycle proteins was in no subtype associated with the expression of hormone receptors and did not influence the prognosis in HGSC.

Our results indicate that there are no relevant interactions between cell cycle proteins and hormone receptors in ovarian carcinomas.

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	Fünf-Jahres-Überlebensrate
X ² -Test	Chi-Quadrat-Test nach Pearson
ARID1A	AT-reiches interaktives Domänen-enthaltendes Protein 1A(-Gen)
BRCA1/2	Brustkrebsgen (breast cancer gene) 1/2
CCC	klarzelliges Ovarialkarzinom (clear cell carcinoma of the ovary)
CDK4/6	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
CT	Cycle of threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure (dexoxyribonucleic acid)
EC	endometrioides Karzinom (endometrioid carcinoma)
ER α / β	Östrogenrezeptor alpha/beta (estrogen receptor)
ESR1	Östrogenrezeptor-mRNA
FIGO	Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique)
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGSC	High grade seröses Karzinom (high grade serous carcinoma)
HNF-1 β	Hepatozyten Nukleärer Faktor 1 beta
HR	Hormonrezeptoren
IRS	Immunreaktiver Score
Ki-67	Antigen Ki-67 (zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
p16	Cyclin-dependent Kinase-Inhibitor 2A
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PGR	Progesteronrezeptor-mRNA
PR	Progesteronrezeptor
pRb	phosphoryliertes Retinoblastomgen/-protein
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (quantitative real-time polymerase chain reaction)
RPL37A	ribosomal protein 37A
TMA	Tissue Microarray
WT1	Wilms Tumorprotein 1
ZZP	Zellzyklusproteine

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die malignen epithelialen Tumoren des Ovars [9].....	2
Tabelle 2: Geräte, Laborhilfen und Verbrauchsmaterialien.....	14
Tabelle 3: Reagenzien und Puffer für die immunhistochemische Färbung.....	14
Tabelle 4: Primärantikörper.....	15
Tabelle 5: Verwendete Primer für die qRT-PCR.....	15
Tabelle 6: Primärantikörper mit Verdünnungsverhältnissen.....	17
Tabelle 7: Berechnung des IRS.....	20
Tabelle 8: Überblick über klinisch-pathologische Merkmale im HGSC-Kollektiv.....	24
Tabelle 9: Überblick über die klinisch-pathologischen Merkmale im EC-Kollektiv.....	25
Tabelle 10: Überblick über die klinisch-pathologischen Merkmale im CCC-Kollektiv.....	26
Tabelle 11: Anzahl der informativen Fälle pro histologischem Typ.....	27
Tabelle 12: HR-Expression im Vergleich der histologischen Typen.....	29
Tabelle 13: Korrelation von ER α und PR mit klinisch-pathologischen Parametern.....	31
Tabelle 14: Expression der Zellzyklusproteine im Vergleich der Histotypen.....	37
Tabelle 15: Korrelationen von Cyclin D1 mit klinisch-pathologischen Parametern.....	39
Tabelle 16: Korrelationen von pRb mit klinisch-pathologischen Parametern.....	40
Tabelle 17: Expression von ARID1A im Vergleich der histologischen Typen.....	41
Tabelle 18: Nukleäres ARID1A und klinisch-pathologische Parameter.....	42
Tabelle 19: Zytoplasmatisches ARID1A und klinisch-pathologische Parameter.....	42
Tabelle 20: Expression von HNF-1 β in EC und CCC.....	44
Tabelle 21: Korrelationen von HNF-1 β mit klinisch-pathologischen Parametern.....	45
Tabelle 22: Korrelationen von ER α mit ZZP.....	45
Tabelle 23: Korrelationen von PR mit ZZP.....	46
Tabelle 24: Korrelationen des HR-Status mit ZZP in HGSC.....	46
Tabelle 25: Korrelationen von pRb mit den Hormonrezeptoren in EC.....	47
Tabelle 26: Korrelationen von Cyclin D1 mit Hormonrezeptoren in EC.....	48
Tabelle 27: Korrelationen des HR-Status mit ZZP in EC.....	49
Tabelle 28: Korrelationen von pRb mit den Hormonrezeptoren in CCC.....	50
Tabelle 29: Korrelationen von Cyclin D1 mit den Hormonrezeptoren in CCC.....	51
Tabelle 30: Korrelationen des HR-Status mit ZZP in CCC.....	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nukleäre Expression von ER α in EC.....	28
Abbildung 2: Nukleäre Expression von PR in EC.....	28
Abbildung 3: Schwache nukleäre und zytoplasmatische Expression von ER β in EC.....	28
Abbildung 4: HR-Status auf Proteinebene.....	31
Abbildung 5a: 40- Δ CT-Verteilung von ESR1 in HGSC.....	32
Abbildung 5b: 40- Δ CT-Verteilung von PGR in HGSC.....	33
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse für ESR1 40- Δ CT in HGSC.....	34
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse für PGR 40- Δ CT in HGSC.....	35
Abbildung 8: IRS-Verteilung und Cutoff des Cyclin D1 über alle Histotypen.....	36
Abbildung 9: IRS-Verteilung und Cutoff des pRb über alle Histotypen.....	36
Abbildung 10: Nukleäre immunhistochemische Färbung von Cyclin D1 in EC.....	37
Abbildung 11: Vergleichender ZYP-Expressionsstatus über die Histotypen.....	38
Abbildung 12: Nukleäre immunhistochemische Färbung von ARID1A in CCC.....	40
Abbildung 13: Nukleäre immunhistochemische Färbung von HNF-1 β in CCC.....	42
Abbildung 14: Nukleäre immunhistochemische Färbung von HNF-1 β in EC.....	43
Abbildung 15: Zytoplasmatische immunhistochemische Färbung von HNF-1 β in EC.....	43
Abbildung 16: HNF-1 β -Expressionsstatus.....	44

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Klinik der Ovarialkarzinome

Das Ovarialkarzinom stellt laut Erhebungen des Zentrums für Krebsregisterdaten mit 7.380 Neuerkrankungen im Jahr 2012 und einer Inzidenz von 11,4 pro 100.000 Einwohnern und Jahr eine vergleichsweise seltene Krebserkrankung dar. Sie macht lediglich drei Prozent der Gesamtkrebsinzidenz aus und steht somit an zehnter Stelle der häufigsten Malignome der Frau. Nur eine von 72 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom. Dennoch steht es an fünfter Stelle der Krebstodesursachen. Bezogen auf die weiblichen Geschlechtsorgane ist es die zweithäufigste bösartige Erkrankung und die am häufigsten tödlich verlaufende [1, 2, 3].

Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate über alle histologischen Entitäten und Stadien liegt bei 41 %. Die frühen FIGO-Stadien I und II weisen noch eine recht hohe Fünf-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 80 % auf, doch drei Viertel aller Ovarialkarzinome werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium mit peritonealer oder lymphogener Metastasierung diagnostiziert und haben dann eine 5-JÜR von unter 30 % [4, 5]. Dies liegt vor allem daran, dass Frühsymptome fehlen oder so unspezifisch sind (zum Beispiel Bauchumfangszunahme oder Abgeschlagenheit), dass sie von den Patientinnen oft erst spät wahrgenommen werden. Hinzu kommt, dass bisher keine erfolgreichen Methoden zur Früherkennung bekannt sind [6].

Die Kommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) hat für die Diagnostik und Therapie die S3-Leitlinie 2013 erstellt [7]. Der Goldstandard ist die radikale Operation mit nach Möglichkeit vollständiger Entfernung des abdominellen Tumorgewebes, sodass der Uterus samt beiden Adnexen und Parametrien, die Appendix, (befallene) Teile des Peritoneums sowie die inguinalen, paravertebralen und paraaortalen Lymphknoten reseziert werden. Der intraoperativ makroskopisch bestimmte Tumorrest stellt einen der wichtigsten Prognosefaktoren dar. Im Anschluss erfolgt eine adjuvante Chemotherapie mit einer Kombination aus einem platinhaltigen Zytostatikum und einem Taxan. Zwar zeigen drei Viertel aller so behandelten Patientinnen anfänglich eine Platinsensibilität des Karzinoms, was bedeutet, dass sie für mindestens sechs Monate kein Rezidiv entwickeln, aber bei den meisten Patientinnen kommt es im weiteren Verlauf dennoch zu einem Wiederauftreten des Tumors. In diesen Fällen ist eine weitere radikale Tumormassenreduktion empfohlen sowie

eine adjuvante Chemotherapie, die entweder erneut mit Platinderivaten oder mit anderen Zytostatika wie Topotecan, pegyliertem liposomalen Doxorubicin oder Paclitaxel erfolgen kann. Fortschritte in onkochirurgischen Verfahren und Weiterentwicklungen der Chemotherapeutika ist es vermutlich zu verdanken, dass in den vergangenen 30 Jahren eine, wenn auch geringe, Zunahme der Fünf-Jahres-Überlebensrate zu verzeichnen war. Die überarbeitete Version 2.0 der S3-Leitlinie von 2016 brachte keine Änderung der Empfehlungen bezüglich der chirurgischen Therapie [8].

1.2 Morphologie und Molekularbiologie der Ovarialkarzinome

Die folgende Tabelle zeigt die fünf Typen der Ovarialkarzinome, auf die 98 % aller malignen Ovarialtumoren entfallen, und von denen die ersten drei Inhalt dieser Arbeit waren:

Typ	Abkürzung	Anteil an allen Ovarialkarzinomen
High-grade seröses Karzinom	HGSC	70 %
Endometrioides Karzinom	EC	10 %
Klarzelliges Karzinom	CCC	10 %
Low-grade seröses Karzinom	LGSC	<5 %
Muzinöses Karzinom	MC	3 %

Tabelle 1: Überblick über die malignen epithelialen Tumoren des Ovars [9]

Obwohl die Eierstöcke embryologisch nicht aus dem Müllergang hervorgehen, erinnern ihre Karzinome an dessen Morphologie. Eine Hypothese postuliert, dass die Epithelzellen, welche die Oberfläche des Ovars und des Peritoneums bedecken, die Fähigkeit besitzen, sich zu Müllergang-Epithel zu differenzieren. Ein möglicher Auslöser der malignen Transformation wird in der Ovulation gesehen, welche vermehrt zu Inklusionszysten führt, in denen das Oberflächenepithel einem östrogen- und wachstumsfaktorenreichen Milieu ausgesetzt ist. Hinzu kommt ein Versagen der physiologischen Reparationsvorgänge nach der Ovulation. Eine andere Hypothese sieht den Ursprung der so genannten Ovarialkarzinome in epithelialen Abkömmlingen des Müllergangs: Für das HGSC ist es das Epithel der Tuba uterina, für das EC und CCC sind es Endometrioseherde im Ovar [10, 11]. Man geht heute davon aus, dass es sich bei den Ovarialkarzinomen nicht um morphologische Subtypen eines Tumors handelt, sondern sie jeweils eigenständige Entitäten darstellen, da sie sich nicht nur in ihren molekulargenetischen Veränderungen [12, 13], sondern auch in Morphologie und klinischen Merkmalen wie zum Beispiel der Antwort auf platinhaltige Chemotherapeutika

sowie der Prognose unterscheiden [14]. So zeigt eine neoadjuvante Chemotherapie günstige Effekte für Patienten mit HGSC, nicht jedoch für andere Subtypen [15]. Nur 15 % der CCC sind chemosensibel, während es bei den HGSC 80 % sind [16, 17]. Daraus ergibt sich eine hohe Priorität der sicheren und in der Routine einsetzbaren histopathologischen Klassifizierung. Bei kleinen Gewebeproben könnten sich Markerexpressionsprofile als hilfreich erweisen, denn während sie zwischen den einzelnen Entitäten stark variieren, weisen sie innerhalb eines definierten Typs und unabhängig vom Stadium eine hohe Konstanz auf [14]. Darum ist es von großem Interesse, Markerprofile zu identifizieren, die für die jeweiligen Typen sensitiv und spezifisch sind.

1.2.1 Das High-grade seröse Karzinom (HGSC)

Das High-grade seröse Karzinom (HGSC) stellt mit 70 % den Hauptteil der Ovarialtumoren [9]. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. Der Tumor wächst in 60 % der Fälle bilateral und wird in über 80 % erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Makroskopisch imponiert er oft als eine sehr große sowohl zystische als auch solide Tumormasse mit Einblutungen und Nekrosen [18]. Das HGSC zeichnet sich durch ein papilläres und solides Wachstumsmuster mit schmalen Drüsenlumina und Zellen mittlerer Größe, aber auch Riesenzellen mit deutlichen Nucleoli aus. Die Zellkerne weisen eine mehr als dreifache Größenvariabilität [12] und in der Regel mehr als zwölf Mitosen pro zehn High-power Feldern (HPF) im Mikroskop auf; zwei Merkmale, die sie deutlich vom LGSC unterscheiden.

In der Mehrheit der Fälle sind die Tumorzellen positiv für p53, das Wilms-Tumorprotein (WT) 1 sowie den CDK-Inhibitor 2A (p16) und oft auch für das breast cancer 1/2-Gen (BRCA1/2). Zudem zeigen sie eine hohe Proliferationsrate, erkennbar an der erhöhten nukleären Expression von Ki-67 [14]. Diese Funde wurden im Cancer Genome Atlas Project an 500 Tumoren überprüft und bestätigt: p53-Mutationen traten demzufolge in nahezu sämtlichen HGSC auf, eine Mutation im BRCA1/2 wurde in 22 % der Fälle bestätigt und einige weitere Mutationen wurden identifiziert, die jedoch seltener auftraten [18].

Laut einer großen multizentrischen Studie aus dem Jahr 2013 zeigten von 1742 HGSC 60 % eine starke und weitere 21 % eine schwache Östrogenrezeptor (ER) α -Expression. Für den Progesteronrezeptor (PR) waren insgesamt 31 % schwach bis stark positiv und eine Koexpression beider Hormonrezeptoren wurde in 28 % der Fälle beobachtet. Über 80 % waren für einen oder beide Hormonrezeptoren positiv. Nur die starke, also über 50 % der

Kerne betreffende, PR-Expression war statistisch signifikant mit einem verbesserten Überleben assoziiert [19].

In den letzten Jahren hat auch die Untersuchung des ER β an Bedeutung für die Erforschung der Ovarialkarzinome gewonnen. Ovarialkarzinome sind seltener positiv für ER β als nicht-neoplastische Zellen [20, 21]. In diesem Zusammenhang scheint die Lokalisation des Rezeptors in der Zelle von Bedeutung zu sein: In normalen Zellen findet man es nukleär, in malignen sofern überhaupt zytoplasmatisch [22] und in HGSC war letzteres mit einer schlechteren Prognose assoziiert [23]. Mögliche Erklärungen für die verringerte bis fehlende ER β -Expression in Tumorzellen des Ovars umfassen epigenetisches Silencing, das durch DNA-Methyltransferase oder Histondeacetylase rückgängig gemacht werden könnte [24, 25] und vermehrte Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System [26]. Metastasen-assoziierte Gene (MTA1 und MTA3) supprimierten in vitro in der OVCAR-3-Zelllinie die Expression von ER β und in derselben Studie wurde in vivo eine inverse Korrelation dieser Gene und der Expression von ER β in 115 serösen Ovarialkarzinomen gefunden [27]. Bisher konnten keine molekularen Unterschiede zwischen reinen HGSC und soliden, schlecht differenzierten Tumoren mit lediglich anteiliger seröser Morphologie gefunden werden, so dass auch letztere wohl den HGSC zuzuordnen sind [28].

1.2.2 Endometriose-assoziierte Ovarialkarzinome

Endometriose und maligne Entartung

Endometriose ist eine Östrogen-abhängige, chronisch-inflammatorische Erkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane, die fünf bis 15 % der Frauen im gebärfähigen Alter betrifft [29, 30]. Sie ist gekennzeichnet durch das Vorkommen endometrioider Drüsen und Stromas außerhalb des Uterus. Die Endometriose gilt als gutartige Erkrankung, obwohl das heterotope Endometriumgewebe Charakteristika maligner Zellen zeigt wie unkontrolliertes Wachstum und lokale Invasion [31].

Einiges spricht dafür, dass ovarielle Endometriosezysten fakultativ präkanzeröse Läsionen sind: Verschiedene Studien zeigten einen signifikanten statistischen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Endometriose und einem zwei- bis dreizehnfach erhöhten Risiko für das spätere Auftreten eines CCC [32, 33]. Annähernd 30 bis 35 % aller CCC [34] und bis zu 42 % aller EC [35, 36] waren mit einer Endometriose assoziiert. Zudem zeigten die CCC-assoziierten Endometrioseherde in 61 bis 100 % Atypien, während solche nur in ein bis zwei

Prozent der Endometriosezysten ohne begleitendes Karzinom gefunden wurden [37]. Eine andere Studie beobachtete das Auftreten von CCC mehrere Jahre nach bioptischer Diagnose einer atypischen ovariellen Endometriose [38]. Damit stellen die Endometriose-assoziierten Ovarialtumoren eine Komplikation einer Endometriose dar [39]. Hierfür spricht ebenfalls, dass kontinuierliche, morphologische Korrelate für jeden Schritt von der einfachen Endometriose bis zum Karzinom gefunden wurden [34, 35]. Von den Endometriosen entarten jedoch nur ein bis zwei Prozent binnen acht Jahren [32]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die gängigste Hypothese geht davon aus, dass sich in den Endometriosezysten durch häufige Menstruation und Langzeitstimulation mit Östrogen eine Konstellation ergibt, die gekennzeichnet ist durch wiederholte Epithelproliferation, Entzündung und Eisen-induzierte Sauerstoffradikale, welche die Akkumulation von DNA-Schäden begünstigen [40, 41]. Die Östrogenwirkung wird hier über den ER β vermittelt, der in Folge einer Hypomethylierung in der Promoterregion überexprimiert wird [42]. Die hohe Konzentration des ER β wirkt wiederum hemmend auf die ER α -Expression mit der Folge eines unterdurchschnittlichen ER α -Levels in den Endometriosezellen [43]. Die PR-Expression ist im Vergleich zum eutopen Endometrium wegen Hypermethylierung in der Promoterregion und des Fehlens des normalerweise die Transkription aktivierenden ER α deutlich reduziert [44]. In verschiedenen Studien wurde eine Progesteronresistenz beschrieben. Auf diesen pathophysiologischen Veränderungen basiert die Endometriosetherapie, die üblicherweise mit Gestagen, Östrogen-Gestagen-Präparaten oder GnRH-Analoga vorgenommen wird [45] und sie könnten auch eine Erklärung dafür sein, dass Frauen, die eine Langzeittherapie mit Gestagenen (zum Teil in Kombination mit Östrogen) erhielten, ein geringeres Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms zeigten [46].

Unter allen bisher entdeckten molekularen Veränderungen in Endometriosezysten sind Mutationen, die das ARID1A-Gen inaktivieren, die häufigsten [47]. Andere genomische Veränderungen, welche atypische Endometriosezellen mit EC und CCC teilen, sind somatische PTEN- [48], PIK3CA-Mutationen [49] und Hochregulation des HNF-1 β [50], dessen Zielgene auch in sekretorischen Endometriumzellen aktiv sind [51].

Das klarzellige Karzinom (CCC)

Das klarzellige Karzinom (CCC) macht 10 % aller Ovarialkarzinome aus. In den meisten Fällen handelt es sich makroskopisch um einen soliden Tumor mit gelber Schnittfläche, der üblicherweise unilateral wächst. Histopathologisch ist er durch große Zellen mit charakteris-

tisch hellzelligem oder eosinophilem Zytoplasma sowie stark pleomorphen und hyperchromatischen Kernen gekennzeichnet, die bevorzugt als komplexe Papillen mit basaler Hyalinisierung wachsen. Aber auch solide, tubulozystische und glanduläre Wachstumsformen kommen vor. Weiterhin kann man „hobnail cells“ finden: Zellen, deren Kerne – wahrscheinlich durch die Akkumulation von Glykogen im Zytoplasma – so weit an den Rand gedrängt wurden, dass sie in das Lumen hervorragen [52]. Bei 25 % der Fälle sind hyaline Körper erkennbar und trotz der ausgeprägten Zellatypien findet man im Allgemeinen nicht mehr als fünf Mitosen pro zehn HPF im Mikroskop. Diese im Vergleich zu anderen schlecht differenzierten Ovarialkarzinomen bedeutend niedrigere Teilungsrate, könnte eine der Ursachen für die geringe Chemosensibilität der CCC sein [12].

In der Regel kann die Diagnose schnell und mit hoher Sicherheit gestellt werden, doch die typischen Zellen können auch in einigen anderen Typen des Ovarialkarzinoms beobachtet werden, besonders in high-grade serösen und endometrioiden Tumoren [53]. Wenn der Anteil der klaren Zellen über zehn Prozent der Tumormasse einnimmt, variieren die Diagnosen, die von verschiedenen Pathologen gestellt werden, zwischen gemischten, endometrioid-klarzelligen Karzinomen und HGSC (seltener EC) mit lediglich anteiligem klarzelligen Aspekt, wobei die jeweiligen Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchern nur schlecht reproduziert werden können. Echte, gemischte serös-klarzellige Tumoren treten laut heutigem Erkenntnisstand nicht auf [54].

Das CCC unterscheidet sich nicht nur durch die beschriebene charakteristische Histologie deutlich von den anderen Entitäten, sondern auch durch die häufige und frühzeitige Entwicklung einer Resistenz gegenüber Platin-haltiger Chemotherapie, welche besonders bei unzureichender chirurgischer zytoreduktiver Therapie eine sehr schlechte Prognose zur Folge hat [55]. Die Ursachen dieser Platinresistenz müssen noch erforscht werden. Ein weiteres Merkmal der CCC ist, dass man in ihrer Umgebung häufig Endometrioseherde beobachten kann [56], in Folge dessen geht die häufigste Hypothese der Karzinogenese von einem Ursprung in einer Endometriose aus [57].

Das CCC ist im Allgemeinen ein Hormonrezeptor-negativer Tumor: 81 bis 95 % aller Karzinome sind negativ für ER α und 92 % sind negativ für PR [19]. WT1 wird ebenfalls nur in 5 % der Fälle exprimiert. Ungefähr die Hälfte aller CCC weisen Mutationen im AT-reichen interaktiven Domänen-enthaltenden Protein 1A-Gen (ARID1A) auf dem Chromosom 1p36 auf, die zu einem Verlust der Proteinexpression führen. Das ARID1A gehört zur SWI/SNF

(Switch/Sucrose NonFermentable)-Familie, deren Mitglieder den SWI/SNF Chromatin Remodeling Komplex bilden [58]. Dieser moduliert den Zustand des Chromatins, wobei ARID1A die Zielspezifität und ATPase-Aktivität bestimmt. Dadurch hat es eine wichtige Rolle inne für die Entwicklung, Zelldifferenzierung und Tumorsuppression [59, 60]. ARID1A supprimiert die zelluläre Proliferation durch p53-abhängige transkriptionale Regulation verschiedener Tumorsuppressorgene wie CDKN1A (codiert für p21) und SMAD3. So sind inaktivierende Mutationen von entweder ARID1A oder TP53 funktionell gleichbedeutend, da sie denselben Signalweg kontrollieren [61] und allgemein wird angenommen, dass der Verlust von ARID1A für gewöhnlich mit TP53-Wildtyptumoren verbunden ist [62]. Die Stabilität des ARID1A-Proteins hängt von seiner subzellulären Lokalisation ab: Nukleäres ARID1A ist instabiler als zytoplasmatisches, weil es im Kern schnell durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert wird. Deletionen im Gen, in deren Folge kein Transport aus dem Kern ins Zytoplasma stattfindet, führen also zu einer verminderten Quantität an Protein [63]. Die häufig fehlende Expression in atypischen Endometriosezellen spricht zum einen für die atypische Endometriose als Ursprungsgewebe der CCC, zum anderen dafür, dass ARID1A-Mutationen mit konsekutivem Verlust der Funktion ein sehr frühes Ereignis in der Karzinogenese darstellen [56, 58]. Ein weiterer Hinweis hierfür könnte ebenfalls sein, dass keine signifikante Korrelation zwischen dem Verlust der ARID1A-Expression und klinischen Parametern wie Alter bei Krankheitsmanifestation, Stadium, Lymphknotenmetastasen sowie Überleben festgestellt werden konnte [56, 64, 65].

Im Gegensatz hierzu wurden für den Hepatozyten-nukleären Faktor 1 β (HNF-1 β) positive Expressionsraten von 66 [66] bis 90 % beschrieben [14]. Die Sensitivität bezüglich des CCC betrug in verschiedenen Studien zwischen 82,5 und 100 %, die Spezifität zwischen 92,1 und 95,2 % [67, 68, 69, 70]. Allerdings ist HNF-1 β nicht geeignet, um zwischen einem Primarius und Metastasen anderer Karzinome mit klarzelliger Komponente zu unterscheiden, da er in letzteren ebenfalls exprimiert wird [66].

Der HNF-1 β gehört zur Familie der Homöodomänen enthaltenden Transkriptionsfaktoren, deren Mitglieder in Karzinomen häufig dereguliert sind [71]. Er ist an der embryonalen Entwicklung vieler Organe wie Leber, Nieren, Pankreas und Müllergang beteiligt [72]. Ein Knock-down mittels small interfering RNA (si-RNA) führte zur Apoptose einer ovariellen Klarzellkarzinomzelllinie. Das spricht dafür, dass HNF-1 β notwendig zum Überleben der Tumorzellen ist [68]. Der klarzellige Aspekt kann am ehesten mit einer HNF-1 β -vermittelten

vermehrten Transkription des Glucose-6-Phosphatase-Gens und der daraus resultierenden verstärkten Glukoneogenese erklärt werden. Hinzu kommt womöglich noch eine erhöhte Glucoseaufnahme durch die Krebszellen. Außerdem induziert HNF-1 β in CCC die Expression verschiedener Gerinnungsfaktoren wie die A-Kette des Fibrinogens (FGA), Thrombin (FGBm F2) und die B-Kette des Faktors XIII (F13B) auf einem höheren Niveau als im normalen Oberflächenepithel des Ovars. Damit könnte er die Ursache der für CCC-Patientinnen häufig beschriebenen venösen Thrombosen sein. Tatsächlich haben HNF-1 β -positive Patienten ein dreifach höheres Risiko für derartige Zwischenfälle [66]. HNF-1 β reguliert weiterhin Angiotensin-converting Enzym 2 (ACE-2), das antiapoptotisch wirkt, sowie Annexin 4, das als Verursacher der Paclitaxelresistenz diskutiert wird [73].

Das Endometrioides Karzinom (EC)

Das Endometrioides Karzinom (EC) betrifft vorwiegend perimenopausale Frauen und stellt rund 10 % aller ovariellen epithelialen Malignome [9]. Es wird meist in einem frühen Stadium diagnostiziert und hat eine vergleichsweise bessere Prognose als die anderen Karzinome [12, 74]. In 15 bis 20 % erschwert ein gleichzeitig bestehendes endometrioides Karzinom des Uterusendometriums die genaue Zuordnung des Primarius [75].

Das EC ähnelt in seiner Histopathologie mit deformierten, unregelmäßigen glandulären Tumorzellverbänden stark dem endometrioiden Karzinom des Uterusendometriums und diese Ähnlichkeit sowie der häufige Fund von atypischen Endometrioseherden in der Nähe führte zu der Vermutung, dass in diesen das Ursprungsgewebe des EC zu sehen sei [36, 39]. Somatische Mutationen von β -Catenin (CTNNB1-Gen) und PTEN sind mit 40 respektive 20 % die häufigsten genetischen Veränderungen in EC [10, 76]. Rund 30 bis 40 % aller EC weisen ARID1A-Mutationen mit Verlust der Proteinexpression auf [58, 77]. Bisher konnte jedoch in keiner Studie eine prognostische Bedeutung des Mutations- oder auch Expressionsstatus von ARID1A nachgewiesen werden [64, 65]. Allerdings wurden dieselben PTEN- und ARID1A-Mutationen in unmittelbar angrenzender Endometriose nachgewiesen; ein weiteres Indiz für die Hypothese von atypischer Endometriose als Ursprung des EC. In 20 % der EC finden sich PIK3CA-Mutationen, aber nur in zwei Prozent der HGSC [10, 78]. EC sind weiterhin immunohistochemisch positiv für Vimentin, Zytokeratin CK7 (97 %), Epitheliales Membran-Antigen (EMA) sowie die Hormonrezeptoren ER α und PR. In einer multizentrischen Studie mit 484 endometrioiden Karzinomen zeigten 60 % eine starke (über die Hälfte der Kerne betreffende) und 16 % eine schwache ER α -Expression. Nur 23 % wa-

ren negativ für ER α . Den PR exprimierten 44 % stark und 23 % schwach. Ein Drittel der Kohorte war vollständig negativ für diesen Hormonrezeptor. Die Expression eines oder beider Hormonrezeptoren war mit einem statistisch signifikanten längeren krankheitsspezifischen Überleben assoziiert [19]. CK20 exprimieren sie in 13 %. Für α -Inhibin, WT-1 und Calretinin sind die EC in der Regel negativ [14].

1.3 Rolle der Hormonrezeptoren in Ovarialkarzinomen

Östrogen reguliert wichtige Funktionen der physiologischen Ovarzellen. Es wird in den Granulosazellen des entstehenden Follikels gebildet [79] und stimuliert über die im Kern lokalisierten ER, die an Elemente in Promoterregionen der DNA binden, die Expression von Genen, welchen eine Rolle bei der Regulation von Proliferation, Zellzyklus und Energiehaushalt zukommt [80]. Auch die Oberflächenepithelzellen, die an der Reparatur der Oberfläche nach deren Einriss durch den Eisprung beteiligt sind [81, 82], werden durch Östrogene gesteuert. Der ER α (ESR1) ist der dominante Isotyp im reifen Gewebe von Uterus sowie Ovar und seine Überexpression ist ein typisches Merkmal fast aller Ovarialkarzinome [83]. Der ER β (ESR2) hingegen spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der primären weiblichen Geschlechtsorgane und es gibt Hinweise darauf, dass er den Uterus im Ruhezustand hält, bis das Ovar Estradiol (E2) bildet, welches in Studien zu einer verminderten ER β - und erhöhten ER α -Expression führte [57, 84]. Die Rolle des ER β in der Karzinogenese ist noch nicht zufriedenstellend erforscht: Die Ergebnisse einiger Studien lassen vermuten, dass es antiproliferativ und Tumor supprimierend wirkt, sodass ein Verlust seiner Expression ein Schritt auf dem Weg zu atypischer Endometriose und Ovarialkarzinomen wäre. So hemmte ER β bei Anwesenheit von ER α die E2-vermittelte Proliferation und senkte die Konzentration von Cyclin D1 sowie Rb [85]. In Endometriosezysten wurde hingegen eine Verschiebung der hormonellen Rezeptorverhältnisse zu Gunsten des ER β und zu Ungunsten von ER α sowie PR beschrieben [45].

Die Konkurrenz beider Isotypen des ER um Östrogen oder Transkriptionsfaktoren könnte die gewebe- und tumorspezifische Reaktion auf (anti)hormonelle Behandlungen erklären. So sprechen Hormonrezeptor-positive (luminale) Mammakarzinome gut auf eine antihormonelle Therapie an und die immunhistochemische Bestimmung des Hormonrezeptorstatus bei Mammakarzinomen ist seit langem diagnostischer Standard für die Einschätzung der Prognose und Planung der antihormonellen Therapie [86]. Die Anwendung der bekannten

Antiöstrogene bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigte bisher jedoch enttäuschende Ergebnisse [87, 88, 89]. Von den 40 bis 60 % aller Ovarialtumoren, die ER α exprimierten [90], sprachen nur wenige auf eine antihormonelle Therapie an. Insgesamt fanden sich Antwortraten von null bis 56 % in den verschiedenen Studien [91].

Die Gründe für dieses Therapieversagen sind bisher noch nicht ausreichend erforscht. Diskutiert werden verschiedene mögliche Ursachen. So könnte es sein, dass Unterschiede in der ER-Expression, die so geringfügig sind, dass man sie durch die semiquantitative Methode der Immunhistochemie nicht erfassen kann, in Ovarialkarzinomen möglicherweise dennoch Auswirkungen auf die Tumorbilologie sowie die Antwort auf Antiöstrogene haben.

Dieses Problem rückt die quantitative Bestimmung mit Hilfe der Reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in den Mittelpunkt, die den zusätzlichen Vorteil hat, dass ihre Anwendung auch bei sehr kleinen Proben noch möglich ist. Tatsächlich deuten frühere Ergebnisse darauf hin, dass auf mRNA-Ebene quantifizierte Unterschiede prognostisch bedeutsam sind [92]. Ebenfalls denkbar ist, dass eine vorhandene oder auch fehlende Ko-Expression von PR oder ER β Einfluss auf die Reaktion der Tumorzellen auf Antiöstrogene haben könnte.

1.4 Rolle der Zellzyklusproteine in Ovarialkarzinomen

Die Vermehrung menschlicher Zellen wird über eine Vielzahl von Proteinen reguliert, die an den Kontrollpunkten des Zellzyklus hemmend oder fördernd eingreifen können. Die Mechanismen sind inzwischen weitgehend erforscht. Eine wichtige Rolle spielen die Cycline, darunter das von uns untersuchte Cyclin D1 (vom CCDN1-Gen kodiert), welches in Verbindung mit der CDK4/6 die Hyperphosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) zum pRb bewirkt. Im Zuge dieser Phosphorylierung wird der Faktor E2F vom Rb freigesetzt und vermittelt den Übergang von der G1- in die S-Phase. Daraus ergibt sich, dass Cyclin D1 und pRb potentielle Onkogene darstellen [93, 94]. Über Cyclin D1 entfalten desweiteren mehrere mitogene Signalwege wie Glucocorticosteroide, PI3K/Akt, MAPK, WNT/ β -Catenin, STAT und NF κ B ihre Wirkung [95].

Abweichungen von der normalen Cyclin D1-Expression stellen ein häufiges Charakteristikum vieler Malignome unterschiedlicher Histogenese dar [96]. Das Cyclin D1-Gen zeigt selten Mutationen, aber seine Überexpression bietet den entsprechenden Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil [97]. Unter den Ovarialkarzinomen zeigten vierzehn bis 89 % eine

Überexpression von Cyclin D1, wobei es sich bei einem großen Teil auch zytoplasmatisch fand [98, 99], während es in benignen Zellen negativ war [100]. Eine Inhibition der CDK führt zu Zellzyklusarrest [101], Apoptose [102], Differenzierung [103] und Hemmung der Angiogenese [104]. Ki-67 liegt fast immer unter 10 %.

1.5 Hormon-Zellzyklus-Interaktionen und neue therapeutische Ansätze

Es ist schon seit längerem bekannt, dass vor allem zwischen Cyclin D1 und ER α funktionelle Wechselwirkungen bestehen. So vermag Cyclin D1 den ER α in Abwesenheit von CDK und Östrogen über einen Weg zu aktivieren, der nicht durch Antiöstrogene gehemmt werden kann [105]. Andererseits können Östrogene und Progesteron über ihre jeweiligen Hormonrezeptoren die Transkription der Cyclin D1-mRNA sowie die Proteinexpression steigern [106] und durch Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) den Übergang in die Proliferations- und Zellteilungsphase der Zelle initiieren [107]. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte Cyclin D1-Expression in ER α -positiven Mammakarzinomen nach neoadjuvanter Chemotherapie gefunden werden [123]. Cyclin D1 als downstream-Mediator der ER-Wirkung könnte somit einen wirkungsvollen Angriffspunkt zur Behandlung Hormonresistenter Mammakarzinome darstellen. Seitdem beobachtet wurde, dass Karzinomzellen empfindlicher auf eine Blockade der CDK4/6 reagieren als physiologische Zellen [108], wird an selektiven CDK4/6-Inhibitoren geforscht. Bisher konnte für Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib präklinisch Wirksamkeit in pRb-positiven Tumormodellen nachgewiesen werden [109] und Palbociclib soll besonders gute Wirksamkeit in p16-negativen Zelllinien entfalten [110]. In Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen Mammakarzinomen postmenopausaler Frauen wurde für die selektiven CDK4/6-Inhibitoren in Kombination mit anti-hormoneller Therapie eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (PFS) beschrieben [111]. Ergebnisse zum progressionsfreien oder Gesamtüberleben liegen bisher jedoch noch nicht vor. Die CDK4/6-Inhibitoren könnten jedoch ebenfalls einen vielversprechenden Therapieansatz für Ovarialkarzinome darstellen.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation der Expression und Interaktion von Hormonrezeptoren (ER α , ER β , PR) sowie Zellzyklusproteinen (Cyclin D1, pRb) im HGSC und in den Endometriose-assoziierten Neoplasien mit dem EC als Modell des HR-positiven und dem CCC als Modell des HR-negativen Ovarialkarzinoms. Weiterhin wurde eine Evaluation

der Expression von HNF-1 β und ARID1A in Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen vorgenommen.

- Zusammenstellung eines Kollektivs Endometriose-assoziiierter Neoplasien
- morphologische, immunhistochemische und klinische Charakterisierung
- Bestimmung der HR-Expression auf Proteinebene und Vergleich mit vorhandenen mRNA-Daten
- Bestimmung der Cyclin D1- und pRb-Expression auf Proteinebene
- Bestimmung der HNF-1 β und ARID1A-Expression auf Proteinebene in EC und CCC
- Korrelationen der Marker in den verschiedenen Histotypen mit Schwerpunkt auf der Interaktion der Hormonrezeptorklassen mit den Zellzyklusproteinen
- Untersuchung der prognostischen Relevanz

2 Material

2.1 Patientinnen

Untersucht wurde Tumorgewebe von 234 Frauen, bei denen in den Jahren 1991 bis 2013 die Diagnose eines Ovarialkarzinoms gestellt worden war. Die in Paraffin eingebetteten Proben entstammten allesamt dem Archiv des Instituts für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Es wurden nur solche Fälle eingeschlossen, die einem der drei histologischen Typen HGSC, EC oder CCC zugeordnet worden waren. Es handelte sich in 168 Fällen um HGSC, 35 waren EC und 31 wurden als CCC klassifiziert. Alle Patientinnen hatten sich einer radikalen Operation mit Entfernung von Uterus, Adnexen, iliakalen und paraaortalen Lymphknoten sowie gegebenenfalls Anteilen des Omentum unterzogen.

2.2 Materialien für die Untersuchung

2.2.1 Geräte, Laborhilfen und Verbrauchsmaterialien

In unten stehender Tabelle sind die verwendeten Geräte, Laborhilfen und allgemeinen Verbrauchsmaterialien aufgelistet sowie die jeweilige Firma, von der sie bezogen wurden.

Heizplatte	
Mikrotom	
Mikroskop	Leitz LaborLux S, Wetzlar
PAP Pen	The Binding Site, Birmingham
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schnellkochtopf	Rommelsbacher Germany
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Handschuhe	Terang Nusa, Kotaa Bharu VWR International BVBA, Leuven
Objektträger SuperFrostR Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SafeSeal Gefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tubes	BD Falcon, Franklin Lakes
Vitro-CludR Einschlussmittel	R. Langenbrinck, Emmendingen
Aqua bidest. (Gerät: Milli-Q Plus)	Merck, Darmstadt
Aqua dest. (Gerät: Milli-Q Plus)	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 Vol.-Prozent (MEK)	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-Base)	Merck, Darmstadt

Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TRIS-HCl)	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
TweenR 20 (250 g)	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Avantor Performance Materials, Deventer
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
qRT-PCR-Gerät Stratagene MX 3005P	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Versant kPCR Molecular System SP-Gerät	Siemens, München

Tabelle 2: Geräte, Laborhilfen und Verbrauchsmaterialien

2.2.2 Reagenzien und Puffer für die immunhistochemische Färbung

Die für die immunhistochemische Färbung verwendeten Reagenzien und Puffer samt Herstellerfirmen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Antibody Diluent	
Kit 5001 Detection System - Sekundärantikörper - Streptavidin-Peroxidase - HRP Substrat Puffer - DAB plus Chromogranin	DAKO, Glostrup
Peroxidase-Blocking Solution	DAKO, Glostrup
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Tabelle 3: Reagenzien und Puffer für die immunhistochemische Färbung

2.2.3 Zusammensetzung der Puffer

Die Zusammensetzung der Puffer wird im Folgenden dargestellt.

Zitratpuffer (pH-Wert = 6,0):	3,78 g Zitronensäure 24,21 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad 1000 ml Aqua bidest (Millipore)
TRIS-Puffer (pH-Wert = 7,4):	18 g TRIS-Base 137,0 g TRIS-HCl 175,6 g NaCl ad 2000 ml Aqua bidest (Millipore)

2.2.4 Primärantikörper für die immunhistochemische Färbung

Unten stehende Tabelle zeigt Herkunft, Klonalität und herstellende Firma der benutzten Primärantikörper.

Antikörper gegen	Herkunft, Klonalität	Firma
ER α (SP1)	monoklonal, Kaninchen	Thermo Scientific, Darmstadt

ER β	monoklonal, Maus	GeneTex., Irvine
PR	monoklonal, Maus	DAKO, Glostrup
Cyclin D1 (Clone EP12)	monoklonal, Kaninchen	DAKO, Glostrup
Rb	monoklonal, Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
HNF-1 β	polyklonal, Kaninchen	Merck, Darmstadt
ARID1A	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 4: Primärantikörper

2.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR wurden der Cyclor VIIa7 von ABI und das SuperScriptR III PlatinumR One-Step qRT-PCR-Kit von Invitrogen benutzt sowie folgende Primer- und Sondennukleotide von der Firma Microsynth (Wolfurt-Bahnhof, Österreich) verwendet.

Bezeichnung	Sequenz
RPL37A forward	5'-TGTGGTTCCTGCATGAAGACA-3'
RPL37A reverse	5'-GTGACAGCGGAAGTGGTATTGTAC-3'
RPL37A Sonde	5'-TGGCTGGCGGTGCCTGGA-3'
ESR1 forward	5'-GCCAAATTGTGTTTGATGGATTAA-3'
ESR1 reverse	5'-GACAAAACCGAGTCACATCAGTAATAG-3'
ESR1 Sonde	5'-ATGCCCTTTTGCCGATGCA-3'
PGR forward	5'-AGCTCATCAAGGCAATTGGTTT-3'
PGR reverse	5'-ACAAGATCATGCAAGTTATCAAGAAGTT-3'
PGR Sonde	5'-TTGATAGAAACGCTGTGAGCTCGA-3'

Tabelle 5: Verwendete Primer für die qRT-PCR

3 Methoden

3.1 Auswahl und Validierung der drei Kollektive

Für die EC- und CCC-Kollektive wurde eine neue Datenbank angelegt. Hierfür durchsuchten wir das interne Befundsystem DC Pathos des Institutes für Pathologie der Charité Berlin nach Fällen, in welchen bis einschließlich des Jahres 2013 die Diagnose eines EC oder CCC gestellt worden war.

Für den dritten histologischen Typ, das HGSC, bestand in der Arbeitsgemeinschaft für Translationale Tumorforschung und molekulare Pathologie bereits ein Kollektiv mit Fällen aus den Jahren 1991 bis 2012.

Das Block- und Schnittmaterial der Fälle aller drei Kohorten wurde zusammen mit einer Fachärztin für Pathologie durchgesehen, und die Diagnosen entsprechend der WHO-Klassifikation von 2014 [112] gegebenenfalls reevaluiert. Ein großer Teil der Patientinnen war in das TOC-Netzwerk eingeschlossen worden (Tumorbank Ovarian Cancer, www.toc-network.de). Der wissenschaftlichen Verwendung von Proben und Daten war durch die Ethikkommission der Charité zugestimmt worden (Ethikvotum des TOC, Ethikvotum EA1/139/05).

3.2 Erstellung einer Datenbank

Mit Hilfe von Befunden im DC Pathos und Anfragen beim Landeseinwohneramt wurde eine Datenbank mit pathologischen und klinischen Variablen erstellt. In dieser Datenbank wurden unter anderem Informationen zum FIGO-Stadium, Grading, Tumorrest nach Resektion, Alter, Überleben und Progression der Erkrankung erfasst. Des Weiteren wurde diese Datenbank um die Informationen ergänzt, die durch die im folgenden erklärten Untersuchungen gewonnen werden konnten.

3.3 Manuelle Immunhistochemie

3.3.1 Herstellung der Tissue Micro Arrays (TMA-Schnitte)

Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden durch die Medizinisch Technischen Laborassistentinnen (MTLAs) mit Hilfe des Mikrotoms geschnitten und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Auf diesen markierte die Autorin zusammen mit einer Fachärztin für Pathologie die Tumorareale. Aus den entsprechenden Bereichen in den Paraffinproben stanzten die MTLAs Gewebezylinder heraus, die in einen Akzeptorblock (entspricht TMA)

überführt wurden. Die Akzeptorblöcke umfassten Stanzzyylinder von zehn bis 50 verschiedenen Tumoren. Von den TMA-Blöcken wurden Paraffinschnitte hergestellt. Die so gewonnenen Schnitte wurden mit Angaben zum histologischen Typ, zu färbendem Antikörper und dessen Verdünnungsverhältnis beschriftet.

3.3.2 Ermittlung der geeigneten Verdünnung und Einwirkdauer der Färbung

Für ein aussagekräftiges Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung ist es zum einen wichtig, das geeignete Verdünnungsverhältnis des jeweiligen Primärantikörpers mit Antibody Diluent festzustellen, zum anderen die optimale Einwirkzeit zu kennen, nach der eine für die Auswertung ausreichend intensive Braunfärbung vorliegt, jedoch negative Bereiche (Negativproben, nicht epitheliale Zellen, andere Zellkompartimente) nicht falsch positiv reagieren. Falsch positive Färbeergebnisse können sowohl durch eine zu hohe Konzentration des Antikörpers als auch durch eine zu lange Einwirkzeit der Farbstofflösung vorkommen. Deshalb legten wir im Vorfeld der immunhistochemischen Färbung Reihen mit Verdünnungen von 1:50 bis 1:400 für jeden Primärantikörper am Beispiel von Positivproben an. Die letztlich benutzten Verdünnungsverhältnisse sind in unten stehender Tabelle wiedergegeben.

Primärantikörper	Verdünnungsverhältnis [μ l]
ER α	1:50
Progesteron-Rezeptor	1:50
ER β	1:250
Cyclin D1	1:50
pRb	1:200
ARID1A	1:100
HNF-1 β	1:500

Tabelle 6: Primärantikörper mit Verdünnungsverhältnissen

Die TMAs wurden in einem Testdurchlauf nach dem unter Kapitel 3.3.3 beschriebenen Protokoll gefärbt und die Qualität der Färbung genutzt, um die geeignete Verdünnung für jeden Primärantikörper zu bestimmen. Die Färbequalität wurde im Sinne der Plausibilität beurteilt, zum Beispiel sollte es eine ausschließlich nukleäre Reaktion bei Antikörpern gegen Rezeptoren im Zellkern geben. Indem wir die TMA-Schnitte für definierte, jeweils unterschiedliche Zeiten in der Farblösung beließen, konnten wir im Anschluss mit Hilfe des Mikroskops die Quantität der Färbung, sprich die Färbeintensität, beurteilen und so die optimale Einwirkzeit

für jeden Antikörper finden. Diese betrug für ER α drei Minuten und für alle anderen Biomarker zwei Minuten.

3.3.3 Durchführung der manuellen immunhistochemischen Färbung

Bei einem Anteil der HGSC-Fälle waren Protein- sowie mRNA-Expression der Hormonrezeptoren ER und PR bereits in früheren Projekten bestimmt worden [92, 113]. Alle restlichen HGSC- sowie EC- und CCC-Proben wurden nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit manuell immunhistochemisch untersucht.

Zuerst erfolgte die Entparaffinierung der in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben durch die 20-minütige Waschung in Xylol und anschließendes jeweils einminütiges Eintauchen in einer absteigenden Alkoholreihe (3x100 %, 1x96 %, 1x90%, 1x80%, 3x70%, Aqua bidest) zur Rehydrierung. Die Fixierung in Formalin hatte eine Vernetzung der Proteine und damit auch der Antigenbindungsstellen verursacht, die wieder aufgelöst werden musste. Dazu wurden die Schnitte fünf Minuten lang in einem Schnellkochtopf mit Zitratpuffer (pH 6) gekocht und anschließend unter fließendem Leitungswasser abgekühlt. In der Folge wurde den TMAs für 15 Minuten TBS-Puffer (bestehend aus TRIS-Base, TRIS-HCl, Natriumchlorid und Aqua bidest, pH 7,4) zugesetzt. Im Anschluss wurden die Proben mit einem PAP-Pen umrandet. Nach einer Vorbehandlung mit jeweils drei Tropfen Peroxidasehemmer pro TMA und einer Einwirkzeit von 15 Minuten in einer Feuchtkammer wurden jeweils 200 μ l des Primärantikörpers hinzugegeben und eine Stunde lang bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Danach erfolgte die Spülung mittels TBS-/Tween-Puffer, woraufhin der gebrauchsfertige Sekundärantikörper aus Flasche A des Kits K5001 hinzugegeben werden konnte. Diesmal verblieben die TMA-Schnitte 20 Minuten in der Feuchtkammer und wurden hinterher ebenfalls mit TBS-/Tween-Puffer abgespült. Nun wurde die gebrauchsfertige Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben und die TMA-Schnitte wiederum für 20 Minuten in der Feuchtkammer belassen. Im Anschluss wurde der Farbstoff Chromogranin, bestehend aus 4 μ l Chromogen und 200 μ l Chromograninpuffer pro Schnitt, auf die TMA-Schnitte pipettiert. Die Farbreaktion wurde nach der für jeden Antikörper im Vorfeld bestimmten Einwirkzeit mit Aqua bidest abgestoppt. Für ER α betrug sie drei Minuten, für alle anderen Antikörper zwei Minuten. Für die blaue Gegenfärbung der Kerne wurden die TMA-Schnitte für drei Minuten in Hämalaun belassen und schließlich für zehn Minuten unter fließendem lauwarmen Wasser. Diese Reaktion wurde ebenfalls durch Aqua bidest gestoppt. Zum Schluss wurden die TMA-Schnitte durch die oben aufgeführten

Alkoholreihe in aufsteigender Reihenfolge geführt und aus der letzten Xylol-Küvette heraus mit Hilfe von VitroClud eingedeckt. Nach Lufttrocknung wurden die Schnitte eingescannt und digitalisiert.

3.3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die digitalisierten TMA-Schnitte wurden mit dem VM Slide Explorer 2009 Software (VM Scope GmbH, Berlin) am Bildschirm ausgewertet. Die Annotation von jeweils zwei Spots zu einem Fall erfolgte automatisiert durch das Programm, wurde visuell auf ihre Richtigkeit überprüft und gegebenenfalls manuell verbessert. Felder mit Lebergewebe sowie Leerfelder als Orientierungspunkte befanden sich an definierten Positionen.

Die Auswertung erfolgte durch eine Fachärztin für Pathologie des Institutes für Pathologie der Charité. Für jedes Feld wurde die Gewebequalität bestimmt, wobei eine zufriedenstellende Probe einen aus pathologischer Sicht ausreichenden Gehalt an gut beurteilbaren Tumorzellen enthalten sollte. Ungeeignet wären Proben ohne oder mit lediglich wenigen Tumorzellen und solche ohne Gewebe. Diese vereinzelt Fälle wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Daraufhin folgte die Bestimmung des Färbemusters (nukleär und/oder zytoplasmatisch), die im Hinblick auf Plausibilität beurteilt wurde. Der Anteil der positiven Zellen an allen Tumorzellen des Feldes wurde eingeschätzt und zunächst in Zehnerschritten gruppiert. Später wurde für die Berechnung des IRS eine Einteilung in fünf Kategorien vorgenommen (siehe Tabelle 7).

Die Färbungen wurden bezüglich ihrer Intensität in vier Gruppen eingeordnet: negativ, schwach, mäßig und stark positiv.

Die Cutoffs der Zellzyklusproteine sowie von ARID1A und HNF-1 β wurden mit Hilfe des IRS (Immunreaktiver Score) im Vorfeld weiterer statistischer Auswertungen festgelegt. Der IRS ist eine ordinale Bewertungsgröße, die bisher vor allem zur Quantifizierung von ER und PR auf Tumorzellen der Brustdrüse verwendet wurde. Er ist das Produkt von Punktwerten jeweils für die Intensität der immunhistochemischen Färbung sowie den prozentualen Anteil der gefärbten Kerne an allen Kernen im TMA und kann folgende Werte annehmen: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12. Zum Beispiel: Mäßige Färbeintensität (2) multipliziert mit einer Anfärbung von 60 % der Zellen (3) = IRS 6. Einen Überblick zeigt die folgende Tabelle.

Färbeintensität	Positive Zellen [%]	IRS
0 = keine Reaktion	0 = keine	0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 oder 12
1 = schwache Reaktion	1 = 1 bis 10 %	
2 = mäßige Reaktion	2 = 11 bis 50 %	
3 = starke Reaktion	3 = 51 bis 80 %	
	4 = 81 bis 100 %	

Tabelle 7: Berechnung des IRS

Bei den Untersuchungen wurde zwischen unterschiedlichen subzellulären Expressionsmustern unterschieden. Alle Berechnungen wurden für die nukleäre und zytoplasmatische Expression getrennt durchgeführt. Die so erhobenen Daten wurden von uns unter kategorialen beziehungsweise ordinalen Variablen in die Datenbank eingespeist.

3.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Für einen Teil der HGSC-Fälle hatte unsere Arbeitsgruppe bereits in früheren Studien die qRT-PCR-Daten bestimmt [92, 113]. Wir haben diese Daten auf Korrelationen mit den von uns in der vorliegenden Studie erhobenen immunhistochemischen Daten untersucht. Deshalb wird im Folgenden lediglich ein Überblick über die Methode der qRT-PCR und das verwendete Protokoll gegeben. Im Falle signifikanter Ergebnisse wären an weiteren Fällen mRNA-Analysen durchgeführt worden.

3.4.1 Das Verfahren

Mit dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist die exponentielle Amplifizierung ausgewählter Nukleinsäureabschnitte mittels Oligonukleotiden (Primer), deren Sequenz komplementär zur Sequenz der zu untersuchenden Abschnitte sind, möglich. Bei der herkömmlichen PCR handelt es sich um ein Endpunkt-Verfahren, bei dem die Beurteilung des Produktes erst nach Abschluss der PCR möglich ist. Im Gegensatz dazu wird bei der qRT-PCR das entstandene Produkt nach jedem erfolgten Zyklus gemessen. Die hierfür verwendeten TaqMan-Sonden sind Oligonukleotide, die komplementär zu einem Abschnitt des zu amplifizierenden Stranges sind. Dieser Abschnitt liegt zwischen dem Vorwärts- und Rückwärtsprimer. Das 5'-Ende ist mittels einer zusätzlichen Hybridisierung mit einem Reporterfarbstoff markiert, dessen Fluoreszenz durch einen am 3'-Ende befindlichen Quencherfarbstoff und einen Phosphatrest unterdrückt wird. Während des PCR-Zyklus wird der entstehende Strang durch die Taq-Polymerase verlängert und durch

deren 5'-Exonuklease-Aktivität der Reporterfarbstoff am 5'-Ende hydrolytisch abgespalten. Dadurch entfernt er sich vom Quencherfarbstoff und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Dieses ist proportional zum entstandenen PCR-Produkt und wird am Ende jedes Zyklus ermittelt. Als Reporterfarbstoff wurde 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und als Quencherfarbstoff 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) verwendet. Die RNA-Isolation erfolgte aus FFPE-Proben mit einem mindestens fünfzigprozentigem Tumorgehalt. Die Überprüfung der entstandenen PCR-Produkte war mittels der Kettenabbruchsynthesemethode durch eine externe Firma erfolgt.

3.4.2 Das qRT-PCR-Protokoll

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA fand unmittelbar vor der eigentlichen Amplifikation statt und erfolgte über 30 Minuten bei 50°C. Darauf folgten zwei Minuten bei 95°C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, im Anschluss 40 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung sowie 30 Sekunden bei 60°C zur Hybridisierung der Primer und Elongation des neuen Stranges. Nach jedem Zyklus wurde bei 60°C das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Resultate konnten nach Abschluss der qRT-PCR mit dem Programm MxPro (Version 4.01, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) betrachtet werden.

3.4.3 Berechnung des Δ CT-Wertes

Im Verlauf der qRT-PCR vervielfältigen sich die Produkte mit jedem Zyklus exponentiell und in proportionalem Maße steigt ebenfalls das Fluoreszenzsignal an. Der Cycle of Threshold (CT) bezeichnet den Zyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal der Probe einen bestimmten Schwellenwert über die Hintergrundfluoreszenz (den Ausgangswert) hinaus überschreitet. Dieser Punkt wird bei größeren Mengen an PCR-Produkt in einer Probe früher erreicht.

Um die Expressionslevel der Marker auch bei unterschiedlichen mRNA-Gehalten vergleichen zu können, war für jede Probe ein so genanntes Housekeeper-Gen als Referenz mitgemessen worden. Dafür war das Referenzgen ribosomal protein 37A (RPL37A) genutzt worden, das unabhängig von Zellyklus oder äußeren Einflüssen exprimiert wird.

Alle Messungen waren als Doppelwertbestimmungen durchgeführt worden. Es war der Mittelwert errechnet und durch Subtraktion des CT-Mittelwertes des Referenzgens vom CT-Mittelwert des Zielgens der normalisierte Δ CT-Wert ermittelt worden. Da sich dieser Wert umgekehrt proportional zum gebildeten PCR-Produkt verhält und somit sehr klein ausfallen kann, wurde der $40-\Delta$ CT-Wert verwendet.

3.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde durch die Autorin mit dem Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Version 22 (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau (Fehler 1. Art) wurde für alle statistischen Tests mit $p \leq 0,050$ festgesetzt. Univariate Zusammenhänge zwischen gruppierten Proteinexpressionsdaten und klinisch-pathologischen Kategorien wurden mit Pearsons χ^2 -Test oder dem Exakten Test nach Fisher untersucht. Berechnungen mit kontinuierlichen mRNA-Daten erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Prognostische Zusammenhänge wurden mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt. Die Auswertung erfolgte an Hand eines statistischen Analyseplans.

4 Ergebnisse

4.1 Überblick über das Kollektiv

4.1.1 HGSC

Insgesamt 168 primäre HGSC standen für eine Untersuchung zur Verfügung. Die klinisch-pathologischen Merkmale dieser Kohorte zeigt unten stehende Tabelle. Die Mehrheit der Tumoren befand sich in einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium. Alle Patientinnen hatten sich einer radikalen Operation unterzogen und in 44 Fällen blieb dabei ein makroskopisch sichtbarer Resttumor zurück. Von 140 Patientinnen, über deren medikamentöse Therapie Daten zu erheben waren, hatten 135 eine Platin-haltige Chemotherapie erhalten, drei Frauen hatten Therapeutika ohne Platin bekommen und zwei hatten keine Chemotherapie erhalten.

Bis zum August 2013 zeigten von 148 Patientinnen, zu denen Daten zu erheben waren, 105 Patientinnen (70,9 %) ein Fortschreiten der Erkrankung. Das mediane progressionsfreie Überleben lag bei 18,9 Monaten.

Bis August 2013 waren 94 Patientinnen verstorben (56 %). Das mediane Überleben lag bei 38,6 Monaten.

Merkmal	Häufigkeit	gültige Prozent von 168 [%]
Alter		
< 60 Jahre	85	50,6
≥ 60 Jahre	83	49,4
fehlend	0	
FIGO-Stadium		
I-II	19	11,3
III-IV	149	88,7
fehlend	0	
Fernmetastasen		
pM0	149	88,7
pM1	19	11,3
pMx / fehlend	0	
Nodalstatus		
pN0	47	35,6
pN1	85	64,4
pNx / fehlend	36	

Merkmal	Häufigkeit	gültige Prozent von 168 [%]
Tumorrest nach OP		
kein Resttumor	84	65,6
Resttumor	44	34,4
fehlend	40	
Chemotherapie		
Platin-haltig	135	96,4
andere Therapeutika	3	2,1
keine	2	1,4
fehlend	28	

Tabelle 8: Überblick über klinisch-pathologische Merkmale im HGSC-Kollektiv

4.1.2 EC

Die klinisch-pathologischen Merkmale der 35 Tumoren mit endometrioider Histologie sind in unten stehender Tabelle dargestellt. Die Mehrzahl der Patientinnen befand sich in einem frühen FIGO-Stadium. Die meisten Karzinome waren mäßig differenziert nach Silverberg. Auch hier hatten sich alle Patientinnen einer radikalen Operation unterzogen. Alle neun Patientinnen ab FIGO-Stadium II, zu denen uns Informationen vorlagen, zeigten nach der Operation keinen makroskopischen Tumorrest. Von den 19 Patientinnen, deren medikamentöse Therapie wir dokumentiert fanden, waren 18 (94,7 %) mit einer platinhaltigen Chemotherapie behandelt worden.

Uns lagen nur zu zwei Patientinnen Informationen zum Progressionsstatus vor und diese zeigten jeweils kein Fortschreiten der Erkrankung bis zum August 2013.

Bis zum August 2013 waren 13 von 30 Patientinnen (43,3 %) verstorben, fünf Patientinnen waren umgezogen und daher für die Datenerhebung verloren. Das mediane Überleben betrug 33,7 Monate.

Merkmal	Häufigkeit	gültige Prozent von 35 [%]
Alter		
< 60 Jahre	18	52,9
≥ 60 Jahre	16	47,1
fehlend	1	
FIGO-Stadium		
I-II	21	63,6
III-IV	12	36,4
fehlend	2	

Merkmal	Häufigkeit	gültige Prozent von 35 [%]
Grading		
G1	4	12,9
G2	21	67,7
G3	6	19,4
fehlend	4	
Fernmetastasen		
pM0	6	66,7
pM1	3	33,3
pMx / fehlend	26	
Nodalstatus		
pN0	17	70,8
pN1	7	29,2
pNx / fehlend	11	
Tumorrest nach OP		
kein Resttumor	15	100,0
Resttumor	0	0,0
fehlend	20	
Chemotherapie		
Platin-haltig	18	94,7
andere Therapeutika	0	0,0
keine	1	5,3
fehlend	16	

Tabelle 9: Überblick über die klinisch-pathologischen Merkmale im EC-Kollektiv

4.1.3 CCC

Die CCC-Kohorte bestand aus 31 Karzinomen, deren klinisch-pathologische Merkmale in unten stehender Tabelle aufgelistet sind. Hierbei findet das Silverberg-Grading keine Erwähnung, da gemäß WHO die CCC grundsätzlich als G3, also schlecht differenziert, eingestuft werden. Bei 37,9 % war zum Zeitpunkt der Diagnose ein fortgeschrittenes FIGO-Stadium festgestellt worden. Alle Patientinnen hatten sich einer radikalen Operation unterzogen und nur in einem von neun informativen Fällen (11,1 %) ab FIGO-Stadium II konnte hierdurch keine makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden. Es war uns möglich, über die medikamentöse Therapie von 17 Patientinnen Informationen zu erlangen, wobei rund 15 (88 %) mit platinhaltigen Chemotherapeutika behandelt worden waren, eine Patientin (5,9 %) erhielt ein nicht platinhaltiges Medikament und eine (5,9 %) wurde nicht chemotherapeutisch behandelt. Uns lagen keinerlei Informationen zum Progressionsstatus vor.

Bis zum August 2013 waren acht Patientinnen (33,3 %) verstorben, 16 (66,7 %) lebten noch und über die restlichen sieben waren keine Informationen zu erhalten. Das mediane Überleben betrug 32,5 Monate.

Merkmal	Häufigkeit	Prozent von 31 [%]
Alter		
< 60 Jahre	13	43,3
≥ 60 Jahre	17	56,7
fehlend	1	
FIGO-Stadium		
I-II	18	62,1
III-IV	11	37,9
fehlend	2	
Fernmetastasen		
pM0	7	87,5
pM1	1	12,5
pMx / fehlend	23	
Nodalstatus		
pN0	14	60,9
pN1	9	39,1
pNx / fehlend	8	
Tumorrest nach OP		
kein Resttumor	16	94,1
Resttumor	1	5,9
fehlend	14	
Chemotherapie		
Platin-haltig	15	88,2
andere Therapeutika	1	5,9
keine	1	5,9
fehlend	14	

Tabelle 10: Überblick über die klinisch-pathologischen Merkmale im CCC-Kollektiv

4.1.4 Übersicht über informative Fälle

Die folgende Tabelle informiert über die jeweilige Anzahl an Fällen je histologischem Typ, zu denen wir bei unseren immunhistochemischen Untersuchungen verwertbare Informationen erhielten. Die Lücken zeigen an, welche Biomarker in der jeweiligen Kohorte nicht untersucht wurden.

Marker	HGSC [N]	EC [N]	CCC [N]
ER α	163	35	31
PR	151	34	31
HR-Status	148	34	31
ER β		35	31
pRb	161	35	29
Cyclin D1	150	35	31
ZP-Status	143	35	29
HNF-1 β		34	31
HNF-1 β Status		34	29
ARID1A		32	31

Tabelle 11: Anzahl der informativen Fälle pro histologischem Typ

4.2 Die Expression der Hormonrezeptoren

Für einen Teil unseres HGSC-Kollektives standen Daten zur mRNA-Expression von ESR1 und PGR sowie zur Proteinexpression von ER α und PR aus früheren Projekten zur Verfügung [92, 113]. Zu einem späteren Zeitpunkt neu in das Kollektiv aufgenommene HGSC wurden für das hier beschriebene Projekt immunhistochemisch im Hinblick auf die ER α - und PR-Expression untersucht. In den neu erstellten EC- und CCC-Kollektiven bestimmten wir immunhistochemisch die Proteinexpression von ER α , PR und ER β . Wir bestimmten den Hormonrezeptorstatus, der darstellt, wie viele Tumoren weder ER α noch PR, jeweils einen dieser beiden Hormonrezeptoren oder beide zugleich exprimierten.

Die Abbildungen 1 bis 3 zeigen beispielhaft die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen diese Hormonrezeptoren in EC. Für die HGSC untersuchten wir zusätzlich eventuelle Zusammenhänge mit den früher bestimmten ESR1 und PGR auf mRNA-Ebene.

4.2.1 Verteilung der HR-Expression auf Proteinebene

In Anlehnung an unsere Vorarbeiten [92] legten wir für die Auswertung der immunhistochemischen Daten im Vorfeld fest, dass bei jedem Hormonrezeptor eine Anfärbung von mehr als 10 % der Zellen einer positiven Expression entspräche. Die unten stehende Tabelle gibt einen Überblick darüber, in welcher Weise sich die Histotypen in unserer Kohorte bezüglich ihres Expressionsmusters der Hormonrezeptoren auf Proteinebene unterschieden. Im X²-Test zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Histotypen für ER α , PR, HR-Status ($p < 0,001$) und die zytoplasmatische Proteinexpression von ER β

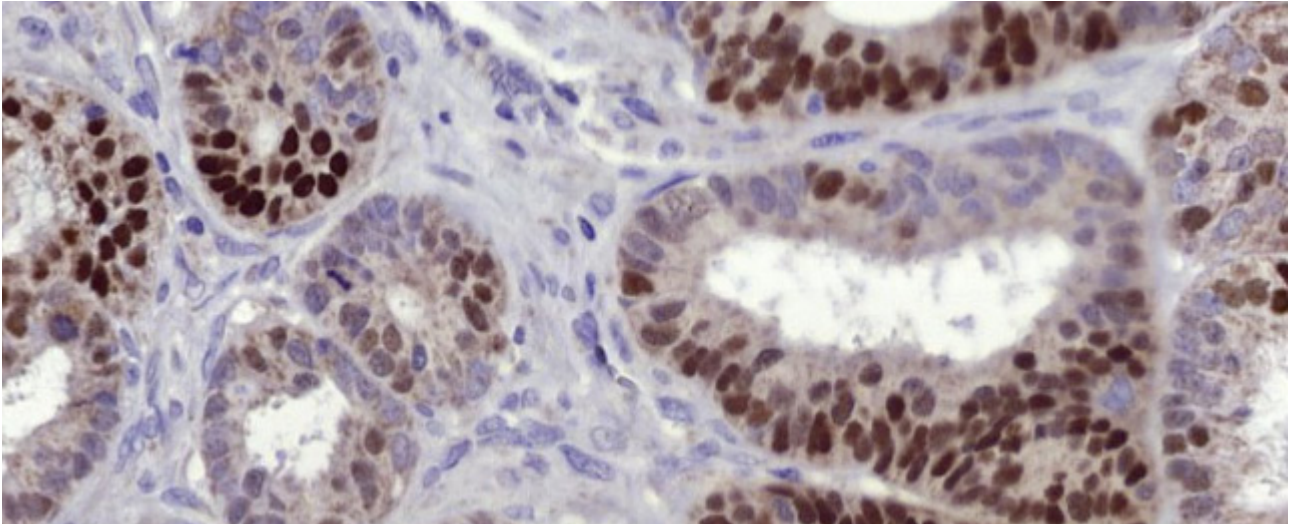


Abbildung 1: Nukleäre Expression von ER α in EC

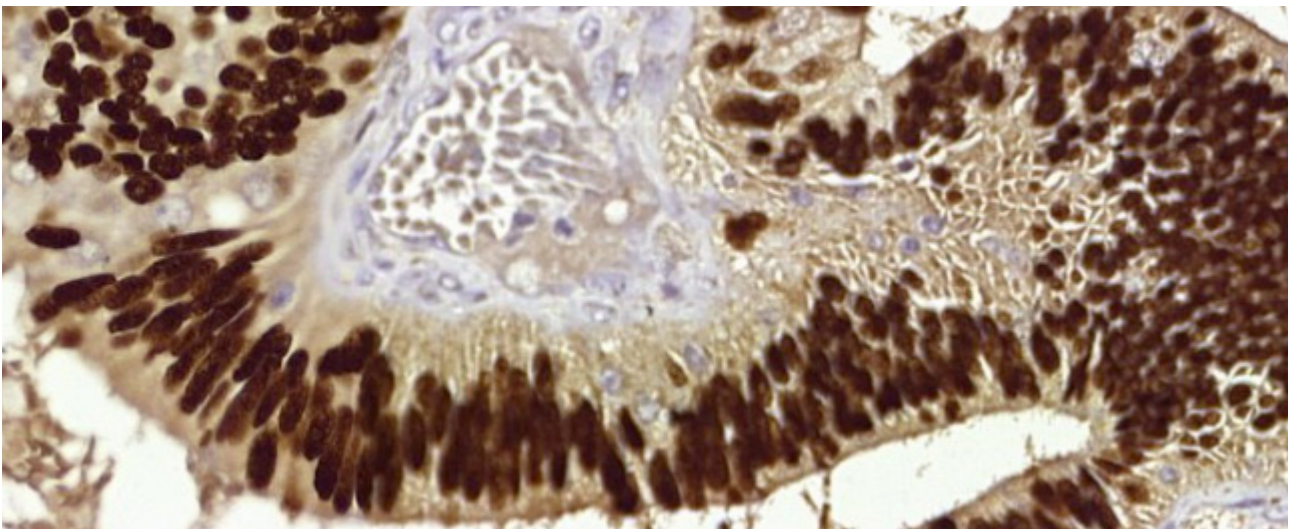


Abbildung 2: Nukleäre Expression von PR in EC

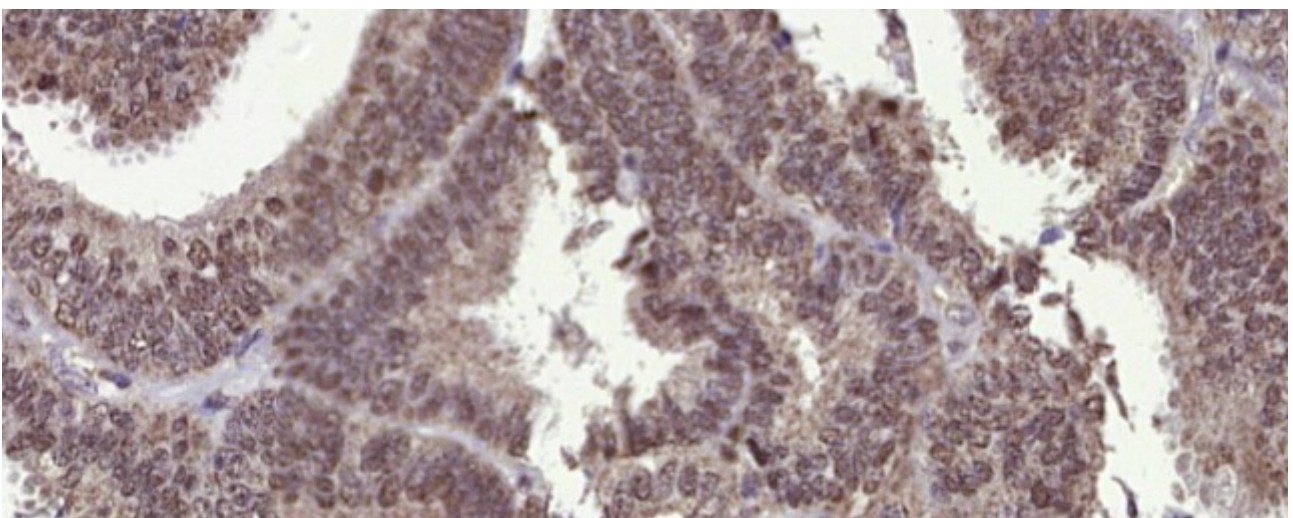


Abbildung 3: Schwache nukleäre und zytoplasmatische Expression von ER β in EC

($p=0,006$). Für das nukleär exprimierte ER β fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,265$).

Biomarker	HGSC	EC	CCC	Signifikanz
ER α				$p<0,001$ *
positiv	110 (67,5%)	20 (57,1%)	4 (12,9%)	
negativ	53 (32,5%)	15 (42,9%)	27 (87,1%)	
Gesamtanzahl	163	35	31	
PR				$p<0,001$ *
positiv	22 (14,6%)	27 (79,4%)	3 (9,7%)	
negativ	129 (85,4%)	7 (20,6%)	28 (90,3%)	
Gesamtanzahl	151	34	31	
ER β nukleär	nicht bestimmt			$p=0,265$
positiv		29 (82,9%)	29 (93,5%)	
negativ		6 (17,1%)	2 (6,5%)	
Gesamtanzahl		35	31	
ER β zytoplasmatisch	nicht bestimmt			$p=0,006$
positiv		21 (60,0%)	28 (90,3%)	
negativ		14 (40,0%)	3 (9,7%)	
Gesamtanzahl		35	31	

Tabelle 12: HR-Expression im Vergleich der histologischen Typen

*: p -Wert mit X^2 -Test berechnet, ansonsten mit Fishers exaktem Test. Signifikante Ergebnisse fett hervorgehoben.

Über zwei Drittel der HGSC exprimierten ER α , jedoch nur 22 Fälle (14,6 %) waren positiv für PR. Im zusammengefassten HR-Status exprimierten 48 Tumoren (32,4 %) keinen dieser beiden Hormonrezeptoren, 21 Fälle (14,2 %) waren sowohl für ER α als auch PR positiv. ER α und PR korrelierten signifikant miteinander ($p=0,001$, Fishers exakter Test).

In den EC zeigte sich eine positive Anfärbung gegen alle Hormonrezeptoren in der Mehrheit der Fälle, wobei hier vor allem die PR-Expression mit 27 Fällen (79,4 %) und die nukleäre ER β -Expression mit 29 Fällen (82,9 %) führend waren. Im HR-Status exprimierten nur sechs Fälle (17,6 %) weder ER α noch PR, jedoch 18 Fälle (52,9 %) beide gleichzeitig. ER α und PR korrelierten signifikant miteinander ($p=0,028$, Fishers exakter Test) und jeweils mit dem HR-Status ($p<0,001$, X^2 -Test). Mit ER β korrelierte weder ER α ($p=0,367$ bzw. $p=0,511$, Fishers exakter Test) noch PR ($p=0,268$ bzw. $p=1,000$, Fishers exakter Test). Das nukleäre ER β korrelierte signifikant mit dem HR-Status ($p=0,010$, X^2 -Test) und mit der zytoplasmatischen Expression von ER β ($p=0,028$, Fishers exakter Test). Das zytoplasmatische ER β korrelierte nicht mit dem HR-Status ($p=0,729$, X^2 -Test).

Die CCC waren größtenteils negativ für die beiden etablierte Hormonrezeptoren, wobei lediglich vier Tumoren (12,9 %) ER α und drei (9,7 %) PR exprimierten. Im vergleichenden HR-Status zeigte sich, dass 26 Fälle (83,9 %) negativ sowohl für ER α als auch PR waren und lediglich zwei Tumoren (6,5 %) beide exprimierten. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine sehr häufige, nukleäre und zytoplasmatische immunhistochemische Anfärbung gegen ER β in 93,5 respektive 90,3 % der Fälle. ER α und PR korrelierten statistisch signifikant miteinander ($p=0,037$, Fishers exakter Test) und jeweils mit dem HR-Status ($p<0,001$, X²-Test), nicht jedoch mit ER β (unabhängig von der subzellulären Lokalisation $p=1,000$ in Fishers exaktem Test). ER β korrelierte weder mit dem HR-Status ($p=0,938$ bzw. $p=0,888$, X²-Test) noch in seinen subzellulären Lokalisationen ($p=1,000$, Fishers exakter Test).

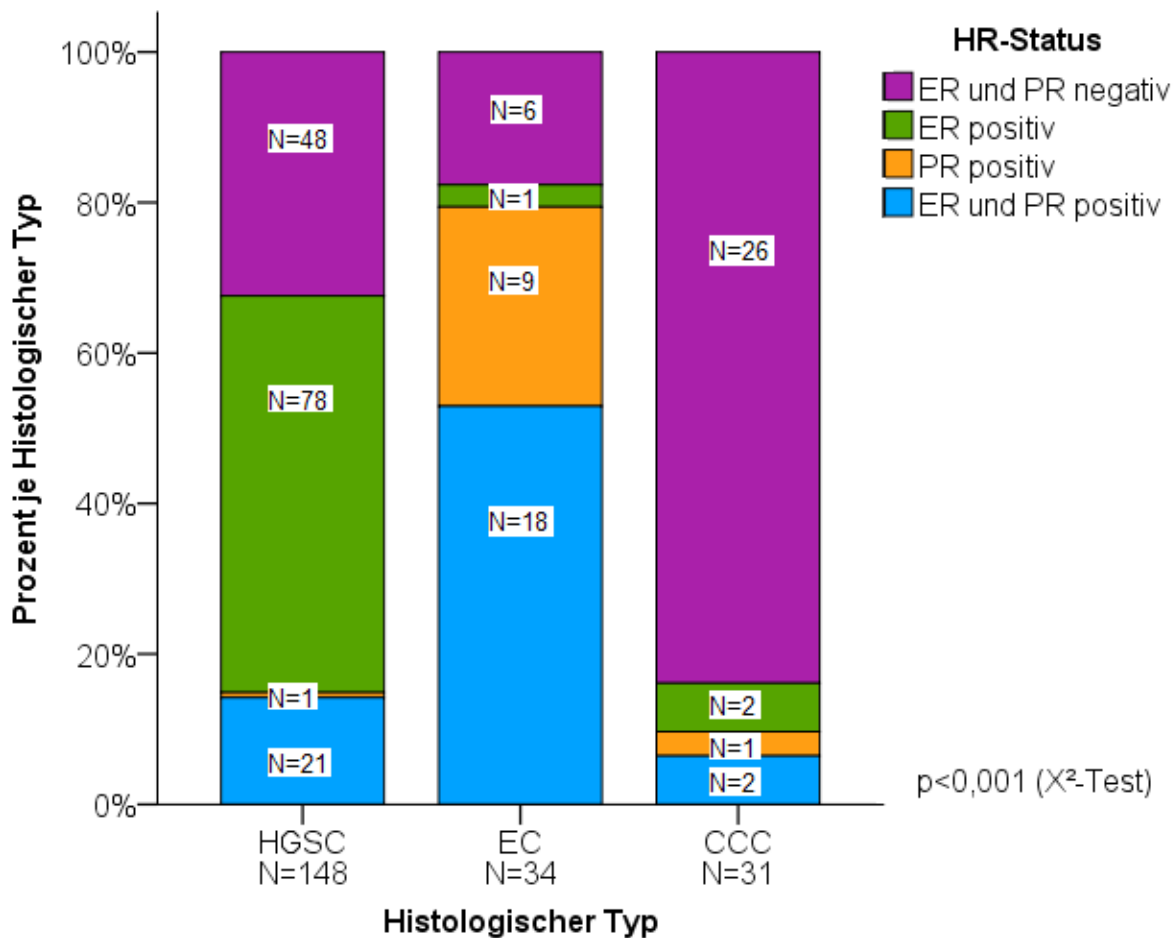


Abbildung 4: HR-Status auf Proteinebene

Weiterhin wurde untersucht, ob ein nicht zufälliger Zusammenhang bestand zwischen den klassischen HR und folgenden klinisch-pathologischen Parametern: Alter (Cutoff 60 Jahre), FIGO-Stadium (frühe versus fortgeschrittene Stadien), Silverberg-Grading und makroskopischer Tumorrest nach Operation. Unten stehende Tabelle zeigt die Ergebnisse. In den EC konnte kein Zusammenhang mit dem Tumorrest berechnet werden, da alle gültigen Fälle in dieselbe Kategorie (kein makroskopischer Tumorrest) fielen.

p-Werte (Fishers exakter Test)	HGSC		EC		CCC	
	ER α	PR	ER α	PR	ER α	PR
Alter (<60 J. / \geq 60 J.)	0,245	0,036	0,487	0,085	1,000	0,238
pN	1,000	0,579	1,000	1,000	0,142	1,000
pM	0,121	1,000	0,083	0,375	-	-
FIGO (I-II / III-IV)	0,112	0,716	0,716	1,000	0,539	1,000
Grading			0,189 *	0,361 *	-	-
Tumorrest	0,834	0,783	-	-	1,000	1,000

Tabelle 13: Korrelation von ER α und PR mit klinisch-pathologischen Parametern

*: p-Wert mit X^2 -Test berechnet, ansonsten mit Fishers exaktem Test. Signifikante Ergebnisse fett hervorgehoben.

ER β korrelierte weder in seiner nukleären noch in seiner zytoplasmatischen Expression mit Alter, Silverberg-Grading oder FIGO-Stadium (jeweils $p > 0,050$).

4.2.2 Expression von ESR1 und PGR auf mRNA-Ebene in HGSC

Die Expression von ESR1 und PGR auf mRNA-Ebene war für einen Teil des HGSC-Kollektivs bereits in früheren Projekten bestimmt worden [92, 113]. Das Expressionslevel von ESR1 reichte von 29,58 bis 36,42 $40-\Delta\text{CT}$. Der Mittelwert lag bei 34,079 mit einem Konfidenzintervall zwischen 33,726 und 34,431 sowie einer Standardabweichung von 1,58 und einer Varianz von 2,51. Der Median wurde mit 34,360 berechnet und der Interquartilbereich betrug 2,05. Der Test nach Shapiro-Wilk erbrachte keine Normalverteilung ($p < 0,001$).

Das Expressionslevel von PGR lag zwischen 26,00 und 33,58 $40-\Delta\text{CT}$, wobei der Mittelwert bei 28,907 mit einer Standardabweichung von 1,897 und einer Varianz von 3,600 lag. Das 95 %-Konfidenzintervall lag zwischen 28,225 und 29,472. Der Median betrug 28,683 und der Interquartilbereich wurde mit 2,93 bestimmt. Der Test nach Shapiro-Wilk zeigte eine Normalverteilung ($p = 0,190$).

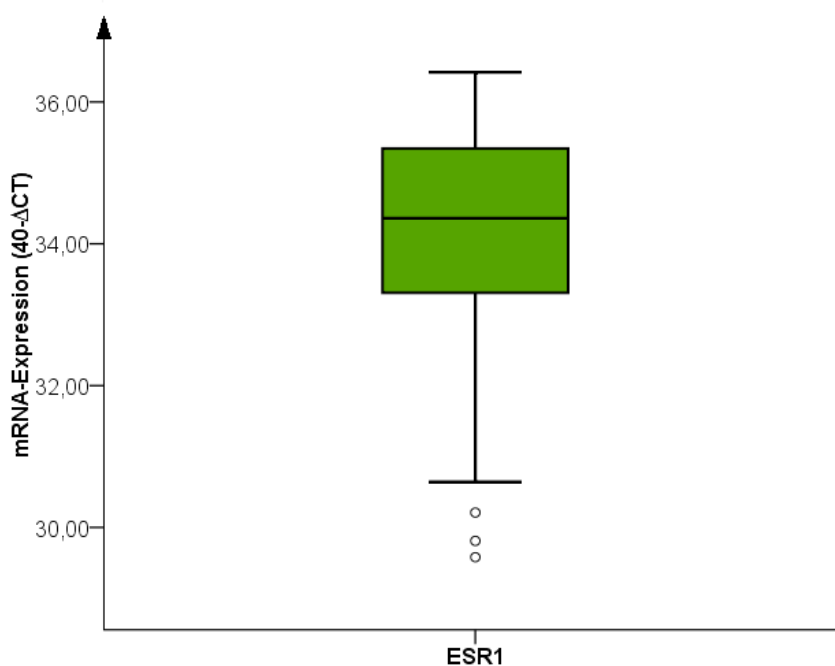


Abbildung 5a: $40-\Delta\text{CT}$ -Verteilung von ESR1 in HGSC

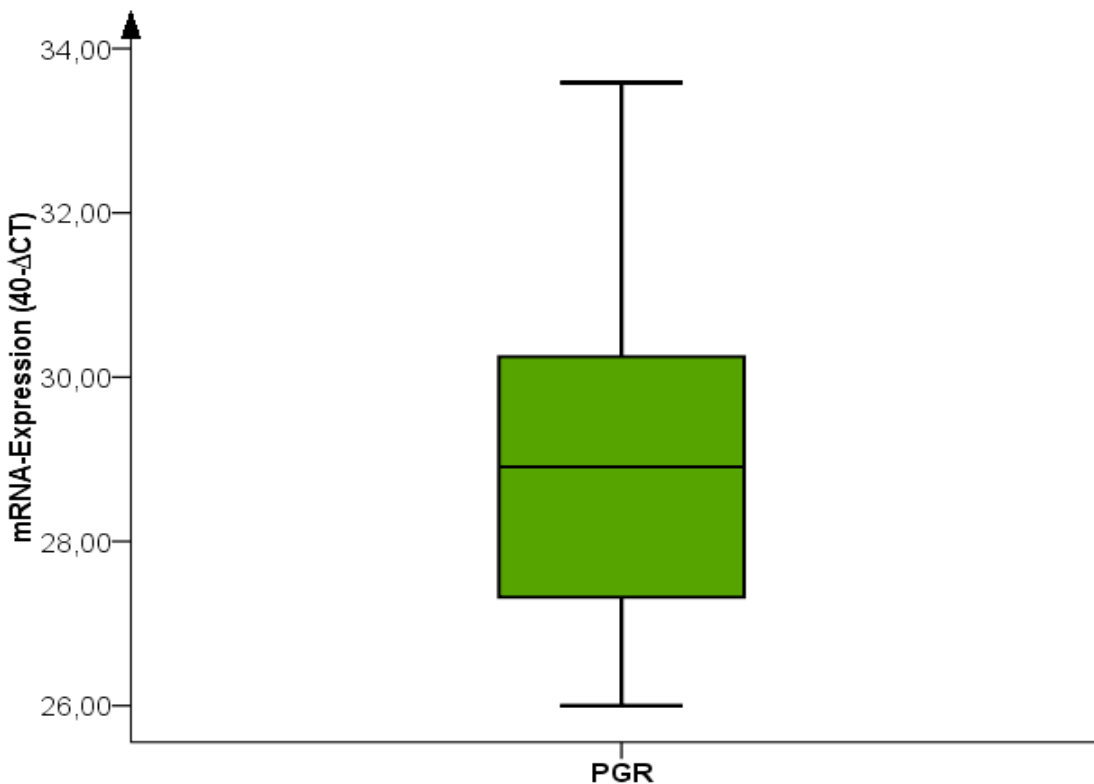


Abbildung 5b: 40- Δ CT-Verteilung von PGR in HGSC

Innerhalb der Boxen des Boxplot-Diagramms befinden sich 50 % der 40- Δ CT-Werte für den jeweiligen Hormonrezeptor; die durchgezogenen Linien entsprechen dem medianen 40- Δ CT-Wert. Die Antennen stellen die 5-96 %-Perzentilen dar und die Kreise Ausreißer. Die HGSC zeigten insgesamt höhere 40- Δ CT-Werte für ESR1 mRNA als für die PGR mRNA.

4.2.3 Vergleich der HR-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene

39 Fälle (50,0 %) wiesen eine ESR1-Expression auf, die unterhalb des Medians lag. Von diesen waren wiederum 23 (59,0 %) immunhistochemisch negativ, 16 Fälle (41,0 %) zeigten jedoch eine positive Proteinexpression. Von den 39 Proben (50,0 %), bei denen eine mRNA-Expression oberhalb des Medians festgestellt wurde, waren 31 (79,5 %) auch auf Proteinebene nachweislich positiv, die restlichen acht (20,5 %) in der Immunhistochemie negativ trotz positiver mRNA-Expression ($p < 0,001$).

20 Fälle von 38 (52,6 %) zeigten eine PGR-Expression unter dem Median und bei diesen war zu 100 % keine Proteinexpression mittels Immunhistochemie nachzuweisen. Von den 18 Fällen (47,4 %) mit PGR-Expression oberhalb des Medians war nur ein einziger (5,6 %) auch auf Proteinebene positiv für PR, die restlichen 17 (94,4 %) negativ ($p = 0,474$).

4.2.4 Hormonrezeptoren und Prognose in HGSC

Um zu prüfen, ob sich der von unserer Arbeitsgruppe vorgeschriebene prognostische Wert der ESR1- und PGR-Expression in unserem HGSC-Kollektiv mit den vorhandenen mRNA-Daten reproduzieren ließ, führten wir Überlebensanalysen durch. Als Cutoff für die mRNA-Expression wurde jeweils der Median gewählt. Folglich lag der Cutoff für ESR1 bei 34,36 $40\text{-}\Delta\text{CT}$ und für PGR bei 28,91 $40\text{-}\Delta\text{CT}$. In Kaplan-Meier-Überlebensanalysen korrelierte das Gesamtüberleben in HGSC im Log-Rank-Test statistisch signifikant mit ESR1 $40\text{-}\Delta\text{CT}$ ($p=0,004$), wobei eine höhere ESR1-Expression mit einer besseren Prognose assoziiert war (Abbildung 6). Es zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit ER α ($p=0,058$), PGR $40\text{-}\Delta\text{CT}$ ($p=0,153$, Abbildung 7) oder PR. $p=0,899$).

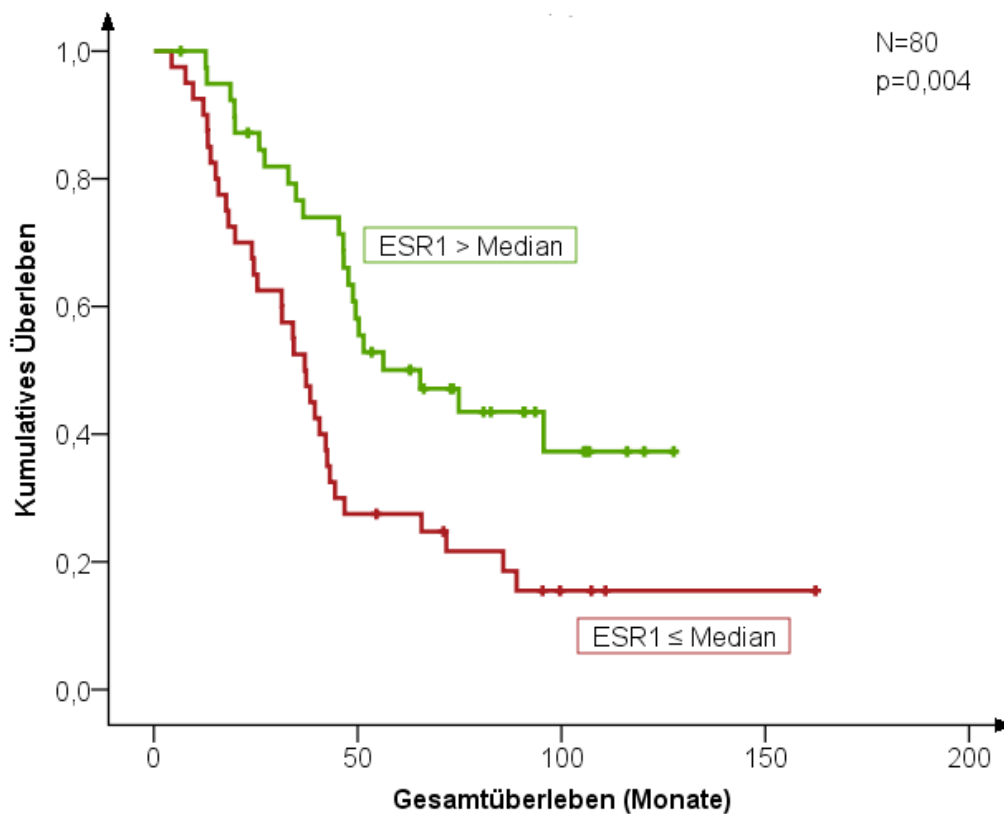


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse für ESR1 $40\text{-}\Delta\text{CT}$ in HGSC

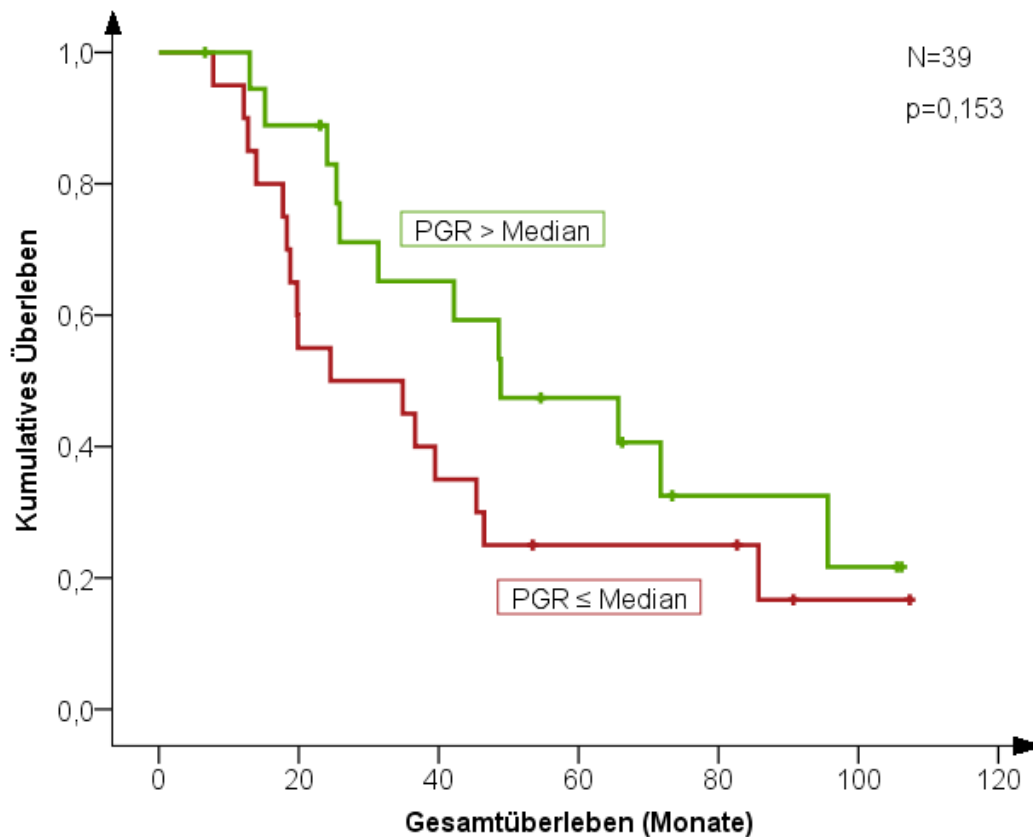


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse für PGR 40- Δ CT in HGSC

Eine höhere ESR1-Expression war weiterhin mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert ($p=0,046$). Das progressionsfreie Überleben korrelierte statistisch nicht signifikant mit PGR ($p=0,085$), ER α ($p=0,256$) oder PR ($p=0,736$). PGR-mRNA zeigte also insgesamt keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose. Allerdings standen uns hierzu auch nur Daten in kleiner Fallzahl ($N=39$) zur Verfügung.

4.3 Die Zellzyklusproteine Cyclin D1 und pRb

4.3.1 Cutoff-Bestimmung

Da es noch keine etablierten Cutoff-Punkte für die Zellzyklusproteine gab, untersuchten wir zunächst die Expression über alle Fälle an Hand des IRS (unten stehende Abbildungen). Es zeigte sich, dass der Großteil aller Tumoren die Zellzyklusproteine nicht oder nur in geringem Ausmaß exprimierte. Darum entschieden wir uns, für unsere weiteren Untersuchungen jeweils einen IRS ab 6 als positive und IRS-Werte von 0 bis 4 als negative/geringe Expression zu werten. Letztere werden im weiteren Verlauf als „negativ“ bezeichnet.

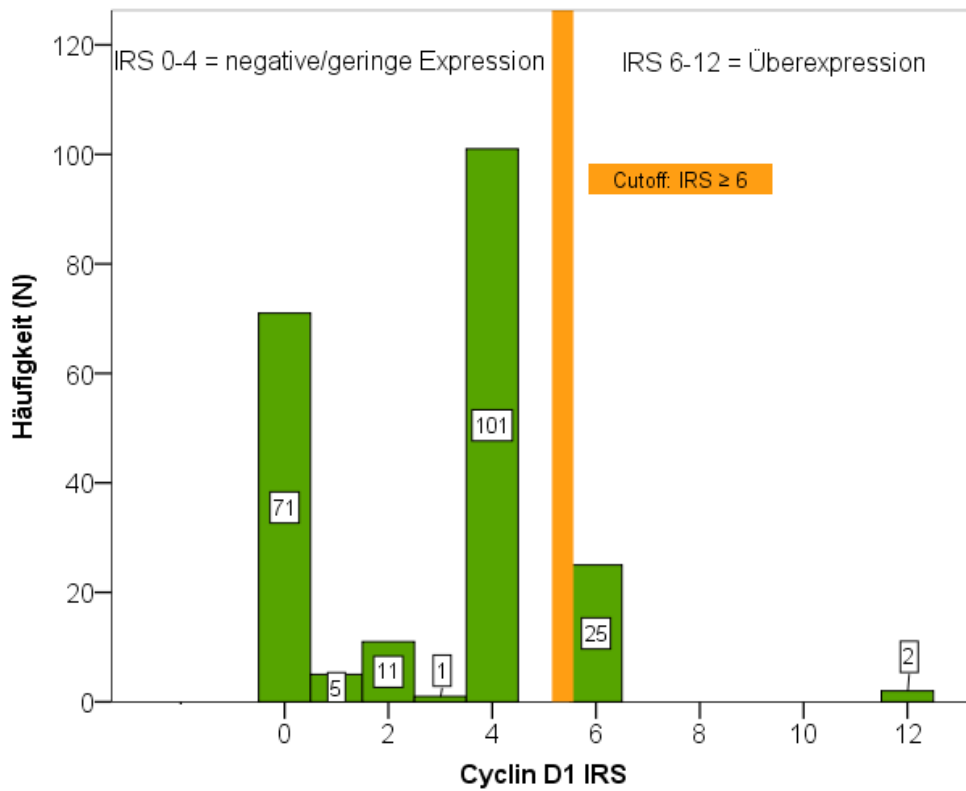


Abbildung 8: IRS-Verteilung und Cutoff des Cyclin D1 über alle Histotypen

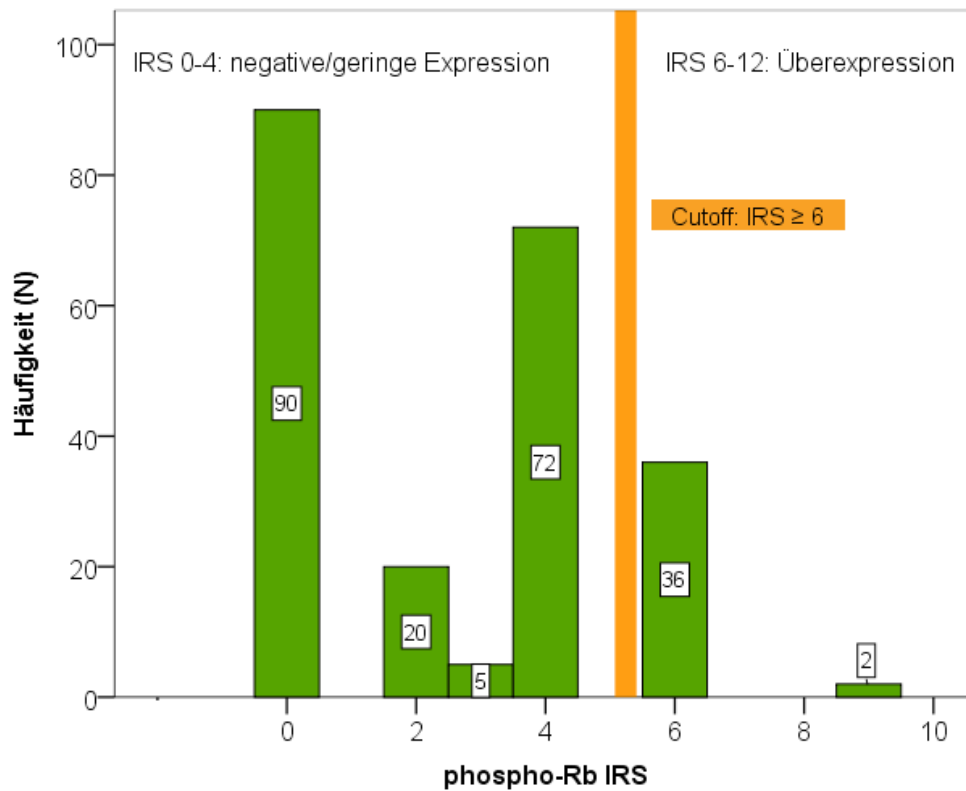


Abbildung 9: IRS-Verteilung und Cutoff des pRb über alle Histotypen

4.3.2 Verteilung der Zellzyklusproteinexpression

In folgender Abbildung ist exemplarisch die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen Cyclin D1 in EC dargestellt.

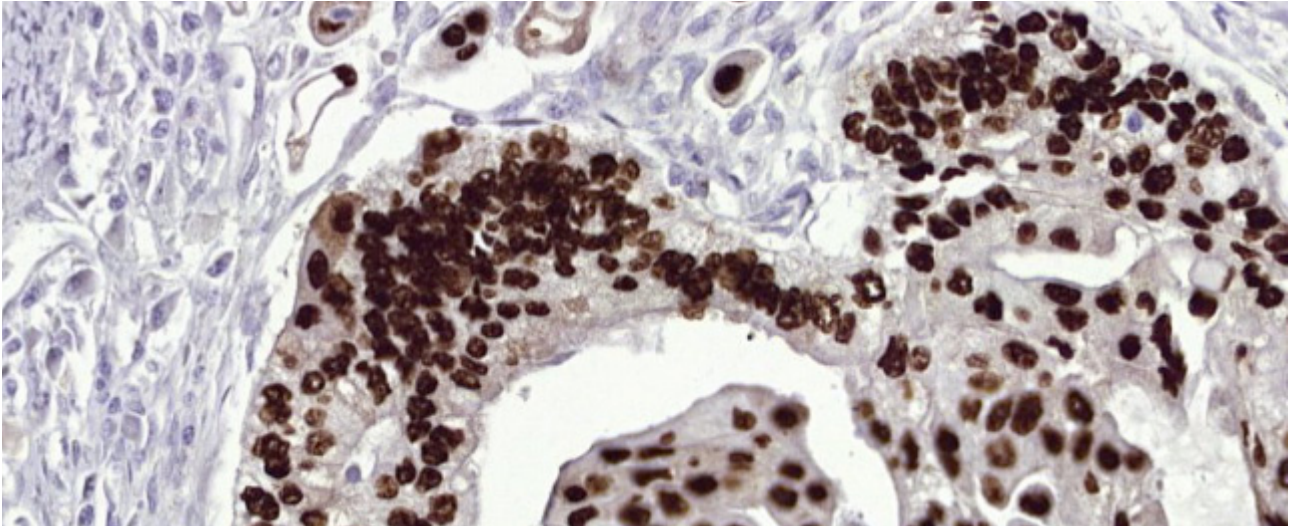


Abbildung 10: Nukleäre immunhistochemische Färbung von Cyclin D1 in EC

Zellzyklusprotein	HGSC (%)	EC (%)	CCC (%)	X ² -Test
Cyclin D1				p<0,001
negativ (IRS 0-4)	143 (95,3%)	26 (74,3%)	20 (64,5%)	
positiv (IRS 6-12)	7 (4,7%)	9 (25,7%)	11 (35,5%)	
Gesamtanzahl (100%)	150	35	31	
pRb				p<0,001
negativ (IRS 0-4)	144 (89,4%)	24 (68,6%)	19 (65,5%)	
positiv (IRS 6-12)	17 (10,6%)	11 (31,4%)	10 (34,5%)	
Gesamtanzahl (100%)	161	35	29	

Tabelle 14: Expression der Zellzyklusproteine im Vergleich der Histotypen

Obige Tabelle zeigt die Verteilung der Zellzyklusexpression im Vergleich der histologischen Typen. Alle Entitäten zeigen nur in der Minderheit der Fälle eine positive Expression, wobei die CCC Cyclin D1 (35,5 %) und pRb (34,5 %) noch am häufigsten exprimierten, während die HGSC nur in sieben Fällen (4,7 %) für Cyclin D1 und in 17 (10,6 %) für pRb positiv waren. Der Unterschied zwischen den Gruppen war für beide Zellzyklusproteine statistisch signifikant ($p<0,001$). Im vergleichenden ZYP-Expressionsstatus fassten wir zusammen, wie viele Tumoren keines der beiden Zellzyklusproteine, jeweils eines oder gar beide gleichzeitig exprimierten (siehe Abbildung 11). Hier waren im HGSC-Kollektiv 120 von 143 Fällen (83,9 %) negativ für beide Proteine und nur zwei Fälle (1,4 %) zeigten eine positive

Expression von Cyclin D1 und pRb gleichzeitig. Von den EC waren 18 Tumoren (51,4 %) vollständig negativ und drei (8,6 %) exprimierten beide Zellzyklusproteine. Bei den CCC stellte es sich ähnlich dar: Hier waren 15 (51,7 %) gleichermaßen negativ für Cyclin D1 und pRb, immerhin sechs Tumoren (20,7 %) exprimierten synchron beide Zellzyklusproteine. Der Unterschied zwischen den Gruppen war im χ^2 -Test statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die

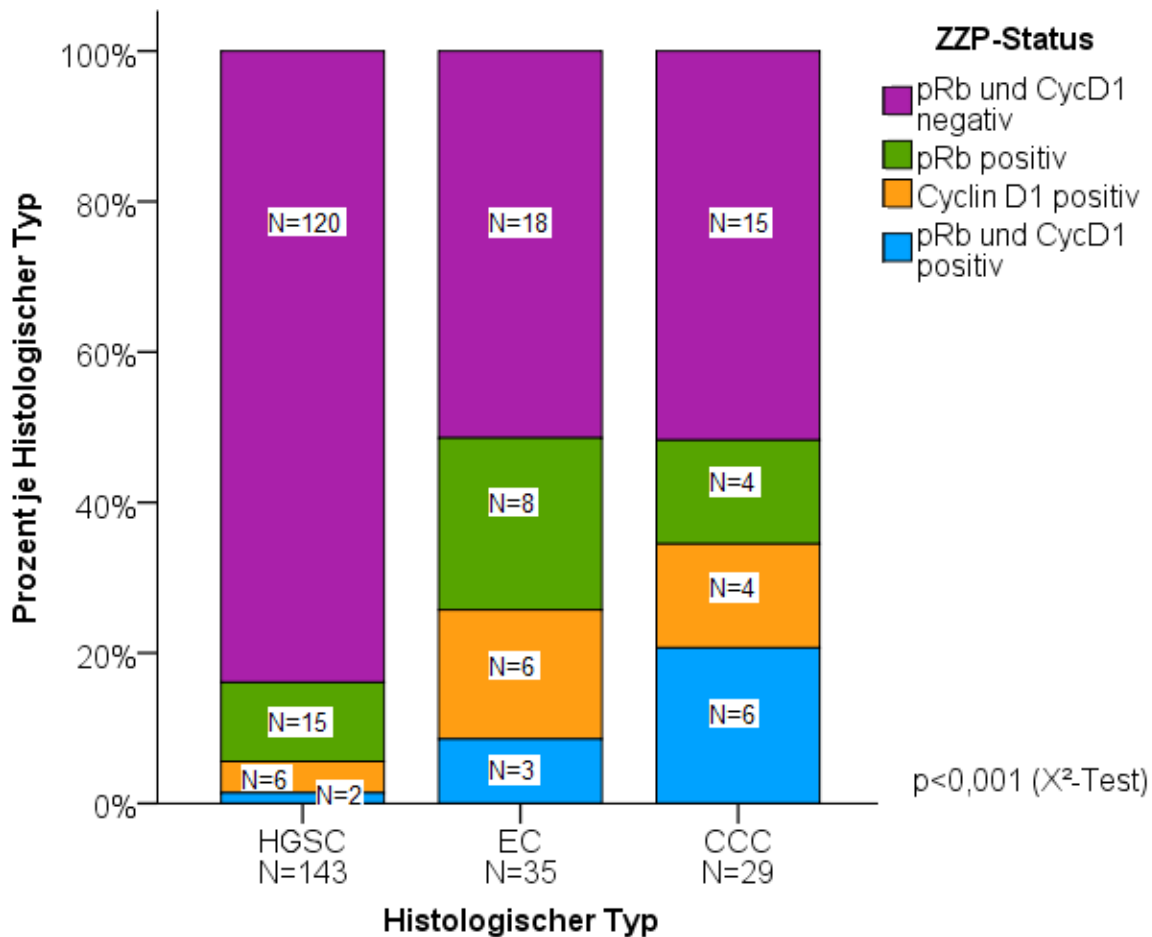


Abbildung 11: Vergleichender ZPP-Expressionsstatus über die Histotypen

beiden Zellzyklusproteine korrelierten weder in HGSC ($p = 0,596$) noch in EC ($p = 1,000$) oder CCC ($p = 0,051$) statistisch signifikant miteinander.

4.3.3 Korrelationen der ZPP mit klinisch-pathologischen Parametern

Wir untersuchten, ob nicht zufällige Zusammenhänge zwischen der Expression der Zellzyklusproteine und klinisch-pathologischen Parametern bestand (Fishers exakter Test). Unten stehende Tabellen zeigen die Ergebnisse. Von den für die Zellzyklusproteine informativen

EC-Fällen zeigte keiner einen postoperativen makroskopischen Tumorrest, weshalb hierzu keine Korrelation berechnet wurde.

Wir fanden im HGSC-Kollektiv keine statistisch signifikanten Korrelationen des Cyclin D1 mit klinisch-pathologischen Parametern. Für die EC fanden wir ebenfalls keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen Cyclin D1 und klinisch-pathologischen Parametern. In den CCC korrelierte eine Cyclin D1-Negativität statistisch signifikant mit einem negativen Nodalstatus ($p=0,007$): Von 14 Cyclin D1-negativen Tumoren zeigten 12 (85,7 %) keine Lymphknotenmetastasen, während sieben der neun Cyclin D1 exprimierenden Fälle (77,8 %) einen positiven Nodalstatus aufwiesen. Cyclin D1-Negativität korreliert weiterhin statistisch signifikant ($p=0,017$) mit den frühen FIGO-Stadien I und II: Von 19 Cyclin D1-negativen CCC befanden sich 15 (78,9 %) in einem frühen Stadium I oder II, wohingegen sieben von zehn exprimierenden Tumoren (70 %) im FIGO-Stadium III oder IV diagnostiziert worden waren.

	HGSC	EC	CCC
Alter	1,000	0,703	1,000
Grading	-	0,055 *	-
pN	0,127	0,374	0,007
pM	1,000	0,464	0,250
FIGO	0,529	0,420	0,017
Tumorrest	1,000	-	0,412

Tabelle 15: Korrelationen von Cyclin D1 mit klinisch-pathologischen Parametern

*: p-Wert mit X^2 -Test berechnet, ansonsten mit Fishers exaktem Test. Signifikante Ergebnisse fett hervorgehoben.

Eine statistisch signifikante Korrelation des pRb konnte lediglich in den CCC für frühe versus fortgeschrittene FIGO-Stadien gesehen werden ($p=0,020$): Von 18 pRb-negativen Tumoren waren 14 (77,8 %) in einem frühen Stadium I oder II diagnostiziert worden, wohingegen sieben von zehn (70 %) pRb exprimierenden Fällen sich bereits in einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium III oder IV befanden. Im HGSC- und EC-Kollektiv fanden sich keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen pRb und klinisch-pathologischen Parametern.

	HGSC	EC	CCC
Alter	0,210	0,477	0,714
Grading	-	0,245 *	-
pN	1,000	0,061	0,077

pM	0,696	0,464	0,375
FIGO	0,696	0,149	0,020
Tumorrest	0,506	-	0,438

Tabelle 16: Korrelationen von pRb mit klinisch-pathologischen Parametern

An Hand von Kaplan-Meier-Überlebensanalysen wurde untersucht, ob für das HGSC-Kollektiv eine prognostische Bedeutung der ZCP-Expression vorlag. Weder für Cyclin D1 ($p=0,267$ im Log-Rank-Test nach Mantel-Cox) noch für pRb ($p=0,979$) bestand eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben. Gleiches galt für das progressionsfreie Überleben ($p=0,916$ bzw. $p=0,835$). Auch der ZCP-Expressionsstatus korrelierte nicht statistisch signifikant mit dem Gesamtüberleben ($p=0,346$) oder dem progressionsfreien Überleben ($p=0,102$).

4.4 ARID1A in den Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen

4.4.1 Verteilung der ARID1A-Expression

Für ARID1A war an Hand der Häufigkeitsverteilung über alle histologischen Typen und Stadien sowie die Lokalisation festgelegt worden, dass IRS-Werte von 0 bis 3 als negative und IRS-Werte von 4 bis 12 als positive Expression gelten sollten. Unten stehende Abbildung zeigt beispielhaft die immunhistochemische nukleäre Anfärbung mittels des Antikörpers gegen ARID1A in CCC.

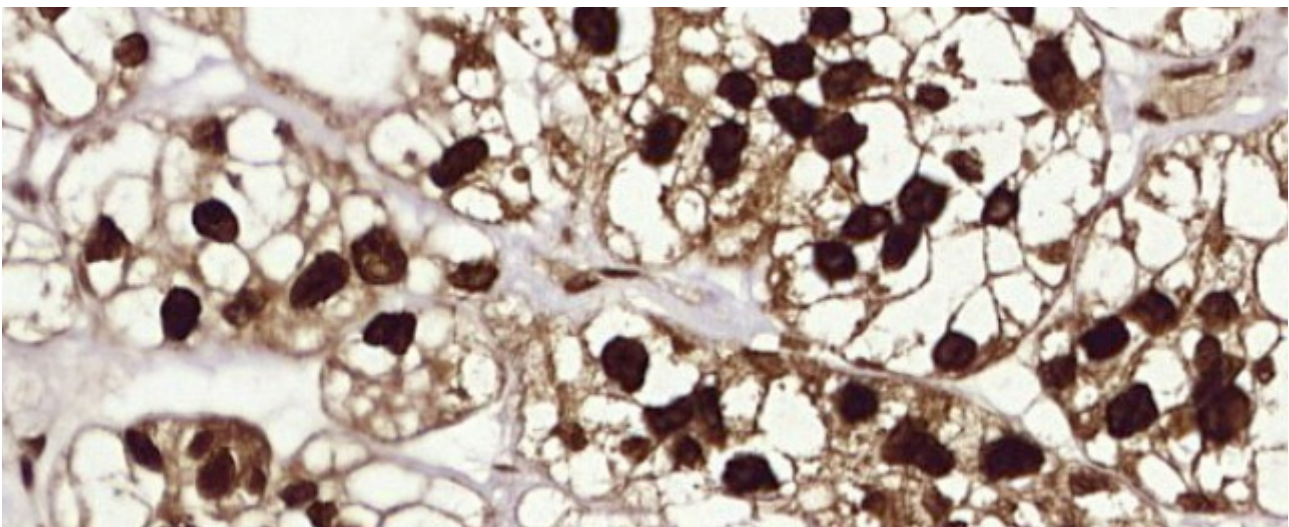


Abbildung 12: Nukleäre immunhistochemische Färbung von ARID1A in CCC

Wir konnten sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Expression beobachten. Unten stehende Tabelle zeigt die Verteilung beider in EC und CCC. Die EC exprimierten ARID1A in 15 Fällen (46,9 %) nukleär, jedoch nur in sieben Fällen (21,9 %) zytoplasmatisch. Im Gegensatz dazu zeigten 23 CCC (74,2 %) eine nukleäre ARID1A-Expression. Eine zytoplasmatische Anfärbung fanden wir in neun CCC (29 %). Der Unterschied in der ARID1A-Expression zwischen EC und CCC war bezüglich der nukleären ($p=0,039$), nicht jedoch der zytoplasmatischen ($p=0,572$) Lokalisation statistisch signifikant. Weder in den EC noch in den CCC korrelierten die nukleäre und die zytoplasmatische Expression miteinander ($p=0,209$ bzw. $p=0,660$).

ARID1A	EC	CCC	Fishers exakter Test
nukleär			p=0,039
negativ (IRS 0-3)	17 (53,1%)	8 (25,8%)	
positiv (IRS 4-12)	15 (46,9%)	23 (74,2%)	
Gesamtanzahl (100%)	32	31	
zytoplasmatisch			p=0,572
negativ (IRS 0-3)	25 (78,1%)	22 (71,0%)	
positiv (IRS 4-12)	7 (21,9%)	9 (29,0%)	
Gesamtanzahl (100%)	32	31	

Tabelle 17: Expression von ARID1A im Vergleich der histologischen Typen

4.4.2 Korrelation von ARID1A mit klinisch-pathologischen Parametern

Wir untersuchten weiterhin, ob Korrelationen zwischen ARID1A und klinisch-pathologischen Parametern bestand.

Für das nukleär exprimierte ARID1A bestand in den EC eine statistisch signifikante Korrelation nur zum Silverberg Grading: 13 von 15 ARID1A-negativen Tumoren (86,7 %) waren mäßig differenziert, zwei (13,3 %) schlecht differenziert. Hingegen zeigten vier von 13 ARID1A-positiven Tumoren (30,8 %) eine gute, sechs (46,2 %) eine mäßige und drei (23,1 %) eine schlechte Differenzierung.

nukleäres ARID1A	EC	CCC
Alter	0,289	0,407
Grading	0,036 *	-
pN	0,178	1,000
pM	1,000	1,000
FIGO	0,260	0,677

Tumorrest	-	1,000
-----------	---	-------

Tabelle 18: Nukleäres ARID1A und klinisch-pathologische Parameter

*: p-Wert mit X²-Test berechnet, ansonsten mit Fishers exaktem Test. Signifikante Ergebnisse fett hervorgehoben.

Weder in den EC noch den CCC fanden sich statistisch signifikante Korrelationen zwischen der zytoplasmatischen ARID1A-Expression und klinisch-pathologischen Parametern.

zytoplasmatisches ARID1A	EC	CCC
Alter	0,685	0,229
Grading	0,505 *	-
pN	0,544	0,162
pM	1,000	1,000
FIGO	0,181	0,694
Tumorrest	-	1,000

Tabelle 19: Zytoplasmatisches ARID1A und klinisch-pathologische Parameter

*: p-Wert mit X²-Test berechnet, ansonsten mit Fishers exaktem Test.

4.5 HNF-1 β in den Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen

4.5.1 Verteilung der HNF-1 β -Expression

Auch für HNF-1 β legten wir im Vorfeld an Hand der Häufigkeitsverteilung über alle untersuchten Fälle und Stadien einen Cutoff sowohl für die nukleäre als auch die zytoplasmatische Expression fest. IRS-Werte von 0 bis 4 entsprechen einer negativen und IRS-Werte von 6 bis 12 einer positiven HNF-1 β -Expression. Folgende Abbildungen zeigen beispielhaft die immunhistochemische Anfärbung von HNF-1 β im Kern respektive Zytoplasma.

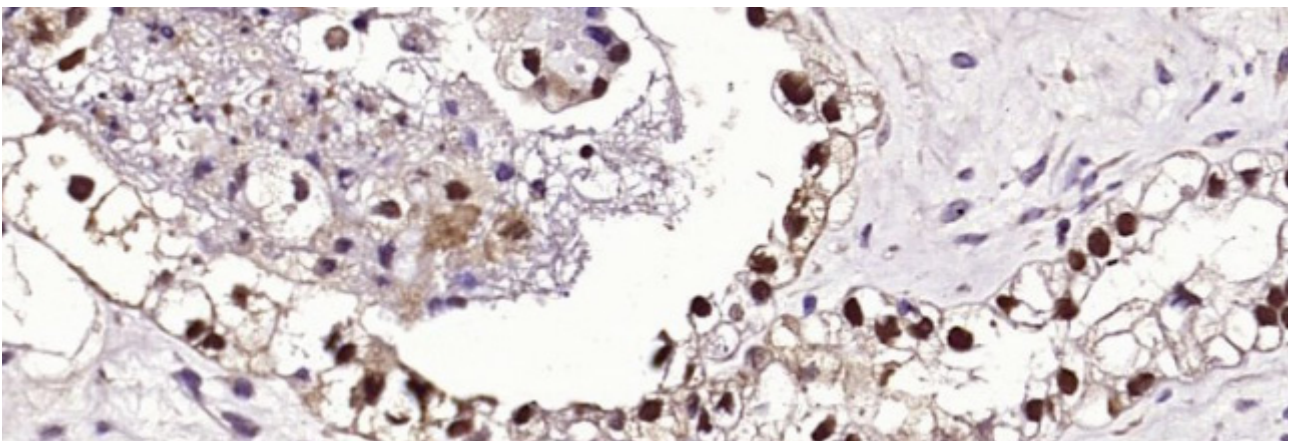


Abbildung 13: Nukleäre immunhistochemische Färbung von HNF-1 β in CCC

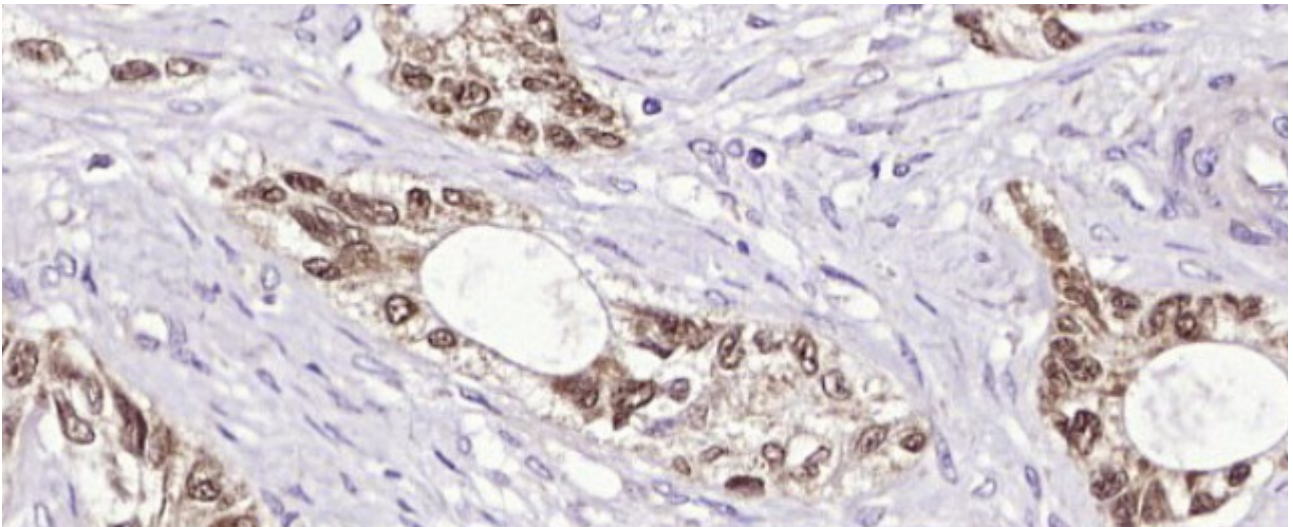


Abbildung 14: Nukleäre immunhistochemische Färbung von HNF-1 β in EC

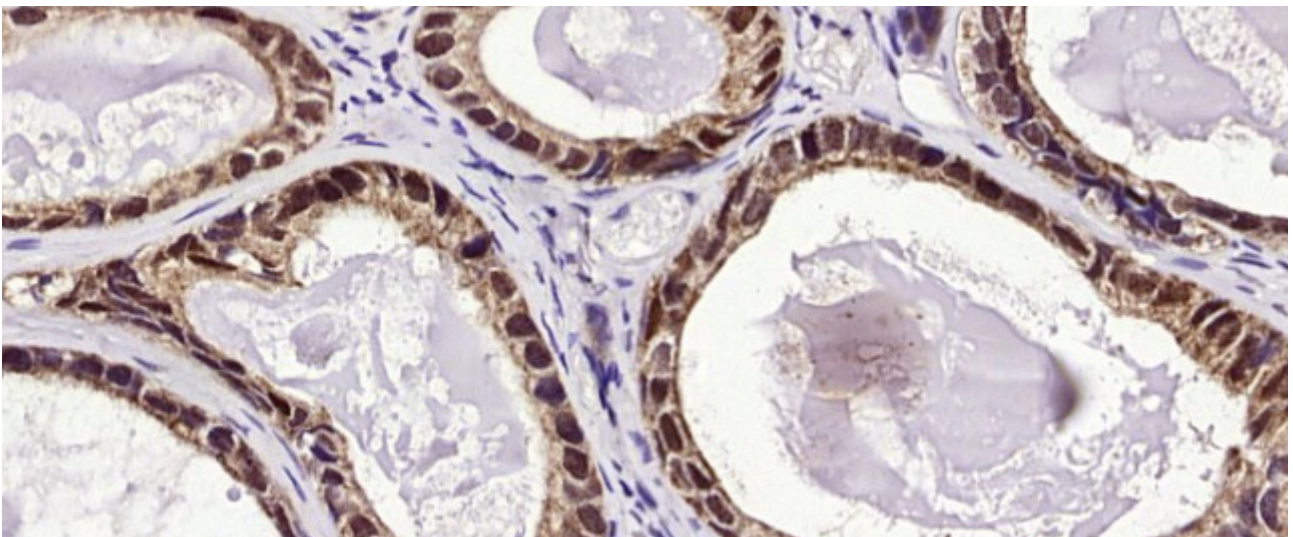


Abbildung 15: Zytoplasmatische immunhistochemische Färbung von HNF-1 β in EC

Unten stehende Tabelle zeigt die Verteilung der Proteinexpression. Die überwiegende Mehrheit der CCC, nämlich 23 Fälle (79,3 %), zeigte eine positive nukleäre Expression von HNF-1 β , aber kein einziger Tumor (0,0 %) wies eine zytoplasmatische Expression auf. Bei den EC waren nur fünf Fälle (14,7 %) positiv für HNF-1 β im Kern, dafür zeigte sich jedoch eine zytoplasmatische Expression bei 17 Tumoren (50 %). Die Unterschiede der nukleären beziehungsweise zytoplasmatischen Expression zwischen den Gruppen waren jeweils statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Im HNF-1 β -Expressionsstatus fassten wir zusammen, wie viele Tumoren HNF-1 β gar nicht, in jeweils einer der beiden subzellulären Lokalisationen oder gar in beiden exprimierten (siehe Abbildung 16). Hier waren 15 EC vollständig negativ (44,1 %), lediglich zwei Tumoren waren nur nukleär positiv (5,9 %), aber 14 wiesen eine

zytoplasmatische Expression von HNF-1 β auf (41,2 %). Drei Fälle exprimierten den Biomarker in beiden subzellulären Lokalisationen (8,8 %). Auch hier war der Unterschied zwischen den histologischen Typen statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Es fand sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen den beiden subzellulären Lokalisationen ($p = 1,000$ in EC).

HNF-1 β	EC	CCC	Fishers exakter Test
nukleär negativ	29 (85,3%)	6 (20,7%)	p < 0,001
positiv	5 (14,7%)	23 (79,3%)	
Gesamtanzahl (100%)	34	29	
zytoplasmatisch negativ	17 (50,0%)	31 (100,0%)	p < 0,001
positiv	17 (50,0%)	0 (0,0%)	
Gesamtanzahl (100%)	34	31	

Tabelle 20: Expression von HNF-1 β in EC und CCC

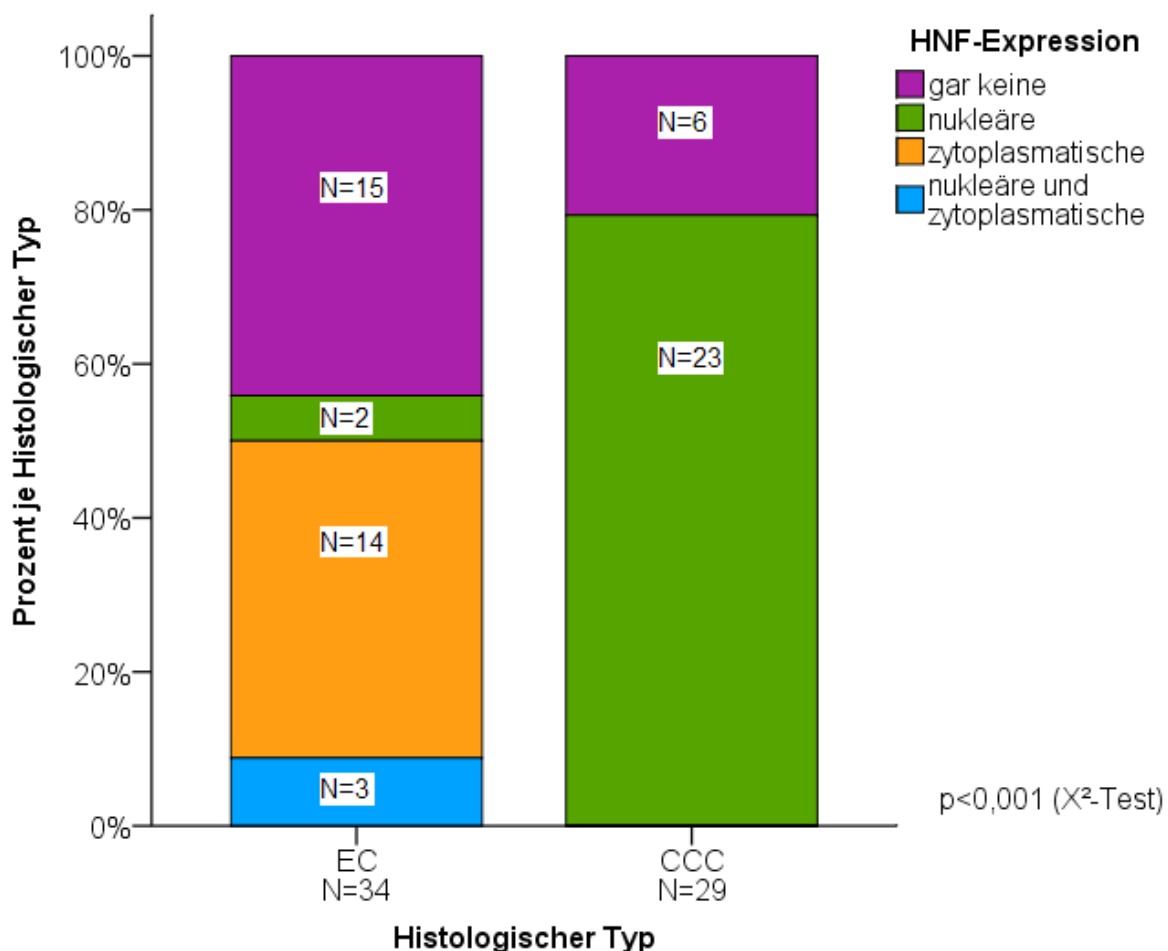


Abbildung 16: HNF-1 β -Expressionsstatus

4.5.2 Korrelationen des HNF-1 β mit klinisch-pathologischen Parametern

Es fanden sich keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen HNF-1 β und klinisch-pathologischen Parametern. Unten stehende Tabelle listet die genauen Ergebnisse auf.

	EC		CCC
	nukleär	zytoplasmatisch	nukleär
Alter	0,175	0,732	1,000
Grading	0,361 *	0,103 *	-
pN	1,000	1,000	0,515
pM	1,000	1,000	1,000
FIGO	1,000	0,467	0,621
Tumorrest	-	-	1,000

Tabelle 21: Korrelationen von HNF-1 β mit klinisch-pathologischen Parametern

*: p-Wert mit X²-Test berechnet, ansonsten mit Fishers exaktem Test.

4.6 Korrelationen der Biomarker untereinander

Wir untersuchten mit Fishers exaktem Test für jedes histologisches Kollektiv, ob nicht zufällige Assoziationen zwischen den Hormonrezeptoren und den Zellzyklusproteinen bestanden. In den Endometriose-assoziierten Tumorkollektiven suchten wir des Weiteren nach statistischen Zusammenhängen zwischen den Hormonrezeptoren respektive Zellzyklusproteinen und ARID1A sowie HNF-1 β .

4.6.1 HGSC

In den HGSC fanden sich mittels Fishers exaktem Test keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den Hormonrezeptoren (ER α , PR) und den Zellzyklusproteinen (pRb, Cyclin D1).

	ER α	
	negativ (% in ER α negativ)	positiv (% in ER α positiv)
pRb		
negativ	48 (94,1)	94 (87,0)
positiv	3 (5,9)	14 (13,0)
N=159, p=0,271		
Cyclin D1		
negativ	43 (97,7)	96 (94,1)
positiv	1 (2,3)	6 (5,9)
N=146, p=0,675		

Tabelle 22: Korrelationen von ER α mit ZCP

	PR	
	negativ (% in PR negativ)	positiv (% in PR positiv)
pRb		
negativ	112 (90,3)	19 (86,4)
positiv	12 (9,7)	3 (13,6)
N=146, p=0,701		
Cyclin D1		
negativ	110 (96,5)	19 (86,4)
positiv	4 (3,5)	3 (13,6)
N=136, p=0,084		

Tabelle 23: Korrelationen von PR mit ZZP

Sowohl von den Hormonrezeptor-negativen als auch den positiven Tumoren war die überwiegende Mehrheit negativ für die Expression der Zellzyklusproteine. Folgende Tabelle zeigt die Expression von pRb und Cyclin D1 in Bezug zum Hormonrezeptorstatus in HGSC.

	pRb	
	negativ (% in pRb negativ)	positiv (% in pRb positiv)
HR-Status		
ER α und PR negativ	45 (34,9)	1 (6,7)
ER α positiv	65 (50,4)	11 (73,3)
PR positiv	1 (0,8)	0 (0,0)
ER α und PR positiv	18 (14,0)	3 (20,0)
N=144, p=0,162 (X ² -Test)		
	Cyclin D1	
	negativ (% in CycD1 negativ)	positiv (% in CycD1 positiv)
HR-Status		
ER α und PR negativ	39 (30,7)	1 (14,3)
ER α positiv	69 (54,3)	3 (42,9)
PR positiv	1 (0,8)	0 (0,0)
ER α und PR positiv	18 (14,2)	3 (42,9)
N=134, p=0,231 (X ² -Test)		

Tabelle 24: Korrelationen des HR-Status mit ZZP in HGSC

Von den 129 pRb-negativen Tumoren waren 45 (34,9 %) ebenfalls negativ für ER α und PR, 18 (14 %) exprimierten beide Hormonrezeptoren. In rund der Hälfte der Fälle wurde ER α alleine exprimiert. Von lediglich 15 pRb-positiven Fällen war einer (6,7 %) vollständig negativ bezüglich beider Hormonrezeptoren, aber elf (73,3 %) exprimierten alleine ER α und drei Karzinome (20 %) zeigten eine positive Färbung gegen ER α und PR.

Bezüglich Cyclin D1 verhielt es sich sehr ähnlich: 127 HGSC waren Cyclin D1-negativ und von diesen exprimierten 39 (30,7 %) gar keinen Hormonrezeptor, 18 (14,2 %) beide und 69 (54,3 %) nur den ER α . Die PR-Expressionsrate war auch hier verschwindend gering. Nur sieben HGSC exprimierten Cyclin D1 und von diesen waren jeweils drei (42,9 %) positiv für ER α alleine oder beide Hormonrezeptoren. PR alleine wurde nicht exprimiert. Diese Korrelationen zum HR-Status waren jeweils nicht statistisch signifikant.

4.6.2 EC

Die Beziehungen zwischen der Expression von pRb und Hormonrezeptoren werden in der folgenden Kreuztabelle dargestellt.

	pRb	
	negativ (% in pRb negativ)	positiv (% in pRb positiv)
ER α negativ positiv	12 (50,0) 12 (50,0)	3 (27,3) 8 (72,7)
N=35, p=0,281		
PR negativ positiv	6 (26,1) 17 (73,9)	1 (9,1) 10 (90,9)
N=34, p=0,384		
ER β nukleär negativ positiv	6 (25,0) 18 (75,0)	0 (0,0) 11 (100,0)
N=35, p=0,146		
ER β zytoplasmatisch negativ positiv	12 (50,0) 12 (50,0)	2 (18,2) 9 (81,8)
N=35, p=0,137		

Tabelle 25: Korrelationen von pRb mit den Hormonrezeptoren in EC

Wir konnten im EC-Kollektiv keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen pRb und den Hormonrezeptoren finden. Von den pRb-positiven Fällen exprimierte jeweils die deutlich überwiegende Mehrheit (72,7 bis 100 %) ER α , PR oder ER β . Von den pRb-negativen Tumoren zeigte jeweils die Hälfte eine Expression von ER α oder zytoplasmatischem ER β , während etwa 75 % den PR oder ER β nukleär exprimierten.

Die Korrelationen von Cyclin D1 mit den Hormonrezeptoren sind in folgender Tabelle dargestellt.

	Cyclin D1	
	negativ (% in CycD1 negativ)	positiv (% in CycD1 positiv)
ER α		
negativ	13 (50,0)	2 (22,2)
positiv	13 (50,0)	7 (77,8)
N=35, p=0,244		
PR		
negativ	6 (24,0)	1 (11,1)
positiv	19 (76,0)	8 (88,9)
N=34, p=0,644		
ER β nukleär		
negativ	6 (23,1)	0 (0,0)
positiv	20 (76,9)	9 (100,0)
N=35, p=0,304		
ER β zytoplasmatisch		
negativ	9 (34,6)	5 (55,6)
positiv	17 (65,4)	4 (44,4)
N=35, p=0,432		

Tabelle 26: Korrelationen von Cyclin D1 mit Hormonrezeptoren in EC

Auch diesbezüglich zeigten sich keinerlei statistisch signifikante Zusammenhänge. Von den Cyclin D1-positiven Tumoren exprimierten etwa 78 bis 100 % ebenfalls ER α , PR oder ER β nukleär, während nur vier (44,4 %) eine zytoplasmatische ER β -Expression aufwiesen. Auch die Cyclin D1-negativen Fälle waren zumeist (zu etwa 65 bis 77 %) positiv für PR und ER β und die Hälfte positiv für ER α .

Weiterhin untersuchten wir, ob in EC statistisch signifikante Korrelationen zwischen den Zellzyklusproteinen und ER α sowie PR bestanden. Die Ergebnisse zeigt folgende Kreuzta-
belle.

	pRb	
	negativ (% in pRb negativ)	positiv (% in pRb positiv)
HR-Status		
ER α und PR negativ	5 (21,7)	1 (9,1)
ER α positiv	1 (4,3)	0 (0,0)
PR positiv	7 (30,4)	2 (18,2)
ER α und PR positiv	10 (43,5)	8 (72,7)
N=34, p=0,427 (X ² -Test)		
	Cyclin D1	
	negativ (% in CycD1 negativ)	positiv (% in CycD1 positiv)

HR-Status		
ER α und PR negativ	5 (20,0)	1 (11,1)
ER α positiv	1 (4,0)	0 (0,0)
PR positiv	8 (32,0)	1 (11,1)
ER α und PR positiv	11 (40,0)	7 (77,8)
N=34, p=0,366 (X ² -Test)		

Tabelle 27: Korrelationen des HR-Status mit ZYP in EC

In den EC waren von 23 pRb-negativen Tumoren fünf (21,7 %) ebenfalls vollständig negativ für beide Hormonrezeptoren, aber zehn Fälle (43,5 %) zeigten eine Expression von sowohl ER α als auch PR. Von den elf pRb-positiven Tumoren waren acht (72,7 %) positiv für beide Hormonrezeptoren, nur einer (9,1 %) exprimierte weder ER α noch PR. In beiden Gruppen überwog die PR-Expression die ER α -Expression. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Bezüglich Cyclin D1 erhielten wir ähnliche Ergebnisse: Von 25 Cyclin D1-negativen Tumoren exprimierten fünf (20 %) weder ER α noch PR, acht (32 %) zeigten eine alleinige PR-Expression (im Gegensatz zu einem ER α -positiven Fall) und elf Tumoren (44 %) waren sowohl für ER α als auch PR positiv. Von neun Cyclin D1-positiven EC exprimierten sieben (77,8 %) beide Hormonrezeptoren und einer (11,1 %) PR alleine. Auch hier war also eher eine PR- als eine ER α -Expression zu finden. Die Unterschiede waren jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Im Übrigen zeigten sich folgende statistisch signifikante Korrelationen mit dem exakten Test nach Fisher: Zwischen dem nukleären ER β und HNF-1 β im Zytoplasma, wobei eine hohe nukleäre ER β -Expression auch mit einer hohen zytoplasmatischen HNF-1 β -Expression einherging ($p=0,018$). Eine positive zytoplasmatische ER β -Expression korrelierte ebenfalls mit einer positiven zytoplasmatischen HNF-1 β -Expression ($p=0,032$). Ein weiterer, statistisch signifikanter Zusammenhang ließ sich für ER β im Zytoplasma und ARID1A im Zytoplasma nachweisen ($p=0,025$). Hier waren alle 13 ER β -negativen Fälle auch negativ für das zytoplasmatische ARID1A, jedoch auch 12 (63,2 %) der ER β -positiven Fälle. Des Weiteren ging eine positive HNF-1 β -Expression im Zytoplasma mit einer positiven immunhistochemischen Reaktion für das ARID1A im Kern einher ($p=0,042$).

4.6.3 CCC

Folgende Tabelle zeigt die Beziehungen zwischen pRb und den Hormonrezeptoren in CCC, berechnet mit dem exakten Test nach Fisher. Hierbei konnten keinerlei statistisch signifikante Korrelationen nachgewiesen werden. Von den pRb-positiven Tumoren exprimierte nur eine Minderheit ER α oder PR (20 respektive 10 %), während diese zu 90 % positiv für ER β waren.

	pRb	
	negativ (% in pRb negativ)	positiv (% in pRb positiv)
ER α		
negativ	18 (94,7)	8 (80,0)
positiv	1 (5,3)	2 (20,0)
N=29, p=0,267		
PR		
negativ	17 (89,5)	9 (90,0)
positiv	2 (10,5)	1 (10,0)
N=29, p=1,000		
ER β nukleär		
negativ	1 (5,3)	1 (10,0)
positiv	18 (94,7)	9 (90,0)
N=29, p=1,000		
ER β zytoplasmatisch		
negativ	1 (5,3)	1 (10,0)
positiv	18 (94,7)	9 (90,0)
N=29, p=1,000		

Tabelle 28: Korrelationen von pRb mit den Hormonrezeptoren in CCC

Bezüglich der Cyclin D1-Proteinexpression in CCC waren ebenfalls keine statistisch signifikanten Korrelationen mit den Hormonrezeptoren nachzuweisen. Von den meist Cyclin D1-negativen Tumoren waren 95 % ebenfalls jeweils für ER α und PR negativ. Und auch von den Cyclin D1-positiven Fällen exprimierten lediglich rund 27 % ER α und rund 18 % PR. Alle elf Cyclin D1-exprimierenden Tumoren zeigten hingegen auch eine Expression des ER β sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch. Von den 20 Cyclin D1-negativen Fällen waren 90 respektive 85 % positiv für den ER β .

	Cyclin D1	
	negativ (% in CycD1 negativ)	positiv (% in CycD1 positiv)
ER α		
negativ	19 (95,0)	8 (72,7)
positiv	1 (5,0)	3 (27,3)

N=31, p=0,115		
PR		
negativ	19 (95,0)	9 (81,8)
positiv	1 (5,0)	2 (18,2)
N=31, p=0,281		
ERβ nukleär		
negativ	2 (10,0)	0 (0,0)
positiv	18 (90,0)	11 (100,0)
N=31, p=0,527		
ERβ zytoplasmatisch		
negativ	3 (15,0)	0 (0,0)
positiv	17 (85,0)	11 (100,0)
N=31, p=0,535		

Tabelle 29: Korrelationen von Cyclin D1 mit den Hormonrezeptoren in CCC

Wir untersuchten auch für die CCC eventuelle Zusammenhänge zwischen der ZYP-Expression und dem HR-Status. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt.

	pRb	
	negativ (% in pRb negativ)	positiv (% in pRb positiv)
HR-Status		
ERα und PR negativ	17 (89,5)	8 (80,0)
ERα positiv	0 (0,0)	1 (10,0)
PR positiv	1 (5,3)	0 (0,0)
ERα und PR positiv	1 (5,3)	1 (10,0)
N=29, p=0,439 (X ² -Test)		
	Cyclin D1	
	negativ (% in CycD1 negativ)	positiv (% in CycD1 positiv)
HR-Status		
ERα und PR negativ	18 (90,0)	8 (72,7)
ERα positiv	1 (5,0)	1 (9,1)
PR positiv	1 (5,0)	0 (0,0)
ERα und PR positiv	0 (0,0)	2 (18,2)
N=31, p=0,202 (X ² -Test)		

Tabelle 30: Korrelationen des HR-Status mit ZYP in CCC

Von 19 pRb-negativen CCC waren 17 (89,5 %) ebenfalls negativ für beide Hormonrezeptoren, jeweils einer (5,3 %) exprimierte PR alleine oder mit ERα zusammen. Von zehn pRb-positiven Tumoren exprimierte nur jeweils einer (zehn Prozent) ERα alleine oder gemein-

sam mit PR, acht Karzinome (80 %) waren vollständig negativ für beide Hormonrezeptoren. Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant.

Bezüglich Cyclin D1 erhielten wir sehr ähnliche und ebenfalls nicht statistisch signifikante Ergebnisse: Von 20 Cyclin D1-negativen CCC waren 18 vollständig negativ für beide Hormonrezeptoren (90 %), jeweils einer exprimierte ER α beziehungsweise PR (5 %). Von elf Cyclin D1-positiven Tumoren exprimierten zwei (18,2 %) ER α und PR, ein weiterer (9,1 %) ER α alleine. Die übrigen acht Fälle (72,7 %) hatten einen vollkommen negativen HR-Status.

Auch für den nukleären HNF-1 β zeigten sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit Hormonrezeptoren oder Zellzyklusproteinen (jeweils $p > 0,050$). Von 29 informativen Fällen waren bei der Kreuztabellierung mit Hormonrezeptoren 23 (79,3 %) positiv für HNF-1 β . Von diesen exprimierten lediglich drei (13,0 %) ER α , nur einer (4,3 %) PR, den ER β aber 22 (95,7 %) im Kern und 21 (91,3 %) im Zytoplasma. Nur 16,7 % der HNF-1 β -negativen Tumoren exprimierten ER α und 33,3 % den PR. Im Gegensatz hierzu waren 83,3 % der HNF-1 β -negativen Fälle positiv für ER β im Kern und alle zeigten eine zytoplasmatische ER β -Expression (sechs Fälle). Für die Kreuztabellierung des HNF-1 β mit pRb standen 28 gültige Fälle zur Verfügung. Von diesen exprimierten 22 (78,6 %) HNF-1 β nukleär. Hiervon wiederum zeigten zehn Fälle (45,5 %) eine positive immunhistochemische Reaktion auf pRb. Im Gegensatz hierzu waren alle sechs HNF-1 β -negativen Tumoren ebenfalls negativ für pRb. Von 29 informativen Fällen in der Kreuztabellierung von HNF-1 β mit Cyclin D1 waren 23 (79,3 %) positiv für HNF-1 β im Kern. Von diesen zeigten zehn Fälle (43,5 %) eine positive Cyclin D1-Proteinexpression. Von sechs HNF-1 β -negativen Tumoren exprimierte einer (16,7 %) Cyclin D1. HNF-1 β korrelierte in beiden subzellulären Lokalisationen nicht statistisch signifikant mit ARID1A (jeweils $p > 0,050$). Hierbei zeigte von den 79,3 % HNF-1 β -positiven Fällen (N=29) die überwiegende Mehrheit von 19 (82,6 %) eine nukleäre ARID1A-Expression, aber nur sechs Tumoren (26,1 %) eine zytoplasmatische Anfärbung in der Immunhistochemie gegen ARID1A. Von den HNF-1 β -negativen Tumoren exprimierte genau die Hälfte ARID1A im Kern und zwei (33,3 %) im Zytoplasma.

Die nukleäre ARID1A-Proteinexpression wies in unserem CCC-Kollektiv ebenfalls keinerlei statistisch signifikante Korrelationen mit den Hormonrezeptoren oder Zellzyklusproteinen auf (jeweils $p > 0,050$). Die Anzahl der gültigen Fälle betrug für alle Korrelationen 31 mit Ausnahme von pRb (N=29). Es exprimierten 23 Tumoren ARID1A (74,2 %). Von diesen waren wiederum drei (13 %) positiv für ER α , zwei (8,7 %) positiv für PR und 22 (95,7 %) expri-

mierten den ER β im Kern sowie 20 (87 %) im Zytoplasma. Von den acht ARID1A-negativen Tumoren war lediglich einer jeweils positiv für ER α und PR (12,5 %). Allerdings exprimierten fast alle der acht ARID1A-negativen Fälle den ER β nukleär (87,5 %) oder zytoplasmatisch (100 %). Acht der 23 ARID1A-positiven Tumoren (34,8 %) exprimierten Cyclin D1, von den insgesamt acht negativen Fällen waren drei (37,5 %) positiv für dieses Zellzyklusprotein. In der Kreuztabellierung mit pRb zeigten 21 CCC (72,4 %) eine nukleäre ARID1A-Anfärbung. Von diesen waren neun (42,9 %) auch positiv für pRb, während von den acht pRb-negativen Tumoren nur einer (12,5 %) eine immunhistochemische pRb-Expression zeigte.

Auch bezüglich der zytoplasmatischen ARID1A-Proteinexpression standen uns für die Berechnung der Zusammenhänge alle 31 CCC zur Verfügung mit Ausnahme der Kreuztabellierung mit pRb (N=29). Wir konnten keinerlei statistisch signifikante Korrelationen des zytoplasmatischen ARID1A mit Hormonrezeptoren oder Zellzyklusproteinen nachweisen (jeweils $p > 0,050$). Nur insgesamt neun CCC (29 %) zeigten eine zytoplasmatische Expression von ARID1A (31 % der gültigen Fälle für pRb). Von diesen wiederum waren nur drei (33,3 %) positiv für ER α und zwei (22,2 %) für PR. Im Gegensatz hierzu waren die ARID1A-positiven Tumoren zu 88,9 respektive 100 % positiv für den ER β in seinen beiden subzellulären Lokalisationen. Von den jeweils 22 ARID1A-negativen CCC zeigte nur einer (4,5 %) eine positive Proteinexpression von ER α oder PR, aber 21 (95,5 %) wiesen eine nukleäre ER β - und 19 (86,4 %) eine zytoplasmatische ER β -Expression auf. Vier (44,4 %) der ARID1A-positiven und sechs (30 %) der ARID1A-negativen Tumoren waren positiv für pRb. Cyclin D1 exprimierten drei (33,3 %) der ARID1A-positiven und acht (36,4 %) der ARID1A-positiven Tumoren.

5 Diskussion

5.1 Zellzyklusprotein- und Hormonrezeptorinteraktion in Ovarialkarzinomen

5.1.1 Die Zellzyklusproteine Cyclin D1 und pRb in Ovarialkarzinomen

Die entscheidende Rolle, welche pRb und Cyclin D1 bei der Regulation des Zellzyklus einnehmen, legt den Verdacht nahe, dass sie potentielle Onkogene darstellen [93, 94]. Eine Vielzahl an Studien wies eine Überexpression dieser beiden Proteine in verschiedenen Malignomen, darunter auch Ovarialkarzinomen, nach [96, 98]. Nam und Kim stellten 2008 in einem Review-Artikel fest, dass die Expression der Zellzyklusproteine getrennt nach den histologischen Typen vorgenommen und einheitliche Kriterien zur Bewertung der immunhistochemischen Ergebnisse herangezogen werden sollten. Denn Unterschiede im Studiendesign und vor allem, ob nach histologischen Gruppen getrennt analysiert werde oder nicht, würden den direkten Vergleich mehrerer Studien erschweren und die teils widersprüchlichen Ergebnisse mitbedingen [94]. So zeigten bei Bali und Mitarbeitern von 134 serösen Ovarialkarzinomen 19 % eine Überexpression von Cyclin D1 (bei einem Cutoff von zehn Prozent) und 79 % eine Überexpression des pRb (bei einem Cutoff von 20 %). Cyclin D1-Überexpression wurde als prädiktiver Faktor für ein verkürztes Gesamtüberleben auch in einem multivariaten Modell beschrieben, während keine Assoziation von pRb-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern oder der Prognose gefunden wurde [114]. Im Gegensatz hierzu beurteilten Kommoss und Mitarbeiter (2007) die immunhistochemische Färbung der 300 Ovarialkarzinome in fortgeschrittenen FIGO-Stadien IIb bis IV sowohl hinsichtlich des prozentualen Anteils positiv gefärbter Tumorzellen als auch der Färbeintensität. Der histologische Subtyp wurde festgestellt, fand jedoch keine Berücksichtigung bei der statistischen Analyse. Hier wiesen über 97 % der Fälle eine eindeutige Expression von pRb auf, wobei kein Cutoff für eine Überexpression angegeben wurde. Das jeweilige Expressionslevel war unabhängig von etablierten prognostischen Faktoren wie FIGO-Stadium, postoperativem Tumorrest und Alter, aber eine hohe Intensität sowie hoher prozentualer Anteil der pRb-Färbung korrelierte mit einer zunehmenden Verschlechterung der Prognose. Die Intensität war in dieser Studie ein unabhängiger prognostischer Faktor [115]. Eine andere Studie führte eine Western Blot-Analyse zur Bestimmung der Cyclin D1-Proteinexpression bei 70 Ovarialkarzinomen (39 seröse, 15 EC und 16 restliche) durch und quantifizierte diese densitometrisch in drei Gruppen: negativ ($\leq 0,02$), positiv (0,021-0,80) und stark positiv ($\geq 0,81$). Insgesamt zeigten über 94 % eine Expression von Cyclin D1, bei 30 % war diese sehr stark.

Eine signifikante Assoziation bestand lediglich zum FIGO-Stadium, nicht jedoch zu Alter, Histologie, postoperativem Resttumor und Silverberg-Grading. Cyclin D1-Überexpression wurde als wichtiger Prädiktor für ein kürzeres Überleben identifiziert [100]. In einer weiteren immunhistochemischen Analyse von 81 Ovarialkarzinomen (darunter 37 seröse, 14 EC und 11 CCC) wiesen bei einem Cutoff von über zehn Prozent insgesamt 89 % der Tumoren eine Überexpression von Cyclin D1 auf, wobei es in den serösen Karzinomen häufiger zytoplasmatisch und in normalem Ovargewebe sowie benignen Zysten gar nicht gefunden wurde. In dieser Studie fand sich keinerlei Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern oder der Prognose [98].

Ob eine Überexpression der Zellzyklusproteine lediglich einen frühen Schritt in der Karzinogenese oder auch einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt, ist noch nicht zufriedenstellend geklärt.

Im Widerspruch zu den vorhergehenden theoretischen Überlegungen und meisten Studien zeigten unsere Kollektive dreier histologischer Typen nur zu einem geringen Anteil (bis maximal 35,5 % bei den CCC) eine Überexpression eines oder beider Zellzyklusproteine. Von den HGSC exprimierten fast 84 % keines der beiden Zellzyklusproteine oberhalb des Cutoffs und von den Endometriose-assoziierten Tumoren waren immerhin noch 51 bis 52 % vollständig negativ für beide. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in methodischen Unterschieden wie zum Beispiel, dass wir den prozentualen Anteil der gefärbten Tumorzellen gemeinsam mit der Intensität dieser Färbung im IRS zusammenfassten und einen verhältnismäßig hoch angesetzten Cutoff verwendeten. Weiterhin könnte die geringe Zahl der (gültigen) Fälle in den beiden Endometriose-assoziierten Kollektiven die Ergebnisse beeinflusst haben. Bezüglich des HGSC-Kollektivs lagen jedoch deutlich mehr Fälle vor. Wir konnten anhand unseres Kollektivs weiterhin nicht bestätigen, dass eine Überexpression von pRb mit einer schlechteren Prognose assoziiert sei. Der Expressionsstatus von Cyclin D1 zeigte ebenfalls keinerlei Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern und Überleben. Unsere Ergebnisse könnten also darauf hinweisen, dass eine Überexpression der Zellzyklusproteine zwar ein möglicher, jedoch nicht notwendiger oder häufiger Schritt in der Entstehung von Ovarialkarzinomen ist und nicht deren Aggressivität beeinflusst.

Die Zellzyklusproteine rückten in den Mittelpunkt des Interesses, sobald selektive CDK-Inhibitoren als mögliche neue Therapeutika für eine Untergruppe CDK-abhängiger Mammakarzinome postuliert wurden. Tatsächlich scheint nach Studien vergangener Jahre eine

deutliche Assoziation zwischen hohen pRb- und Cyclin D1-Expressionsleveln und der Sensitivität gegenüber selektiven CDK4/6-Inhibitoren zu bestehen. So testeten Finn und Mitarbeiter 2009 verschiedene potentielle Prädiktoren für die Sensitivität von 47 menschlichen Brustkrebszelllinien gegenüber PD0332991, einem oral aktiven, hoch selektiven Hemmer der Cyclin D-Kinasen 4 und 6, und kamen nicht nur zu dem Ergebnis, dass PD0332991 seine größte Wirkung in den pRb- und Cyclin D1-überexprimierenden Zelllinien entfaltete, sondern entdeckten auch, dass die sensitivsten Zelllinien luminal ER α -positiv waren. Dies ist unter Berücksichtigung der physiologischen Wechselwirkungen zwischen Hormonen und Zellzyklus nicht verwunderlich. Bedingt durch das Ziel des Angriffs im Zyklus handelte es sich um eine zytostatische und nicht zytotoxische Wirkung. Es fand sich kein Abfall der Gesamtkonzentration an Rb, aber die Menge des phosphorylierten Rb nahm in den empfindlichen Zelllinien deutlich ab [116]. Ähnliche Ergebnisse erhoben Konecny und Mitarbeiter 2011 an 40 etablierten menschlichen Zelllinien von Ovarialkarzinomen, von denen ebenfalls jene mit der höchsten Rb-Expression auch die höchste Sensitivität gegenüber PD0332991 zeigten und umgekehrt die Hälfte der resistenten Zelllinien eine Deletion im RB-Gen aufwiesen, jedoch nur zehn Prozent der sensitiven. Der Expressionsstatus von Cyclin D1 korrelierte jedoch nicht mit der Wirksamkeit des CDK4/6-Inhibitors. In ihrem Kollektiv von 263 primären Ovarialkarzinomen (darunter 168 seröse, 50 EC, 13 CCC) war eine fehlende immunhistochemische Reaktion auf den Antikörper gegen Rb (festgestellt in 6 % aller Fälle) assoziiert mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben, schlechter Differenzierung, fortgeschrittenem FIGO-Stadium und postoperativen Tumorrest. Allerdings hatten die Fälle mit hoher Rb-Expression, die negativ für p16 waren, eine schlechtere Prognose, sodass die Autoren zu dem Schluss kamen, dass Patienten mit ungünstiger Prognose am meisten von den CDK4/6-Inhibitoren profitieren könnten. Eine mögliche Abhängigkeit von Hormonrezeptoren wurde nicht untersucht [110].

Die Ergebnisse in unseren Kollektiven sprechen nicht für eine Interaktion zwischen Zellzyklusproteinen und den etablierten Hormonrezeptoren in Ovarialkarzinomen, da wir in keinem der histologischen Typen eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Zellzyklusproteinen sowie den Hormonrezeptoren ER α und PR fanden. Laut früheren Studien wird in Endometrioseherden und damit assoziierten Tumoren die Östrogenwirkung über den ER β vermittelt und im Zuge dessen die Expression von ER α und PR herunterreguliert. Demzufolge lauten Hypothesen bezüglich der heterogenen Tumorbilogie von Mamma- und Ova-

rialkarzinomen, dass in den Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen entweder kein funktioneller Hormonsignalweg vorliegt oder aber einer, in dessen Mittelpunkt ER β steht, der sich anders verhält als ER α . Wir konnten jedoch in den EC und CCC ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen ER β und den Zellzyklusproteinen finden. Das heißt jedoch nicht zwangsläufig, dass bei fehlender Assoziation von Zellzyklusproteinen und Hormonrezeptoren eine Wirksamkeit der CDK4/6-Inhibitoren in Ovarialkarzinomen ausgeschlossen wäre. Vielleicht gibt es andere, eher geeignete Rezeptoren, um die Empfindlichkeit eines Tumors gegenüber CDK4/6-Inhibitoren vorherzusagen.

5.1.2 Hormonrezeptoren als diagnostische, prognostische und therapeutische Marker

Der Expressionsstatus der Hormonrezeptoren ER α und PR auf Proteinebene nimmt schon seit Jahren eine zentrale Stellung innerhalb der Diagnostik und Therapie von Mammakarzinomen ein [86]. Da diese Hormonrezeptoren nicht nur im Brustdrüsengewebe, sondern auch in anderen weiblichen Geschlechtsorganen wie dem Ovar exprimiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass sie sowie der ER β in diesen Organen ebenfalls eine Rolle bei der Karzinogenese spielen und somit zum einen Hilfsmittel für die Einschätzung der Prognose, zum anderen Angriffspunkt neuer Therapiemöglichkeiten werden könnten. Aus diesem Grund haben sich in der Vergangenheit viele Studien mit den Hormonrezeptoren ER α , ER β und PR beschäftigt. Bestimmte Umstände schränken deren Aussagekraft jedoch deutlich ein: So ist es zum Beispiel erst seit verhältnismäßig kurzer Zeit üblich, Ovarialkarzinome getrennt nach den histologischen Typen zu untersuchen. Zudem handelt es sich beim Ovarialkarzinom um ein generell eher seltenes Krankheitsbild, sodass ein geringer Stichprobenumfang oft die statistische Aussagekraft einschränkt. Matias-Guiu und Davidson postulierten 2014, dass für eine aussagekräftige Studie entweder mindestens 200 Fälle insgesamt (auf alle histologischen Typen verteilt) oder mindestens 100 Fälle bei den HGSC beziehungsweise jeweils 50 Fälle bei den EC und CCC vorliegen müssten [117]. Ein weiteres Problem stellt die große Anzahl unterschiedlicher Studiendesigns dar und dass in diesem Rahmen selten alle drei Hormonrezeptoren über die drei histologischen Typen HGSC, EC und CCC untersucht wurden. Die genannten Faktoren wurden bei unserer Studie weitgehend berücksichtigt, damit sie die Aussagekraft der Ergebnisse möglichst wenig limitierten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die diagnostische und prognostische Bedeutung der Hormonrezeptoren ER α , PR und ER β vergleichend für drei histologische Entitäten des Ovarialkarzinoms untersucht werden. Eine Studie des Ovarian Tumor Tissue Analysis-Konsortiums

untersuchte 2933 Frauen mit Ovarialkarzinomen (darunter 1742 HGSC, 484 EC, 390 CCC) hinsichtlich ihrer Expression von ER α und PR. Den ER α exprimierten 81 % der HGSC, 76 % der EC und nur 20 % der CCC. Für den PR waren insgesamt 31 % der HGSC positiv, 67 % der EC und 8 % der CCC. Aus den Überlebensanalysen dieser Studie ging deutlich hervor, dass eine starke PR-Expression in HGSC mit verlängertem Überleben einherging sowie die Expression eines der beiden oder beider Hormonrezeptoren in EC mit einem verbesserten krankheitsspezifischem Überleben assoziiert war [19].

Es gelang uns zu bestätigen, dass die histologischen Subtypen HGSC, EC und CCC sich signifikant in der Expression der Hormonrezeptoren unterscheiden: Während die HGSC zu rund 68 % eine Expression von ER α zeigten, jedoch nur in knapp 15 % für den PR anfärbten, waren im EC-Kollektiv jeweils rund 57 respektive 79 % positiv für ER α und PR und fast 83 % exprimierten den ER β im Zellkern sowie 60 % im Zytoplasma. Von den CCC hingegen exprimierten knapp 13 % den ER α und beinahe zehn Prozent den PR, jedoch rund 94 respektive 90 % ER β . Bei ER α und PR wurden ausschließlich nukleäre Anfärbungen beobachtet. Während sich unsere Zahlen geringfügig von denen der oben aufgeführten Ovarian Tumor Tissue Analysis-Studie unterscheiden, vermutlich bedingt durch Unterschiede in Methode und Einteilung, stimmen die Verteilungsmuster der Hormonrezeptoren überein. Zwar ist deren Spezifität zu gering, um als alleiniges Kriterium der Differentialdiagnose geeignet zu sein, aber sie können als Hilfe herangezogen werden. Weiterhin unterstützen unsere Funde die Hypothese, dass es sich bei den histologischen Entitäten auch molekularbiologisch um eigenständige Krankheitsbilder handelt, die unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen zugeführt werden müssen.

Auf Grund geringerer Fallzahlen war es uns nicht möglich, die prognostische Relevanz der unterschiedlichen Klassen von Hormonrezeptoren (auch im Zusammenhang mit dem ZZP-Status) in den Endometriose-assoziierten Karzinomen zu bestimmen. Die prognostische Bedeutung im HGSC hatten wir bereits in früheren Projekten untersucht [92, 113]. Die prognostische und vermutlich auch therapeutische Relevanz der HR-Expression wird erst bei sehr großen Fallzahlen [19] oder auf mRNA-Ebene sichtbar. Obwohl laut unseren früheren Studien die Expressionslevel von ER α -Protein und ESR1 mRNA miteinander korrelierten, war nur letztere ein prognostischer Faktor: Patientinnen, deren Tumoren viel ESR1 mRNA exprimierten, hatten ein über fünffach erniedrigtes Risiko zu sterben. Nicht-seröse Karzinome wiesen häufiger ein hohes ESR1 mRNA-Level auf als seröse und undifferenzierte.

Ein hohes ESR1-Expressionsniveau war wie bereits zuvor berichtet [92] auch bei uns mit längerem Überleben und längerem progressionsfreien Überleben in HGSC assoziiert. Die Schwierigkeiten bei der Beurteilung des prognostischen Wertes von Hormonrezeptoren erklären möglicherweise die eher enttäuschenden Ergebnisse bisheriger Studien mit anti-hormonellen Therapien in Ovarialkarzinomen (siehe Kapitel 1.3). Weiterhin lassen unsere eigenen und die Funde anderer Gruppen vermuten, dass die Tumorbilogie der Ovarialkarzinome sich deutlich von der der Mammakarzinome und jeweils untereinander unterscheidet. In einer anderen Studie war nämlich eine hohe Expression des PR, aber nicht des ER α , ein unabhängiger günstiger prognostischer Faktor in HGSC, während in EC sowohl ER α -, als auch PR-Expression mit einem längeren Überleben assoziiert waren [19] und eine gelegentlich in CCC vorhandene HR-Expression ist offenbar nicht funktionell.

5.2 ARID1A in Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen

Da Loss-of-function-Mutationen im ARID1A-Gen die häufigste gemeinsame molekulare Aberration Endometriose-assoziiierter Neoplasien darstellen, untersuchten wir ihre Rolle im Hinblick auf die Expression von HR und Zellzyklusproteinen. Wiegand und Mitarbeiter (2010) sahen einen Verlust der Proteinexpression bei rund 50 % der EC und 42 % der CCC. Hierbei wurde allerdings nur die Gesamtexpression, unabhängig von der subzellulären Lokalisation, betrachtet [58]. Eine andere Studie belegte jedoch, dass die Wirksamkeit des ARID1A davon abhängt, ob es vom Kern, wo es schnell degradiert würde, in das Zytoplasma transportiert werden kann, und stellte die Hypothese auf, dass nur das zytoplasmatische ARID1A wirksam sei [63].

In unserer Studie fanden wir einen Verlust der zytoplasmatischen ARID1A-Expression bei knapp 78 % der EC und 71 % der CCC. Da wir ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation mit klinisch-pathologischen Merkmalen oder anderen Biomarkern finden konnten, gehen wir davon aus, dass der Verlust der ARID1A-Proteinexpression ein früher Schritt in der Entstehung der Ovarialkarzinome ist. Demnach wäre ARID1A kein geeigneter Marker für die Aggressivität und Prognose des Tumors. Allerdings ist hierbei unser verhältnismäßig hoch angesetzter Cutoff bei einem IRS von vier zu beachten. Möglicherweise ist nur ein vollständiger Verlust der Proteinexpression relevant; in diesem Fall müsste jegliche immun-histochemische Färbung als positiv gewertet werden.

Inwiefern die Mutationen, welche in einem Verlust der Genfunktion resultieren und bisher nur in den Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen gefunden wurden [58], durch die Endometriose begünstigt werden oder vielleicht auch Teilursache der letzteren sind, müssen weitere Studien zeigen.

5.3 HNF-1 β in Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen

HNF-1 β ist ein relativ neuer diagnostischer Marker für das CCC, der über eine hohe Spezifität verfügen soll, und war daher ebenfalls in Bezug auf seine potentielle Korrelation mit Cyclin D1 und pRb von Interesse für uns. Über 79 % aller Tumoren unseres CCC-Kollektivs zeigten eine nukleäre Expression des HNF-1 β auf Proteinebene. Andere Studien bestimmten für den HNF-1 β als diagnostischen Marker der CCC eine Spezifität von 95,2 %. Somit stellt HNF-1 β einen zuverlässigen Marker zur Unterscheidung von CCC und HGSC dar, die gelegentlich ebenfalls Zellen mit klarzelligem Aspekt aufweisen [67]. HNF-1 β ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation vieler verschiedener Gene beteiligt ist, unter anderem solchen des Glucosestoffwechsels und der Gerinnung [66]. Deshalb verwundert es nicht, dass alle HNF-1 β -positiven CCC unserer Studienkohorte eine ausschließlich nukleäre immunhistochemische Anfärbung aufwiesen.

Zu unserer Überraschung zeigten jedoch auch bei den EC fast 15 % eine deutliche nukleäre und sogar 50 % eine zytoplasmatische Überexpression des HNF-1 β . Während eine gelegentliche, wenn auch schwache zytoplasmatische Färbung in EC vorbeschrieben ist, schlossen die meisten anderen Studien eine Expression des HNF-1 β im Kern von EC weitgehend aus, obwohl für beide Histotypen ein Ursprung in atypischer Endometriose diskutiert wird [118]. Lim und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 2015 sowohl endometrioiden als auch klarzellige Karzinome und Tumoren mit gemischter Histologie des Uterus sowie des Ovars immunhistochemisch. Sie fanden eine nukleäre HNF-1 β -Proteinexpression in 89 % der CCC (meist diffus und stark), in 47 % der EC (meist fokal und schwach) und in 41 % der Tumoren mit endometrioiden wie auch klarzelligen Arealen (ebenfalls eher fokal und schwach). Daraus schlossen sie, dass HNF-1 β in der Differentialdiagnostik von EC und CCC dem ebenfalls untersuchten Napsin A unterlegen sei [119].

HNF-1 β ermöglicht den Karzinomzellen den scheinbar paradoxen Warburg-Effekt. Dieser besteht darin, dass Tumorzellen zur Energiegewinnung die Glykolyse statt der oxidativen Phosphorylierung benutzen, obwohl durch letztere mehr Energie in Form von ATP bereit-

gestellt werden könnte. Der Vorteil der Glykolyse liegt jedoch zum einen darin, dass bei ausreichend hoher Glucosezufuhr schneller Energie gewonnen werden kann als durch die oxidative Phosphorylierung, und zum anderen darin, dass sie weitere wichtige Bausteine für die Biosynthese wie Nukleotide, Aminosäuren und Lipide liefern kann. Somit sind Tumorzellen stärker von der Glucose- als von der Sauerstoffzufuhr abhängig. Zudem wird mit Meidung der oxidativen Phosphorylierung auch die physiologische Apoptose unterdrückt [120, 121]. Die CCC scheinen vom Warburg-Effekt kaum für die Proliferation, jedoch stark für ihr Überleben zu profitieren, denn sie sind hochgradig unempfindlich gegenüber Hypoxie und reaktiven Sauerstoffspezies. Außerdem reguliert HNF-1 β weitere Proteine, die an der Reduktion dieser Sauerstoffradikale beteiligt sind, sodass eine seiner Funktionen höchstwahrscheinlich darin besteht, der Zelle ein Überleben in einer Umgebung mit hohem oxidativen Stress zu ermöglichen [122]. Vielleicht liegt hierin die Erklärung für die Entstehung von CCC und womöglich auch EC in atypischen Endometrioseherden. Doch dann stellt sich die Frage, warum die CCC in fast allen Fällen, aber ausschließlich im Kern HNF-1 β exprimierten, während es im EC-Kollektiv selten im Kern, jedoch häufiger im Zytoplasma zu finden war. Möglicherweise handelt es sich beim HNF-1 β ebenfalls um ein Protein, das, wie ARID1A, seine Wirkung nur entfalten kann, wenn es in einer bestimmten Lokalisation vorliegt, hier im Kern. In diesem Falle bleibt aber zu klären, welche Bedeutung der zytoplasmatischen Expression in EC zukommt. Die zytoplasmatische Expression des HNF-1 β fand bisher nicht viel Beachtung und in vielen Studien wurde ausschließlich die nukleäre Expression betrachtet, sodass uns kaum Informationen hierzu vorliegen. Die zytoplasmatische Expression von HNF-1 β in EC ist darüber hinaus interessant, da sie in unserem Kollektiv statistisch signifikant mit der Expression von ER β in beiden subzellulären Lokalisationen sowie mit dem nukleären ARID1A korrelierte. Dies ist unseres Wissens bisher nicht an anderer Stelle beschrieben worden und wirft die Frage nach Ursache und Bedeutung auf.

In Anbetracht seiner vielfältigen Einflussnahme auf Signalwege in der Tumorzelle sind weitere Untersuchungen des HNF-1 β auch in EC und im Hinblick auf Zeit und Ort seiner Expression empfehlenswert.

5.4 Limitationen der Arbeit

Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Studie, sodass der erreichte Stichprobenumfang limitiert war und sich die gemäß der Recherche im Patholo-

giebefundsystem (DC Pathos) primär erwartete Fallzahl von je N=70 für die EC und CCC, die auch komplexere statistische Untersuchungen (unter anderem Überlebensanalysen) ermöglicht hätte, nicht umsetzen ließ. So bestanden die endgültigen Kollektive nach Kontrolle der histologischen Typen und klinischen Daten zwar aus 168 HGSC, jedoch nur aus 35 EC und 31 CCC, und methodisch bedingte Verluste verringerten den Stichprobenumfang zum Teil noch weiter. Zudem waren nicht zu allen Patientinnen aktuelle Überlebens- und Progressionsdaten verfügbar. Die geringen Fallzahlen schränken die Validität der statistischen Analysen ein.

Da die immunhistochemische Analyse ausschließlich an TMAs durchgeführt wurde, ist der potentielle Einfluss einer Tumorheterogenität auf die gefundenen Expressionsraten nicht auszuschließen. Insbesondere Hormonrezeptoren können eine spatiale Heterogenität aufweisen.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Es gelang uns, eine deutliche Heterogenität der drei untersuchten histologischen Ovarialkarzinomtypen bezüglich ihrer Proteinexpressionsprofile nachzuweisen. Daraus folgt, dass eine nach histologischen Gruppen getrennte Untersuchung in jeder Studie, die sich mit Ovarialkarzinomen befasst, unumgänglich ist. Zudem kann das Expressionsprofil der drei Hormonrezeptoren hilfreich bei der Diagnose sein. Des Weiteren stellten wir unterschiedliche Assoziationen von ER β , HNF-1 β und ARID1A mit anderen Biomarkern abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation fest, deren Bedeutung in funktionellen Studien erschlossen werden muss. Die Wechselwirkungen der Signalwege in den Krebszellen sind offensichtlich nicht nur komplex, sondern variieren anscheinend auch zwischen den histologischen Typen, und dies erschwert die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten. Eine Überexpression der Zellyklusproteine, welche die Wirksamkeit der CDK4/6-Inhibitoren in Mammakarzinomen vermitteln, trat hier nur selten auf und korrelierte nicht mit den Hormonrezeptoren, sodass eine erfolgreiche Anwendung der neuen Therapeutika bei Ovarialkarzinomen fraglich ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine Wirksamkeit der CDK4/6-Inhibitoren auch hormonunabhängig möglich ist. Cyclin D1 und pRb waren in HGSC keine prognostischen Faktoren.

5.6 Eigenanteil der Arbeit

Der Eigenanteil der Autorin an dieser Arbeit bestand im Erstellen des EC- und CCC-Kollektives, einschließlich histologischer Qualitätskontrolle und Typisierung gemäß aktueller WHO-Klassifikation gemeinsam mit einer Fachärztin, Blockauswahl und logistischer Betreuung der TMA-Herstellung. Weiterhin erstellte die Autorin eine Datenbank mit klinisch-pathologischen Variablen und Überlebensdaten nach Recherche im Pathologiebefundsystem und in Arztbriefen. Literaturrecherche, die manuelle immunhistochemische Färbung der TMAs, die statistische Analyse mittels SPSS, die Interpretation und Darstellung dieser Ergebnisse sowie das Verfassen des vorliegenden Textes wurden ebenfalls selbständig durch die Autorin vorgenommen.

Literaturverzeichnis

- 1 Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Auflage, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, Deutschland, 2015.
- 2 Statistisches Bundesamt (Hrsg.): Todesursachenstatistik Sterbefälle weiblich 2015, Bonn, Deutschland, (aufgerufen am 23.11.2017 auf https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Sterbefaelle_KrebsWeiblich.html).
- 3 Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer Statistics, 2013. CA Cancer Journal for Clinicians 63:11-30, 2013.
- 4 Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer statistics, 2012. CA Cancer Journal for Clinicians 62:10-29, 2012.
- 5 Hennessey BT, Coleman RL, Markman M: Ovarian cancer. Lancet 374:1371-1382, 2009.
- 6 Moore RG, MacLaughlan S, Bast RC: Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. Gynecologic Oncology 116:240-245, 2010.
- 7 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Langversion 1.0 2013, AWMF-Registernummer: 032/035OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> , [Stand: 20.03.2016]
- 8 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Langversion 2.0 2016, AWMF-Registernummer: 032/035OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html>, [Stand: 23.11.2017]
- 9 Gilks CB, Prat J: Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. Human Pathology 40:1213-1223, 2009.
- 10 Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C: Pathobiology of ovarian carcinomas. Chinese Journal of Cancer 34:50-55, 2015.

- 11 Prat J: New insights into ovarian cancer pathology. *Annual Oncology* 23, 10:111-117, 2012.
- 12 Prat J: Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archive* 460:237-249, 2012.
- 13 Shih IM, Kurman RJ: Ovarian Tumorigenesis. A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *American Journal of Pathology* 164:1511-1518, 2004.
- 14 Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, Prentice LM, Miller D, Santos J, Swenerton K, Gilks CB, Huntsman D: Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med* 5: e232, 2008.
- 15 Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K: Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary; a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 88:2584-2589, 2000.
- 16 Takano M, Kikuchi Y, Yaegashi N, Kuzuya K, Ueki M, Tsuda H, Suzuki M, Kigawa J, Takeuchi S, Tsuda H, Moriya T, Sugiyama T: Clear cell carcinoma of the ovary: a retrospective multicentre experience of 254 patients with complete surgical staging. *British Journal of Cancer* 94:1369-1374, 2006.
- 17 du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, Bauknecht T, Richter B, Warm M, Schröder W, Olbricht S, Nitz U, Jackisch C, Emons G, Wagner U, Kuhn W, Pfisterer J: A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *Journal of National Cancer Institut* 95:1320-1329, 2003.
- 18 Cancer Genome Atlas Research Network (Hrsg.): Integrated genomic analysis of ovarian carcinoma. *Nature* 474:609-615, 2011.

- 19 Sieh W, Köbel M, Longacre TA, Bowtell DD, Defazio A, Goodman MT, Høgdall E, Deen S, Wentzensen N, Moysich KB, Brenton JD, Clarke BA, Menon U, Gilks CB, Kim A, Madore J, Fereday S, George J, Galletta K, Lurie G, Wilkens LR, Carney ME, Thompson PJ, Matsuno RK, Kjær SK, Jensen A, Høgdall C, Kalli KR, Fridley BL, Keeney GL, Vierkant RA, Cunningham JM, Brinton LA, Yang HP, Sherman ME, García-Closas M, Lissowska J, Odunsi K, Morrison C, Lele S, Bshara W, Sucheston L, Jimenez-Linan M, Driver K, Alsop J, Mack M, McGuire V, Rothstein JH, Rosen BP, Bernardini MQ, Mackay H, Oza A, Wozniak EL, Benjamin E, Gentry-Maharaj A, Gayther SA, Tinker AV, Prentice LM, Chow C, Anglesio MS, Johnatty SE, Chenevix-Trench G, Whittemore AS, Pharoah PD, Goode EL, Huntsman DG, Ramus SJ: Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncology* 14:853-862, 2013.
- 20 Lazennec G: Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Letters* 231:151-157, 2006.
- 21 Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY: Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstetrics and Gynecology* 111:144-151, 2008.
- 22 De Stefano I, Zannoni GF, Prisco MG, Fagotti A, Tortorella L, Vizzielli G, Mencaglia L, Scambia G, Gallo D: Cytoplasmic expression of estrogen receptor-beta (ERbeta) predicts poor clinical outcome in advanced serous ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 122:573-579, 2011.
- 23 Drummond AE, Fuller PJ: The importance of ERbeta signalling in the ovary. *Journal of Endocrinology* 205:15-23, 2010.
- 24 Suzuki F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S, Sasano H, Yaegashi N: Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Science* 99:2365-2372, 2008.
- 25 Yap OW, Bhat G, Liu L, Tollefsbol TO: Epigenetic modifications of the estrogen receptor beta gene in epithelial ovarian cancer cells. *Anticancer Research* 29:139-144, 2009.

- 26 Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, Tremblay A: Phosphorylation of Activation Function-1 regulates proteasome dependent nuclear mobility and E6-Associated Protein Ubiquitin Ligase recruitment to the estrogen receptor {beta}. *Molecular Endocrinology* 22:317-330, 2008.
- 27 Dannenmann C, Shabani N, Friese K, Jeschke U, Mylonas I, Brüning A: The metastasis-associated gene MTA1 is upregulated in advanced ovarian cancer, represses ER β , and enhances expression of oncogenic cytokine GRO. *Cancer Biology and Therapy* 7:9, 1460-1467, 2008.
- 28 Gilks CB, Ionescu DN, Kalloger SE, Köbel M, Irving J, Clarke B, Santos J, Le N, Moravan V, Swenerton K: Tumor cell type can be reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Human Pathology* 39:1239-1251, 2008.
- 29 Bulun S: Endometriosis. *The New England Journal of Medicine* 360:268-279, 2009.
- 30 Giudice LC, Kao LC: Endometriosis. *Lancet* 364:1789-1799, 2004.
- 31 Munksgaard PS, Blaakaer J: The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecologic Oncology* 124:164-169, 2012.
- 32 Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, Imai M, Takakura K, Kuromaki T, Morioka E, Arisawa K, Terao T: Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *International Journal of Gynecologic Cancer* 17:37-43, 2007.
- 33 Melin A, Sparén P, Persson I, Bergqvist A: Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Human Reproduction* 21:1237-1242, 2006.
- 34 Veras E, Mao TL, Ayhan A, Ueda S, Lai H, Hayran M, Shih Ie M, Kurman RJ: Cystic and adenofibromatous clear cell carcinomas of the ovary: distinctive tumours that differ in their pathogenesis and behavior: a clinicopathologic analysis of 122 cases. *American Journal of Surgical Pathology* 33:844-853, 2009.

- 35 Fukunaga M, Nomura K, Ishikawa E, Ushigome S: Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. *Histopathology* 30:249-255, 1997.
- 36 DePriest PD, Banks ER, Powell DE, van Nagell JR Jr, Gallion HH, Puls LE, Hunter JE, Kryscio RJ, Royalty MB: Endometrioid carcinoma of the ovary and endometriosis: the association in postmenopausal women. *Gynecologic Oncology* 47:71-75, 1992.
- 37 Prefumo F, Todeschini F, Fulcheri E, Venturini PL: Epithelial abnormalities in cystic ovarian endometriosis. *Gynecologic Oncology* 84:280-284, 2002.
- 38 Moll UM, Chumas JC, Chalas E, Mann WJ: Ovarian carcinoma arising in atypical endometriosis. *Obstetrics and Gynecology* 75:537-539, 1990.
- 39 Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, Baba T, Konishi I: Ovarian cancer in endometriosis: molecular biology, pathology, and clinical management. *International Journal of Clinical Oncology* 14:383-391, 2009.
- 40 Vercellini P, Crosignani P, Somigliana E, Vigano P, Buggio L, Bolis G, Fedele L: The 'incessant menstruation' hypothesis: a mechanistic ovarian cancer model with implications for prevention. *Human Reproduction* 26:2262-2273, 2011.
- 41 Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, Fujii S: Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clinical Cancer Research* 14:32-40, 2008.
- 42 Xue Q, Lin Z, Cheng Y-H, Huang CC, Marsh E, Yin P, Milad MP, Confino E, Reierstad S, Innes J, Bulun S: Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biology of Reproduction* 77:681-687, 2007.
- 43 Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Canis M, Sasano H, Okamura K: Expression of estrogen receptor alpha and beta in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertility and Sterility* 75:1198-1205, 2001.

- 44 Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW: Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics* 1:106-111, 2006.
- 45 Pluchino N, Freschi L, Wenger JM, Streuli I: Innovations in classical hormonal targets for endometriosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 9:2 317-327, 2016.
- 46 Deligeoroglou E, Michailides E, Creatsas G: Oral contraceptives and reproductive system cancer. *Annual of the New York Academy of Science* 997:199-208, 2003.
- 47 Maeda D, Shih IM: Pathogenesis and the role of ARID1A mutation in endometriosis-related ovarian neoplasms. *Advanced Anatomy and Pathology* 20(1): 45-52, 2013.
- 48 Sato N, Tsunoda H, Nishida M, Morishita Y, Takimoto Y, Kubo T, Noguchi M: Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrial carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer Research* 60:7052-7056, 2000.
- 49 Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Tamai S, Matsubara O: Loss of ARID1A protein expression occurs as an early event in ovarian clear cell carcinoma development and frequently coexists with PIK3CA mutations. *Modern Pathology* 25:615-624, 2012.
- 50 Kato N, Sasou S, Motoyama T: Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometrioses of the ovary. *Modern Pathology* 19:83-89, 2006.
- 51 Fowler DJ, Nicolaides KH, Miell JP: Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract. *Human Reproduction Update* 6:495-504, 2000.
- 52 DeLair D, Oliva E, Köbel M, Macias A, Gilks CB, Soslow RA: Morphologic spectrum of immunohistochemical characterized clear cell carcinoma of the ovary: a study of 155 cases. *American Journal of Surgical Pathology* 35:36-44, 2011.
- 53 Kurman RJ, Craig JM: Endometrioid and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer* 29:1653-1664, 1972.

- 54 Han G, Gilks CB, Leung S, Ewanowich C, Irving J, Longacre T, Soslow R: Mixed ovarian epithelial carcinomas with clear cell and serous components are variants of high-grade serous carcinomas: an interobserver correlative and immunohistochemical study of 32 cases. *American Journal of Surgical Pathology* 32:955-964, 2008.
- 55 Chan JK, Teoh D, Hu JM, Shin JY, Osann K, Kapp DS: Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers. *Gynecologic Oncology* 109:370-376, 2008.
- 56 Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Tamai S, Matsubara O: PIK3CA mutations and loss of ARID1A protein expression are early events in the development of cystic ovarian clear cell adenocarcinoma. *Virchows Archive* 460:77-87, 2012.
- 57 Köhler KF, Helguero LA, Haldosén LA, Warner M, Gustafsson JA: Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocrine Review* 26(3):465-478, 2005.
- 58 Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, Senz J, McConechy MK, Anglesio MS, Kalloger SE, Yang W, Heravi-Moussavi A, Giuliany R, Chow C, Fee J, Zayed A, Prentice L, Melnyk N, Turashvili G, Delaney AD, Madore J, Yip S, McPherson AW, Ha G, Bell L, Fereday S, Tam A, Galletta L, Tonin PN, Provencher D, Miller D, Jones SJ, Moore RA, Morin GB, Oloumi A, Boyd N, Aparicio SA, Shih le M, Mes-Masson AM, Bowtell DD, Hirst M, Gilks B, Marra MA, Huntsman DG: ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *New England Journal of Medicine* 363:1532-1543, 2010.
- 59 Ho L, Crabtree GR: Chromatin remodelling during development. *Nature* 463:474-484, 2010.
- 60 Reisman D, Glaros S, Thompson DA: The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 28:1653-1668, 2009.
- 61 Guan B, Wang TL, Shih le M: ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Research* 71:6718-6727, 2011.

- 62 Samartzis EP, Noske A, Dedes KJ, Fink D, Imesch P: ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas. *International Journal of Molecular Science* 14:18824-18849, 2013.
- 63 Guan B, Gao M, Wu CH, Wang TL, Shih le M: Functional analysis of in-frame indel ARID1A mutations reveals new regulatory mechanisms of its tumor suppressor functions. *Neoplasia* 14:986-993, 2012.
- 64 Maeda D, Mao TL, Fukayama M, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Shih le M: Clinicopathological Significance of Loss of ARID1A Immunoreactivity in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 11:5120–5128, 2010.
- 65 Lowery WJ, Schildkraut JM, Akushevich L, Bentley R, Marks JR, Huntsman D, Berchuck A: Loss of ARID1A-associated protein expression is a frequent event in clear cell and endometrioid ovarian cancers. *International Journal of Gynecological Cancer* 22:9-14, 2012.
- 66 Cuff J, Salari K, Clarke N, Esheba GE, Forster AD, Huang S, West RB, Higgins JP, Longacre TA, Pollack JR: Integrative bioinformatics links HNF1B with clear cell carcinoma and tumor associated thrombosis. *PLoS ONE* 8: Issue 9, 2013.
- 67 Köbel M, Kalloger SE, Carrick J, Huntsman D, Asad H, Oliva E, Ewanowich CA, Soslow RA, Gilks CB: A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *American Journal of Surgical Pathology* 33:14-21, 2009.
- 68 Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, Yasugi T, Taketani Y, Hirohashi S: Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *American Journal of Pathology* 163:2503-2512, 2003.
- 69 Kato N, Toukairin M, Asanuma I, Motoyama T: Immunocytochemistry for hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta): a marker for ovarian clear cell carcinoma. *Diagnostic Cytopathology* 35:193-197, 2007.

- 70 Higashiguchi A, Yamada T, Susumu N, Mori T, Suzuki A, Aoki D, Sakamoto M: Specific expression of hepatocyte nuclear factor-1b in the ovarian clear cell adenocarcinoma and its application to cytological diagnosis. *Cancer Science* 98:387-391, 2007.
- 71 Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E: Homeobox genes and cancer. *Experimental Cell Research* 248:1-9, 1999.
- 72 Igarashi P, Shao X, McNally BT, Hiesberger T: Roles of HNF1-beta in kidney development and congenital cystic diseases. *Kidney Int* 68:1944-1947, 2005.
- 73 Kobayashi H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sakata M, Sado T, Oi H: The Role of Hepatocyte Nuclear Factor-1 β in the Pathogenesis of Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *International Journal of Gynecological Cancer* 19:471-479, 2009.
- 74 Prat J: *Pathology of the ovary*. Saunders, Philadelphia, 2004.
- 75 Irving JA, Catasús L, Gallardo A, Bussaglia E, Romero M, Matias-Guiu X, Prat J: Synchronous endometrioid carcinomas of the uterine corpus and ovary: alterations in the beta-catenin (CTNNB1) pathway are associated with independent primary tumors and favorable prognosis. *Human Pathology* 36:605-619, 2005.
- 76 Catasús L, Bussaglia E, Rodriguez I, Gallardo A, Pons C, Irving JA, Prat J: Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Human Pathology* 35:1360-1368, 2004.
- 77 Jones S, Li M, Parsons DW, Zhang X, Wesseling J, Kristel P, Schmidt MK, Markowitz S, Yan H, Bigner D, Hruban RH, Eshleman JR, Iacobuzio-Donahue CA, Goggins M, Maitra A, Malek SN, Powell S, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Papadopoulos N: Somatic mutations in the chromatin remodeling gene ARID1A occur in several tumor types. *Human Mutations* 33:100-103, 2012.
- 78 Campbell IG, Russel SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA: Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research* 64:7678-7681, 2004.

- 79 Lau KM, Mok SC, Ho SM: Expression of human estrogen receptor-alpha and -beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *PNAS* 96:5722-5727, 1999.
- 80 Syed V, Zhang X, Lau KM, Cheng R, Mukherjee K, Ho SM: Profiling estrogen-regulated gene expression changes in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Oncogene* 24:8128-8143, 2005.
- 81 Murdoch WJ: Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society. Biological Sciences* 71:529-543, 1996.
- 82 Katabuchi H, Okamura H: Cell biology of human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinogenesis. *Medical Electron Microscopy* 36:74-86, 2003.
- 83 O'Donnell AJ, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP: Estrogen receptor-alpha mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-Related Cancer* 12:851-866, 2005.
- 84 Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA: Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling Atlas* 6:e003, 2008.
- 85 Bossard C, Busson M, Vindrieux D, Gaudin F, Machelon V, Brigitte M, Jacquard C, Pillon A, Balaguer P, Balabanian K, Lazennec G: Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. *PLOS One* 7/9, 2012.
- 86 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 3.0 2012. AWMF-Registernummer: 032-045OL, <https://leitlinienprogramm-onkologie.de/Mammakarzinom.html>, [Stand 23.11.2017].
- 87 Ahlgren JD, Ellison NM, Gottlieb RJ, Laluna F, Lokich JJ, Sinclair PR, Ueno W, Wampler GL, Yeung KY, Alt D: Hormonal palliation of chemoresistant ovarian cancer: Three consecutive phase II trials of the Midatlantic Oncology Program. *Journal of Clinical Oncology* 11(10): 1957-1968, 1993.

- 88 Markman M, Iseminger KA, Hatch KD, Creasman WT, Barnes W, Dubeshter B: Tamoxifen in platinum-refractory ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group Ancillary Report. *Gynecologic Oncology* 62(1): 4-6, 1996.
- 89 Karagol H, Saip P, Uygun K, Caloglu M, Eralp Y, Tas F, Aydiner A, Topuz E: The efficacy of tamoxifen in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Medical Oncology* 24:39-43, 2007.
- 90 Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics 2000. *CA Cancer Journal Clin* 50:7-33, 2000.
- 91 Tropé C, Marth C, Kaern J: Tamoxifen in the treatment of recurrent ovarian carcinoma. *European Journal of Cancer* 36:59-61, 2000.
- 92 Darb-Esfahani S, Wirtz RM, Sinn BV, Budczies J, Noske A, Weichert W, Faggad A, Scharff S, Sehouli J, Oskay-Özcelik G, Zamagni C, De Iaco P, Martoni A, Dietel M, Denkert C: Estrogen receptor 1 mRNA is a prognostic factor in ovarian carcinoma: determination by kinetic PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Endocrine-Related Cancer* 16:1229-1239, 2009.
- 93 Cobrinik D: Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24:2796-2809, 2005.
- 94 Nam EJ, Kim YT: Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 18:1169-1182, 2008.
- 95 Witzel II, Koh LF, Perkins ND: Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochemical Society Transactions* 38:217-222, 2010.
- 96 Bartkova J, Lukas J, Strauss M, et al: Cyclin D1 oncoprotein aberrantly accumulates in malignancies of diverse histogenesis. *Oncogene* 10:775-778, 1995.
- 97 Arnold A, Papanikolaou A: Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology* 23:4215-4224, 2005.
- 98 Dhar KK, Branigan K, Parkes J, Howells RE, Hand P, Musgrove C, Strange RC, Fryer AA, Redman CW, Hoban PR: Expression and subcellular localization of cyclin D1 protein in epithelial ovarian tumour cells. *British Journal of Cancer* 81:1174-81, 1999.

- 99 Worsley SD, Ponder BAJ, Davies BR: Overexpression of cyclin D1 in epithelial ovarian cancers. *Gynecologic Oncology* 64:189–95, 1997.
- 100 Barbieri F, Lorenzi P, Ragni N, Schettini G, Bruzzo C, Pedulla` F, Alama A: Overexpression of cyclin D1 is associated with poor survival in epithelial ovarian cancer. *Oncology* 66:310-315, 2004.
- 101 Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Iganaki M, Delcros JG, Moulinoux JP: Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry* 243,527-536, 1997.
- 102 Parker BW, Kaur G, Nieves-Neira W, Taimi M, Kolhagen G, Shimizu T, Losiewicz MD, Pommier Y, Sausville EA, Senderowicz AM: Early induction of apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to flavopiridol. *Blood* 91:458-465, 1998.
- 103 Rosania GR, Merlie J Jr, Gray N, Chang YT, Shultz PG, Heald R: A cyclin-dependent kinase inhibitor inducing cancer cell differentiation: biochemical identification using *Xenopus* egg extracts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:4797-4802, 1999.
- 104 Melillo G, Sausville EA, Cloud K, Lahusen T, Varresio L, Senderowicz A: Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor expression in human monocytes. *Cancer Research* 59:5433-5437, 1999.
- 105 Zwijsen RM, Wientjens E, Klomp maker R, Sman J van der, Bernards R, Michalides RJ: CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88:405-415, 1997.
- 106 Prall OW, Rogan EM, Sutherland RL: Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65:169-174, 1998.
- 107 Lange CA, Yee D: Killing the second messenger: targeting loss of cell cycle control in endocrine-resistant breast cancer. *Endocrine-related Cancer* 18(4):C19-C24, 2011.

- 108 Roberts PJ, Bisi JE, Strum JC, Combest AJ, Darr DB, Usary JE, Zamboni WC, Wong KK, Perou CM, Sharpless NE: Multiple role of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *Journal of National Cancer Institute* 104(6):476-487, 2012.
- 109 Witkiewicz AK, Cox D, Knudsen ES: CDK4/6 inhibition provides a potent adjunct to Her2-targeted therapies in preclinical breast cancer models. *Genes and Cancer* 5(7-8):261-272, 2014.
- 110 Konecny GE, Winterhoff B, Kolarova T, Qi J, Kanthinh M, Dering J, Yang G, Chalukya M, Wang HJ, Anderson L, Kalli KR, Finn RS, Ginther C, Jones S, Velculescu VE, Riehle D, Cliby WA, Randolph S, Koehler M, Hartmann LC, Slamon DJ: Expression of p16 and retinoblastoma determines response to CDK4/6 inhibition in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 17(6):1591-1602, 2011.
- 111 Beith J, Burslem K, Bell R, Woodward N, McCarthy N, De Boer R, Loi S, Redfern A: Hormone receptor positive, HER2 negative metastatic breast cancer: A systematic review of the current treatment landscape. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* 12(Suppl. 1):3-18, 2016.
- 112 Kurman RJ, Carangiu ML, Herrington CS, Young RH (Editors): *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. 4th Edition, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press, 2014.
- 113 Sinn BV, Darb-Esfahani S, Wirtz RM, Budczies J, Sehouli J, Chekerov R, Dietel M, Denkert C: Evaluation of a hormone receptor-positive ovarian carcinoma subtype with a favourable prognosis by determination of progesterone receptor and oestrogen receptor 1 mRNA expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Histopathology* 59:918-927, 2011.
- 114 Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM: Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 10:5168-5177, 2004.

- 115 Kommos S, du Bois A, Ridder R, Trunk MJ, Schmidt D, Pfisterer J, Kommos F (for the AGO-OVAR): Independent prognostic significance of cell cycle regulator proteins p16INK4a and pRb in advanced-stage ovarian carcinoma including optimally debulked patients: a translational research subprotocol of a randomised study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. *British Journal of Cancer* 96:306-313, 2007.
- 116 Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, Ginther C, Atefi M, Chen I, Fowst C, Los G, Slamon DJ: PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Research* 11(5):R77, 2009.
- 117 Matias-Guiu X, Davidson B: Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Archive* 464:315-331, 2014.
- 118 Kato N, Sasou S, Motoyama T: Expression of hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Modern Pathology* 19: 83-89, 2006
- 119 Lim D, Ip PP, Cheung AN, Kiyokawa T, Oliva E: Immunohistochemical comparison of ovarian and uterine endometrioid carcinoma, endometrioid carcinoma with clear cell change, and clear cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 39(8):1061-1069, 2015.
- 120 Hsu PP, Sabatini DM: Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134:703-707, 2008.
- 121 Chen Y, Qian Y, Wu S: The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. *Free Radical Biology and Medicine* 79:253-263, 2015.
- 122 Mandai M, Amano Y, Yamaguchi K, Matsumura N, Baba T, Konishi I: Ovarian clear cell carcinoma meets metabolism; HNF-1 β confers survival benefit through the Warburg effect and ROS reduction. *Oncotarget* 6(31):30704-30714, 2015.

- 123 Villegas SL, Darb-Esfahani S, von Minckwitz G, Huober J, Weber K, Marmé F, Furlanetto J, Schem C, Pfitzner BM, Lederer B, Engels K, Kümmel S, Müller V, Mehta K, Denkert C, Loibl S: Expression of Cyclin D1 protein in residual tumor after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 168: 179-187, 2018.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Antonia Elsner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Evaluation der Expression und Interaktion von Hormonrezeptoren und Zellzyklusproteinen in High-grade serösen Karzinomen im Vergleich zu Endometriose-assoziierten Neoplasien des Ovars sowie Evaluation neuer diagnostischer Marker für diese* 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.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Ganz besonders danke ich Frau PD Dr. med. Silvia Darb-Esfahani für die Bereitstellung des hoch interessanten Themas, ihre herausragende freundliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten (nicht gerade kurzen) Zeit der Dissertation sowie ihre Geduld mit mir.

Weiterhin gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe Translationale Tumorforschung: Vor allem danke ich hier Herrn Prof. Dr. med. Carsten Denkert, dass ich in seiner gut organisierten und harmonischen Forschungsgruppe promovieren durfte. Ich danke des Weiteren Petra Wachs, Ines Koch und Sylwia Handzik sehr dafür, dass sie mir nicht nur bei der Einarbeitung in Labormethoden, sondern auch im weiteren Verlauf bei jedem meiner kleineren und größeren „Panikanfälle“ mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt auch Judith Lindner und Catarina Kunze für viele gute Ratschläge und fröhliche Zeiten im Doktorandenzimmer. Außerdem danke ich unseren studentischen Hilfskräften.

Herrn Prof. Dr. med. Manfred Dietel danke ich für das angenehme Forschungsumfeld, das er als Leiter des Instituts für Pathologie geschaffen hat.

Sanny, danke für das Korrekturlesen, aber noch viel mehr dafür, dass du immer für mich da warst, mir Sicherheit gabst, wenn mich Selbstzweifel quälten, mich motiviertest, wenn die Motivation sich winkend von mir verabschieden wollte und mich beruhigtest, wenn ich panisch wurde!

Kader, ich danke auch dir für deine seelische Unterstützung und deinen unerschütterlichen Optimismus!

Basti, danke, dass du Medizin studiert hast, denn andernfalls hätte ich dich vermutlich nie kennen- und lieben gelernt. Deine anscheinend unbegrenzte Fähigkeit, mich zum Lachen zu bringen, gibt mir immer wieder neue Kraft! Ohne dich hätte ich diese Arbeit möglicherweise nicht durchgehalten!

Zum Abschluss bedanke ich mich noch bei meiner Familie: Ich danke meinem Bruder und meinen Eltern, die immer für mich da waren, mich unterstützt, gefördert und gefordert haben – ohne euch hätte ich diese Arbeit nie angefangen!